

原子間力顕微鏡による各種試料の微細形状計測

斎藤 隆之, 坂村 喬史, 片山 直樹

Measurement of the Microscopic Shape of Various Samples by Atomic Force Microscope

Takayuki SAITOU, Takashi SAKAMURA, Naoki KATAYAMA

キーワード：原子間力顕微鏡，微細形状，ハイアスペクト比，生体試料

1. はじめに

近年，工業製品や材料等の表面の微細な凹凸形状評価や表面粗さ計測の要求が増えてきている。例えば，触針式の表面粗さ計では測定不可能なナノメートル以下の光学素子表面の粗さや，開口部に比べて深さが大きな，すなわちハイアスペクト比であるミクロンオーダーの凹凸形状の評価などである。当場では，平成22年に原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscope:AFM）を導入した。本装置は，定量的な表面の微細形状計測を行う装置である。本報では，工業材料やさらに生体試料などを対象として，AFMにより実施した微細形状計測の事例について報告する。

2. 原子間力顕微鏡について

本装置は走査プローブ顕微鏡（Scanning Probe Microscope:SPM）の1種である。SPMは図1に示すように，微小な探針（プローブ）を試料表面に接近させ，局所的な物理

量を検出する。この物理量が一定となるように，フィードバック回路により垂直方向（Z）の圧電体の伸縮を制御する。面内方向（X,Y）の圧電体に電圧を加え，探針を2次元的に走査することでフィードバック電圧により表面像（SPM像）を得ることができる。物理量としては電気的情報，力学的情報，光学的情報，誘電的情報および磁気的情報などがある¹⁾。

カンチレバーと呼ばれる“片持ち梁”の先にある探針と試料間の原子間力を検出して，表面の凹凸を定量的に計測・画像化するのがAFMである（図2）。一對の2個の原子があるとき，その間には距離に依存した力が働く。遠い距離から近づいていくと，まず引力が働きある距離で極大になりその後，弱くなり，さらに近づくと斥力が働く。これらを一般的に原子間力と呼んでいる。この引力あるいは斥力を一定に保つためカンチレバーの変位が一定になるよう垂直方向（Z）の距離をフィードバックし，試料を水平方向（X,Y）にスキャンすると試料表面の凹凸が得られる。カンチレバーの変位の検出にはレーザーと光センサーが用いられる。

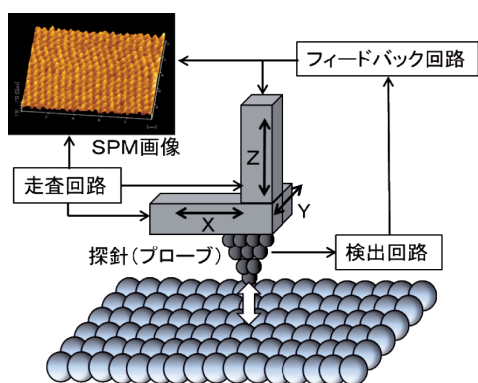


図1 SPMの動作原理

(文献1) 基礎編II第1章 図1.1をもとに再作成)

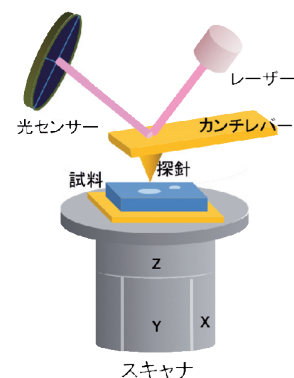


図2 AFMの動作原理

通常，斥力領域で測定されるが，これは探針が試料と接触していることを意味する。この測定法をコンタクトモードと呼ぶ。これに対し，カンチレバーを数k～数百kHzで微小振動させながら試料に接近させていき，振幅の減衰率が一定になるようにZ軸をフィードバックする測定方法もある。これ

事業名：経常研究

課題名：機能性微細表面の計測・解析技術に関する研究

(平成23～24年度)

