

## 電子顕微鏡による粒子計数の精度について

神山 宣彦

顕微鏡による分析精度は、粒子分解能と粒子計数の精度とに分けられる。粒子分解能は、使用顕微鏡の光の波長（光学顕微鏡では可視光、電子顕微鏡は加速電圧に依存した電子ビームの波長と電子束の直径）でほぼ決定される。一方、粒子計数の精度は、計数粒子の総数に依存し、計数粒子数が多いほど精度は高くなる。つまり計数値から推定した母集団の粒子数（あるいは粒子濃度）はより精度が高くなる。計数粒子数の総数は、観察標本上の粒子の濃度と観察面積とで決まるが、観察粒子のサイズも大きな要素になる。それらの関係をつぎに解説した（JIS K 3850-1～4：2000「解説」より抜粋）。

## 5・5 計数

以下に平成7年1月1日制定のJIS K 3850に記載してあった計数に関する注意事項等を再録する。新しいJIS K 3850の計数法と異なる部分もあるが、全体として参考になる部分が多い。

## (1) 計数繊維の決定

測定対象繊維（計数緒推）の 繊維の種類及び サイズの範囲の二つは、電子顕微鏡では、最初に決めなくてはならない重要な因子である。

電子顕微鏡法では、走査電子顕微鏡（SEM）でも透過電子顕微鏡（EM）でも、繊維の長さとは幅はかなり正確に、かつ、容易に求めることができる。光学顕微鏡法では、ある一定の試料作製法と観察倍率を規定すれば、見える繊維の最小サイズはほぼ一様に決まってしまうので、“長さ5 μm以上で幅3 μm以下、アスペクト比が3以上”というのが、現行の測定対象繊維の定義になっている。電子顕微鏡法で、その定義にしたがって繊維を計数すると、観察倍率によって見える繊維の最小サイズ（特に幅）が異なるので、計数すべき最小サイズをあらかじめ決めておかないと、観察倍率に依存した観察可能な繊維を全部計数することになり、どこまで細い繊維が見える状態で計数したのかによって、繊維数の測定結果は変化し不正確さが生じてしまう。場合によっては、不必要な計数努力をすることにもなりかねない。

電子顕微鏡では、一般に光学顕微鏡よりもかなり細いものまで観察できる。例えば、アスペクト比3以上の条件を満たしている長さ5μmで幅0.1μmの繊維も幅0.05 μmの繊維も共に数千倍の観察倍率のTEMの蛍光板上で十分確認できるサイズである。しかし、この繊維は光学顕微鏡では全く観察できない細さの繊維である。このように、電子顕微鏡では、光学顕微鏡とは別に計数繊維の幅（特に最小計数繊維幅）の規定が必要になるのである。

(a) 光学顕微鏡と同等サイズの繊維の計数 電子顕微鏡法でも光学顕微鏡で計数している繊維サイズと同等の繊維を計数するというのが一つの考え方である。従来の種々の研究報告から、最近の優れた分解能をもつ光学顕微鏡及び試料処理法の下では、幅約0.2 μm程度の繊維まで計数できるようになっていると考えられている。

一方、実際に光学顕微鏡と電子顕微鏡の両方法による測定結果を比較してみると、光学顕微鏡はただか繊維幅が0.3～0.4 μm程度のアスベストまでしか検出していないという報告がある。

現在、光学顕微鏡による測定値と完全に一致させることは難しいが、一応、電子顕微鏡では、長さ5

um以上幅3 um未満で0.4 um以上の繊維を測定すると、その計数結果は、光学顕微鏡の結果とほぼ同じ程度の値になると考えられる。

走査電子顕微鏡法でも、この"光学顕微鏡で観察できる同等の大きさの繊維"のアスベスト繊維数濃度を測定することは十分可能である。しかし、走査電子顕微鏡法でこれ以下の細さの繊維を含む計数を日常的に行うのはかなり困難な作業となるので、それ以下の繊維を含む測定は、透過電子顕微鏡によるほうがよい。