はダイナミックフォースモードあるいはタッピングモードなどと呼ばれる。このモードは、間欠的な接触であるため、試料や探針の損傷が小さい、軟らかい試料でも真の形状を得やすい等の利点がある。しかし、測定条件の設定が複雑になる、摩擦などの物性が取得できない等の面もありコンタクトモードと使い分けられる。また完全に非接触となるノンコンタクトモードもあり、さらにスローブ検出法や周波数変調法などに細分される。当場の機種で可能な方法は前者のスローブ検出法であるが、今回の報告では使用していない。

3. 実験

試料として工業製品の光学素子、ナノインプリント用のシリコン型および液中での生体試料等を取り上げた。装置は日立ハイテクサイエンス製走査プローブ顕微鏡L-trace IIおよび同E-sweepを用いた。前者(図3)は直径150mmまでの大きな試料が測定可能であり、後者は試料サイズが20mmまでだが大気中のほか真空中・液中での測定および温度制御下での測定が可能であるという特徴をそれぞれ有している。表1にそれぞれの仕様を示す。試料サイズや測定内容で機種を選択し、試料ごとに適切な形状計測ができるよう測定条件を検討した。



図3 走査プローブ顕微鏡(L-trace II)

4. 事例と計測結果

4.1 光学素子の表面粗さ

道内で光学素子を製造する企業から水晶表面の粗さ計測の要望があった。ナノメートルオーダーと予想されたが、触針

式の粗さ計では測定が不可能な領域で、走査プローブ顕微鏡で実施した。装置はL-trace IIを用いダイナミックフォースモードで行った。このような硬い試料についてはコンタクトモードとの差はほとんど無いと言われているが、試料とカンチレバーへのダメージが少ないモードとして前者を選んだ。測定に用いた条件を表2に示す。

これらのパラメータの意味を簡単に記述する。モードは前述の通りである。カンチレバーは代表的な特性であるバネ常数 K と全長 L を括弧内に示している。振幅減衰率 ΔA の -0.283 とはもとの振幅から28.3%の減衰を意味する。P, Iゲインは、 ΔA を一定に保つZ軸フィードバックのための、誤差信号での比例、積分制御項のそれぞれの係数である。Qカーブ測定倍率とはカンチレバー変位の検出電圧の電気的増幅率、加振電圧はカンチレバーを振動させる圧電素子への電圧、Q値は共振周波数でのピークの鋭さ、動作周波数は実際に振動させた周波数である。また走査周波数はスキャンの周波数で上記振動とは無関係である。

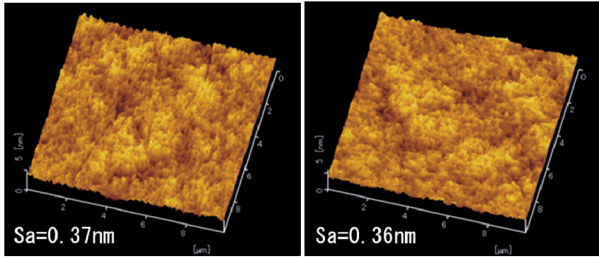
表2 水晶の表面形状測定条件

モード	ダイナミックフォースモード
カンチレバー	SI-DF40P2 ($K=26\text{N/m}$, $L=160\mu\text{m}$)
振幅減衰率 (ΔA)	-0.283
Iゲイン	0.025
Pゲイン	0.0063
Qカーブ測定倍率	2
加振電圧	0.117V
Q値	241 (共振周波数: 301.117Hz)
動作周波数	300.675Hz
走査周波数	0.45Hz

測定結果と計測された平均面粗さ S_a (3次元の算術平均粗さ)を図4に示す。左はレバーの回転角度が 0° 、右は -90° での結果である。回転角度とは高さデータを取得する際のカンチレバーの試料に対する相対的スキャン方向のことで、図2においてカンチレバーが右へ動く場合を 0° として、時計回りに増加するよう定義される。計測された S_a は1nm以下であり、このような凹凸の少ない試料の場合、表面の微細構造と走査により生じるノイズの区別が困難になる。ノイズは外部からの振動や電気的な原因によるほか、探針の先端の損傷にも起因する。判断のためには回転角度を直交させた2つの測定を実施することが有効であった。2つの結果を比較す