(b)光学顕微鏡で検出できない細い繊維を含む計数 上記のように“長さ5 um以上、幅3 um未満で0.2 um以上の繊維”を“光学顕微鏡と同等サイズの繊維”として、それ以下のサイズの繊維を測定に含めて繊維数濃度を求める場合がある。その場合は、“長さ1um以上、幅3 um未満で0.01 um以上の繊維”のように、計数繊維のサイズ下限値を明示することが求められる。サイズ下限値を明示しないと、どこまで短い又は細い繊維を計数に含めたのか不明で、測定値の相互比較や特定のサイズの割合を求めたい場合などに、それができなくなる。

## (2) アスベストの同定(省略)

### (3) 観察条件

(a) SEM法で光学顕微鏡と同等の大きさの繊維を計数する場合 最近のSEMの加速電圧は、1 kV以下の低加速電圧から30 kV程度まで幅広く選択できるようになってきた。数キロボルト(kV)以下であると試料を無蒸着で観察できるようになるが、分解能がかなり落ちる。一般に、加速電圧が高くなるほど電子線束が細くなり分解能は向上し、より微細な試料まで観察できるようになる。しかし、SEMは二次電子又は反射電子を検出する構造のため、加速電圧の上昇とともに試料内部にまで電子線が進入する度合いが高くなり、試料の表面だけでなく内部からの二次電子又は反射電子を検出する割合が増加し、表面の微細構造の分解能は落ちる。通常のアスベスト計数では、EDS分析の都合も考え、20 kV程度が適当である。

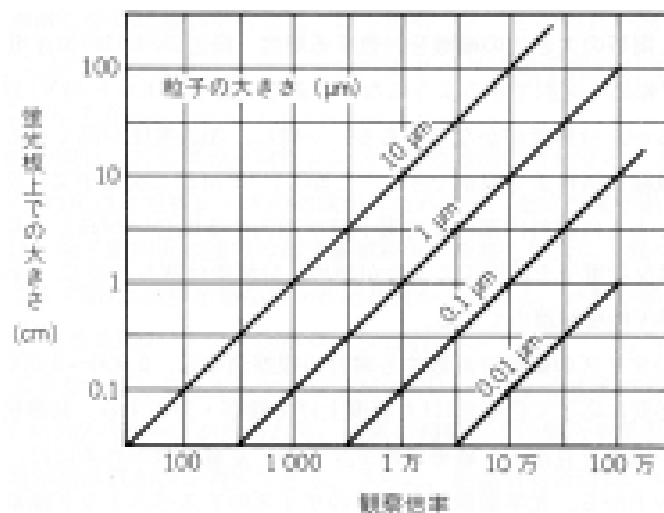
光学顕微鏡と同等のサイズの繊維を計数する場合の観察倍率は、2000～3000倍の比較的倍率で行う。EDS分析のときなどは、必要に応じて倍率を1桁程度上げて観察・分析する。観察倍率が高いほど微細な粒子まで観察できるので、細い繊維を見落とす確率は減少する。しかし、定量計数のためには、できるだけ広い試料面積を計数したほうが定量精度が上がる。光学顕微鏡と同等のサイズのアスベストなど繊維状粒子を計数する目的であれば、必要な倍率範囲のうちできるだけ低倍率で計数するのが有利である。一般にSEMのブラウン管を見ながらの計数では、2000～3000倍の倍率で行うのが適当である。したがって、SEMで0.1 um以下の幅の繊維状粒子を計数するのは、十分な時間をかけて観察すれば可能ではあるが、ルーチンワークとしてはかなり大変な作業である。

(b) TEMで光学顕微鏡と同等の大きさの繊維を計数する場合 TEMで繊維状粒子の計数を行うとき、加速電圧は100～200kVが適当である。一般に、同一の対物絞りを使用したTEMの場合、加速電圧の上昇に伴って像コントラストは低下する。加速電圧が高いほど電子線の試料透過能力は増すので、やや厚い試料も観察できるが、反対に像のコントラストが低下する。像コントラストの低下は、ある程度対物絞り

の穴径の小さいものを使用することで防げる。しかし、あまり小さい絞りを使うと視察視野がカットされるので、そうした対策にも限界がある。このような理由から、加速電圧は100～200kV程度が適当である。加速電圧と像コントラスト及び試料透過能の関係をよく理解して、コントラストの低い細い繊維も見落とすことのないように観察・計数することを心がけることが肝心である。

次に観察倍率であるが、まず表記の光学顕微鏡と同等のサイズの繊維を計数する場合は、1000～2000倍程度のできるだけ低倍率で行うと能率的である。TEMの1000～2000倍程度の像は、十分なコントラストをもっている。1000倍で視察したとき蛍光板上では、5 μmの長さの試料が5 mmの長さ、幅 0.2 μmの繊維は 0.2 mmの幅でそれぞれ見えることになり、ともにルーチンワークとして蛍光板上で十分観察できるサイズである。もちろん、これより高い倍率で計数を行うのもよいが、倍率が高いほど視野面積が小さくなるので、必要な観察視野面積を観察するのに労力がかかり厳しいルーチンワークになる。

(c) TEMで幅 3 μm未満で長さ 5 μm以下の繊維を含めて計数する場合 この場合は、どこまで細かい繊維を計数するかをまず明記しなくてはならない。観察倍率と蛍光板上での大きさの関係を、解説図33に示した。すなわち、仮に蛍光板上でルーチンワークとして像の存在を確認できるのが0.1 mmとすると、0.1 μmの大きさの試料が蛍光板上で0.1 mmに見える倍率は、10,000倍である。普通、クリソタイルの単繊維は0.02～0.04 μm程度である。その大きさを蛍光板上で直接観察するためには、数万倍以上の倍率が必要であることが解説図33からも分かる。1000～2000倍の倍率にして、蛍光板上の像を電子顕微鏡に附属しているルーペ(通常、10倍程度)を使用して観察する方法でも、これら0.02～0.04 μm径のクリソタイル単繊維の計数が可能である。いずれにしても、表記の細かい繊維を計数に含める場合は、どこまで細かい繊維を蛍光板上で観察できるかあらかじめ目安をつけてから、その必要な倍率以上で計数を行うことが重要な条件となる。



解説図33 観察倍率と蛍光板上での大きさの関係

#### (4) 計数視野数及び計数繊維数

ここでは、解説5.2.5 (定量下限値と標準誤差)についても、併せて解説する。

光学顕微鏡による繊維状粒子の測定法と同じく、電子顕微鏡によるアスベスト又は繊維状粒子の測定も、定法に従って作製した試料について測定者がアスベストを1本1本計数する方法である。

SEM法においては、計数視野の単位はCRTの1画面である。当然ながら観察倍率によってCRTの1画面に映し出される試料の面積は変わる。その画面上に映し出されたSEM画像を一定方向に次々に送りながら、各画面上に計数すべき繊維状粒子が何本あるか、あった場合は必要に応じて長さや幅のサイズ測定も行う。

TEM法では、計数視野の単位は、TEMメッシュの1網目である。一般に広く使用されているTEMメッシュは円形の網目であるが、この方法では、計数のしやすさのために網目が正方形のTEMメッシュを使用する。そのサイズは、100メッシュの場合225×225 μmで、200メッシュの場合100×100 μmである。SEM法で計数視野の単位としているCRT画面の試料上での面積は、倍率に連動して変わるが、TEM法においては、TEMメッシュの一定面積を計数視野とするので、計数視野の面積と試料上の面積は一致している。もちろん、一定面積の蛍光板上に投影される試料面積は、SEMと同様に観察倍率によって変わる。

SEM法もTEM法も定量計数のために試料の一定面積を観察・計数することは同じであるが、計数視野すなわち、計算の単位をSEM法の場合は拡大投影されたCRTの1画面に定めており、TEM法の場合は試料の一定面積にとるという便宜的な違いがあるだけである。したがって、この方法とは別に、SEM法で試料の一定面積をすべて計数したり、一定倍率のTEM法で蛍光板のある面積を計数単位として、それを何百、何千と計数する仕方も考えらえる。