表1 走査プローブ顕微鏡の仕様

	E-Sweep	L-trace II
分解能	原子分解能	水平: 0.5nm, 垂直: 0.05nm
試料サイズ	20mmφ, 厚さ 10mm 以下	150mmφ, 厚さ 22mm 以下
試料駆動範囲	X-Y ステージ 5mm	X-Y ステージ 150mm x 110mm
スキャン走査範囲	水平 20 μm /垂直 1.5 μm , 水平 100 μm /垂直 15 μm 選択可能	水平 90 μm /垂直 6 μm (※形状計測の正確性が高い)
位置決め顕微鏡	金属顕微鏡(微分干涉付き) (最大 2000 倍)	組み込みズーム顕微鏡 (285~1100 倍)
主な機能	形状(コンタクト), 形状(ダイナミック), 摩擦, 磁気力, 粘弾性, 表面電位, 液中・真空中・温度制御測定	形状(コンタクト), 形状(ダイナミック), 摩擦, 位相



式 $Sa = \frac{1}{A} \iint_A |Z(x,y)| dx dy$ A:面積、Z:基準面(全データの平均面)との差
 図4 水晶の表面形状 (左:回転角度 0°, 右:同-90°)

ると互いの画像は90°回転しており、抽出されるSaもほとんど一致し表面粗さが適正に取得できている。

4.2 微細なハイアスペクト比形状の計測

微細加工技術の一つとして、微細な凹凸表面を有する型を可塑性材料に押しつけ、表面の構造を転写する技術にナノインプリント法がある。当场でもこの方法を工業生産に利用するための研究を実施してきた。この際、表面の転写状態の評価にはAFMが適している。しかし、型の形状が幅：1 μm、間隔：2 μm、深さ5 μmの溝状のようなハイアスペクト比の場合、通常のカンチレバーによる測定が困難なため、適切なカンチレバーの選定と測定条件の検討を行った。

一般的なカンチレバーの探針は三角錐あるいは多角錐形状で3~13 μm程度の長さ、また同程度の最大幅を有している。そのためAFMで狭い溝を計測すると実際の幅より狭く測定されることがあり、場合により溝内に探針が侵入できず、この場合真の形状とかなり異なった計測結果となる。上記のハイアスペクト比形状を適切に計測するため、特殊なカンチレバーとしてnanotools社製のSpecial EBD 5 μmを選択した。これは長さ約5 μm、直径約0.5 μmの高密度カーボン製の探針が取り付けられているカンチレバーである。

これを用いて、上記ハイアスペクト比のナノインプリント用シリコン型の断面形状計測した結果を図5に示す。測定はL-trace IIのダイナミックフォースモードでかつ装置メーカー独自の測定方法であるSISモードを用いた。これは振動している探針が試料に接触すると瞬間的に上方へ待避する動きをし、軟らかい試料や急峻な突起を有する試料で真の形状が得やすいとされている。さらに本装置は仕様上、スキャナのZ軸の可動範囲が6 μmであるため、最初に探針が接触した位置の高さに応じてZ軸の原点を測定者が適切に調整しなおす必要があった。通常の試料ではほとんど意識しなくとも測定

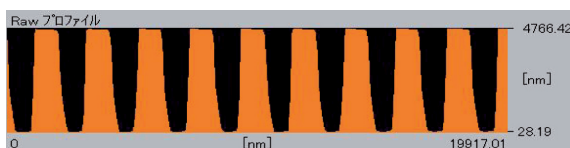


図5 シリコン型の断面形状

すべき高さが、可動距離と近接してくると注意が必要になる。図5では5 μmの型の深さがほぼ適正に計測できている。型の壁の部分に傾斜が認められるが、これは原理に起因する見かけ上の現象で、実際にはほぼ90度の角度があると思われる。

4.3 生体試料1-毛髪表面形状

表1に示したように走査プローブ顕微鏡E-sweepは、形状測定が液中や真空など環境制御下でも可能である。液中での測定が要求される例として生体試料がある。細胞であれば液中でなければ短時間で通常、死滅が起こる。また毛髪、赤血球、染色体、コラーゲンなど生体の一部分が抽出された組織であれば大気中でも測定可能だが、液中での形状を求められる場合が多い。最初に簡単な生体試料として、毛髪の大気中と純水中での表面形状の計測を試みた。生体試料の液中測定で特に留意する点は、固定法および液中で安定状態にするための保持時間と考えられる。

毛髪は観察部に力をかけないように採取し、エタノールで軽く拭きセルに設置可能な長さに切断して用いた。試料の固定は大気中では両面テープで問題はなかったが、液中測定ではテープの膨潤が認められるため、専用の液中用固定セルを用い、液中で1時間以上保持した後、測定に供した。測定条件を表3に示す。本測定では、コンタクトモードを用いた。試料の硬さから推定して試料にも探針にも損傷が生じにくいと判断し、パラメータ設定が特に液中で簡単な本モードを選んだ。たわみ量とはカンチレバーに与えた一定の変位で、マイナスは上へのたわみ(斥力領域)であることを意味する。

表3 毛髪表面形状測定条件

モード	コンタクトモード
カンチレバー	SI-AF01 (K=0.14N/m, L=450μm)
たわみ量	-0.977nm
Iゲイン	大気中: 0.454, 純水中: 0.770
Pゲイン	大気中: 0.113, 純水中: 0.190
走査周波数	0.38Hz

図6に測定結果を示す。これより液中では、表面のキューティクルが開いている状態が良くわかる。これを定量化するために2次の傾き補正、すなわち毛髪表面を平面に近似した後、平均面粗さSaを求めた。大気中では88nm、純水中では120nmとなり表面の凹凸は純水中で大きいことが確認された。

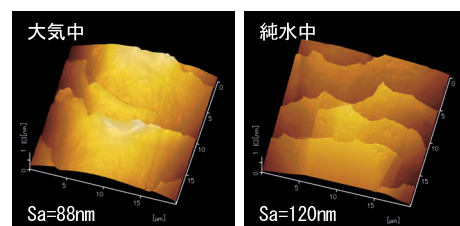


図6 毛髪表面形状

4.4 生体試料 2 - 生きた細胞形状 -

細胞の生きた状態の (in vivo) AFM測定は既に多くの報告²⁾があり、本報でもAFMによる細胞のin vivo形状計測を試みた。対象としたのはマウスの頭蓋骨由来の骨芽細胞 (MC3T3-E1細胞) を培養液 (メディアム) 中のカバーガラス上で、数日間培養した試料である。培養は温度37°C、二酸化炭素濃度 5%で行い、観察の直前までこの環境に保った。ただし、培養と測定が異なる場所であったため、途中で通常温度、雰囲気にした時間が生じたが光学像での観察から細胞は生きてると判断された。

測定はE-sweepによりダイナミックフォースモードで、専用の液中用固定セルにカバーガラスを固定して行った。また、セルには純水ではなく培養液を入れた。測定装置内で温度、雰囲気制御はせず極力短時間での測定を意図したが、最大で2時間程度この環境に置かれた。さらにカンチレバーも試料の変形を防ぐため極めてばね定数が低いものを選択した。測定箇所の位置決めの際、CCDによる光学画像を用いるが、この試料はほとんど透明であるため微分干渉方式で観察した。この方式は透明な試料でも屈折率と厚みの差で生じる光路差を利用し、観察像があたかも横から光が当たっているような立体感を有する。また測定用のスキャナは、細胞の個体が数10~100 μm のサイズであるため可動範囲が水平方向に100 μm で垂直方向に15 μm のものを選択した。この試料は以上のような適切なハードウェアの選択とともに測定条件の検討が非常に重要であった。表4に代表的な測定条件を示す。レバーの回転角度は-180度である。測定上で課題となった点は、ばね定数が極めて弱いレバーで液中測定を行うため、共振ピークが非常に弱く通常は左右対称になる共振曲線は非対称となりSN比が低下した。そのためQ値が定まらず、適切な動作周波数を選定するのに多大な時間を要した。このことはAFMによる細胞のin vivo測定上での大きな隘路と考えられる。