本法では計数視野単位を上記のように取り決め、必要な計数視野数は、次の式によって決める。

$$n_E = A \times 1f / (a_E \times Q \times S)$$

ここに、 $n_E$  : 必要な計数網目数(又は計数CRT画面数)

1f : 計数繊維数Nとブランク値Nbの差が最低1本という意味で、本体の式(2)、式(3)、式(5)ではこの1fが省略されている。

A : フィルタ有効面積又はろ過面積(mm<sup>2</sup>)

$a_E$  : 1網目の面積又は1CRT画面の観察試料上での両横(mm<sup>2</sup>)

Q : 給吸引空気量(L)

S : 必要な定量下限値(f/L又はf/cm<sup>3</sup>)

例えば、有効フィルタ径36 mm(面積1000 mm<sup>2</sup>)上に空気吸引速度10L/分で1時間サンプリングした試料において定量下限値を10f/Lと設定した場合、必要な計数網目数は、 $A = 1000 \text{ mm}^2$ 、 $a_E = 100 \text{ μm} \times 100 \text{ μm} (= 1 \times 10^{-2} \text{ mm}^2)$ 、 $Q = 600 \text{ (L)}$ 、 $S = 10 \text{ (f/L)}$ であるから、 $n_E = 1000 \times 1f/L \times 10 \text{ (f/L)} \times 600 \text{ (L)} \times 10 \text{ (f/L)} = 16.7$ となる。つまり、17網目を計数する必要があることが計算から求められる。これは、17個の網目を数えた結果、総計1本の繊維が計数されれば、検出下限値は10f/Lという精度で計数したことを意味している。

この計数網目数と検出下限値の関係は、解説5・2・5(定量下限値と標準誤差)の項と同様である。また、式(3)と式(1)は基本的に同じ式である。解説参考図1に計算例があるように、計数網目数と定量下限値は逆相関しており、その定数はフィルタ有効径、1網目の面積、総吸引空気量に依存するもので、それらのある条件を決めれば一定となる値である。

いま、A、 $a_E$ 、 $n_E$  及び Qという条件で計数し、何本かの繊維を計数したとする。まず式(2)によって繊維数濃度が求められる。そのとき、その計数値はいかなる検出下限値をもつ値なのかは、式(3)によって求められる。

一方、ある検出下限値を確保して効率よく計数したいというとき、最低幾つの網目を計数したらよいかは、式(1)から求められる。このときの必要な計数網目数の計算は、その全網目数を計測した結果、総計1本の繊維が計数されたという仮定がある。したがって、もし総計10本計数されたなら(又は総計10本の計数が予測されるなら)、必要な計数網目数は1本のときの1/10でよいことになる。

#### (5) 繊維状粒子の数の判定

浮遊している繊維状粒子は、必ずしも理想的な1本の単繊維で浮遊しているものばかりではない。環境によっては、種々の変わった形態や繊維の集合状態で浮遊していることが多い。さらに、繊維以外の異物と共存していることもある。こうしたいろいろな状態で観察される繊維状粒子の数の判定、つまり、それらの粒子を何本の繊維として計数するかは、重要な問題である。この問題については、計数の目的によって判定基準を細かく決めるべきと考える。JIS K 3850-2、13では種々の粒子の形態を記載する方法が示されている。この解説では、基本的な(一般的な)判定基準を示すにとどめる。すなわち、光学顕微鏡法5.1.3(4)に示した基準と同様に行うという基本だけを示した。しかし、SEM法、TEM法では光学顕微鏡と同等の繊維を計数する場合のほかに、長さ5 μm以下の微小繊維も含めて計数する場合がある。その場合も、長さとの幅の比は3以上、幅は3 μm以下のものを繊維とする繊維の定義は同じである。また、その他の計数基準もほぼ同様に考え、本体の第1部図4を参考にして計数すればよい。

このような基本的判定基準とは別に、ある目的に沿った計数基準を設定する場合は、その基準を設けた理由も明らかにすることが必要である。