表4 生きた細胞形状の測定条件

モード	ダイナミックフォースモード
カンチレバー	BRUKER社製 MLCL Cレバー ($K=0.01\text{N/m}$, $L=310\mu\text{m}$)
振幅減衰立 (ΔA)	-0.437
Iゲイン	0.0311
Pゲイン	0.0103
Qカーブ測定倍率	10
加振電圧	10V
Q値	不定 (共振周波数: 5.76KHz)
動作周波数	5.00Hz
走査周波数	0.20Hz

測定結果を光学画像とともに図7に示す。光学画像の四角で示した範囲をAFMで計測している。図8に形状の立体表示を、図7 (AFM画像) の白線部の断面を図9に示す。複数の画像解析から今回の細胞が3 μm 程度の高さであることが分かった。測定条件を追い込んで、レバーの回転角度が

0度では、レバーによる試料の引きずりと見られる現象が常に発生した。この方向は柔らかい試料では引きずりが発生しやすいと言える。

AFMによる細胞のin vivo形状計測にはさらにいくつかの課題が挙げられる。(1) 本測定ではスライドガラス上に培養した細胞が自発的に固着している状態で測定したが、固着が弱い場合、測定中に変形や移動する場合がある。(2) 測定時間が長時間になると細胞が明らかに変形 (死滅など) してくる。そのため、測定時にも温度と二酸化炭素濃度を制御することが必要である。

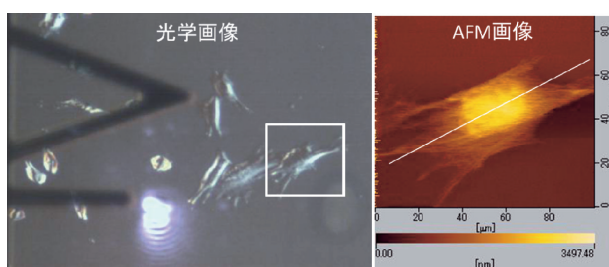


図7 細胞の表面形状

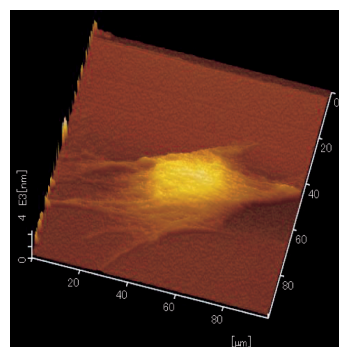


図8 細胞形状の立体表示

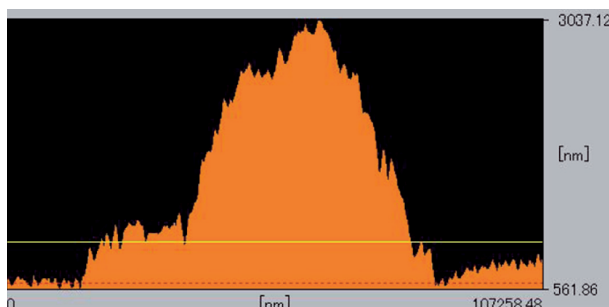


図9 細胞の断面形状

5. おわりに

AFMを用いて工業材料や生体試料など様々な試料の微細形状計測に取り組み、多くの試料が適正に計測できるようになった。生きた細胞試料については、固着と測定環境に関して課題が残った。測定条件ではノンコンタクトモード (スロー

ブ検出法)も検討の余地があり、本試料について引き続き検討する予定である。

謝辞

本研究で使用した原子間力顕微鏡は、独立行政法人科学技術振興機構(JST)の地域産学官共同研究拠点整備事業で導入されました。また、培養した細胞をご提供頂いた北海道大学病院・口腔総合治療部の飯田俊二先生に、深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 重川秀美 他編：走査プローブ顕微鏡－正しい実験とデータ解析のために必要なこと－, 共立出版株式会社, 425pp., (2009)
- 2) 例えば, 水谷武臣, 川端和重：表面科学, Vol.34, No.9, p.500-504, (2013).