

2023/4/7

共焦点レーザー走査型顕微鏡 (LSCM) 簡易マニュアル

光電子分光分析研究室

連絡先 鈴木啓太 内線6882

吉田すずか 内線6882

装置利用のルール

以下の項目を必ず守って下さい

- 研究室内は土足厳禁、飲食厳禁です。ゴミはきちんと片づける
- 装置の故障、不具合を見つけたらすぐにスタッフに連絡する
- 装置を乱暴に扱わない
- 研究室の物を勝手に持ち出したり、無くしたりしない
- 貴重品の管理は各自でお願いします
- ステージの移動操作時、各装置のステージ位置稼働制限を守りましょう。動かし過ぎると故障します
- ソフトウェア、ハードウェア上のパラメータなどを変更した場合、装置使用後に必ず設定を元に戻す
- 分析装置PCに直接自分のUSBなど記録メディアを差し込まない。LSCM専用のUSBを利用し、解析用PCを経由してデータを取り出すこと(通常のUSBは認識しません)
- 基本的に試料はスライドガラス等に載せて観察して下さい。試料をステージにそのまま載せる場合は、使用後に洗浄すること
- 使用者が予約を取って、予約時間通り使用して下さい。予約時間からずれ込む場合は予約を事前に変更して下さい
- 深夜早朝祝休日に使用する場合、使用中のトラブルは全て貴研究室の責任で対応。また学生は、装置利用について自分の指導教官に知らせておく事。緊急連絡先は研究室入口ドアの横に記載してあります
- 初めて使う方は事前にスタッフに連絡を取って、講習を受けて下さい
- 大きすぎる試料、重すぎる試料を勝手にステージに載せない。心配な試料は事前にスタッフにご連絡下さい

装置使用の前に



使用記録簿に名前や開始時刻等を記入。使用後に終了時刻等を記入
予約時間とずれ込む場合は必ず先に予約を変更して下さい

LSCM使用記録簿



データについては各自で管理して下さい。装置PC・解析用PC内に置かれているデータの保障は致しません

LSCM専用USB & LSCM box



データの取り出しはLSCM専用USBを使い、装置PCからXPS・EDS解析用PCまたはLSCM・AFMデータ移動用PCに経由させてから各自の記録メディアに保存して下さい

XPS・EDS解析用PC



装置PCに各自のUSBを差し込む事は禁止です

LSCM・AFMデータ移動用PC

1. 試料の準備

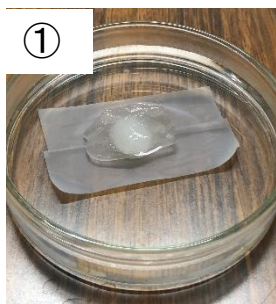


プラスチック粘土
ハンドプレス

試料表面が水平でない場合、プラスチック粘土を使って水平を出します

✓ 観察面以外にプラスチック粘土が触れても問題ない試料は、水平出しすることを推奨します

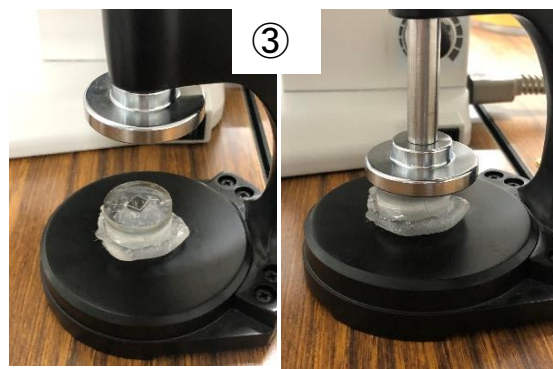
✓ 水平が出ていないと正確な測定が行えません



①



②

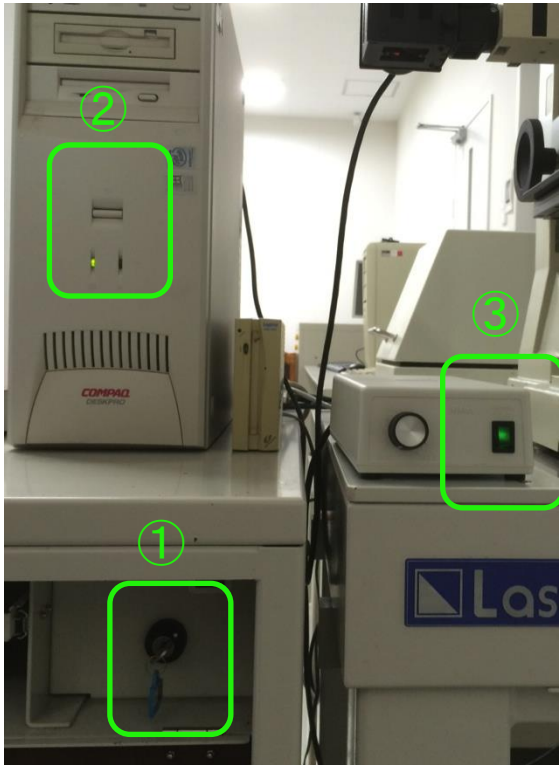


③

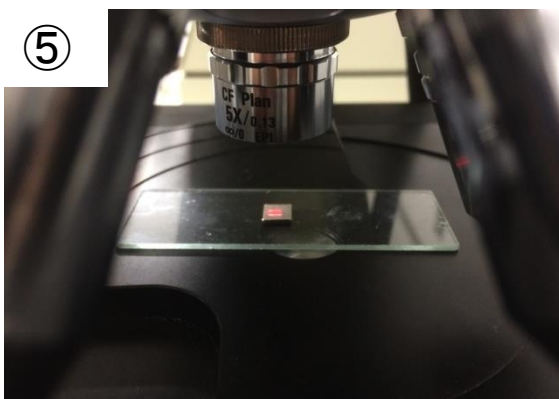
- ① ケースに入っているプラスチック粘土をニトフロンテープを貼ったガラスシャーレなどに入れて、熱湯に浸します(スタッフが用意します。ヤケドに注意)
- ② 熱で樹脂が半透明状になります。割りばしなどで樹脂をすくい上げ、水を切り、水平を取りやすい形状になるよう手でこねます(くっつきやすいので扱い注意。ニトフロンテープ上だとくっつきません)
- ③ 試料をプラスチック粘土に置いてハンドプレスで押し込みます。粘土に埋め込まれ、おおよそ水平が出ていることを確認します

試料のサイズや固定法について疑問があればスタッフにご相談下さい

2. 装置の起動、観察準備



- ① 鍵を回してレーザー顕微鏡の電源を入れます
- ② PCの電源を入れます
- ③ レーザー顕微鏡の観察用ライトの電源を入れます
(直接観察する場合)
- ④ レーザー顕微鏡のカバーを外します



- ⑤ ステージ上に準備した試料をセットし、レボルバーを回して観察したい接眼レンズの倍率へと変更します

接眼レンズと試料は非常に衝突しやすいので、特に注意して下さい。不安な時は一度Z軸を下げること

3. 観察・撮影

◆直接観察



直接観察を行う場合は対物レンズの上にある二つのノブを入れた状態にして、レーザー光から観察用ライトに切り替えます



←レーザー光を使う場合



接眼レンズのカバーを無くさないように



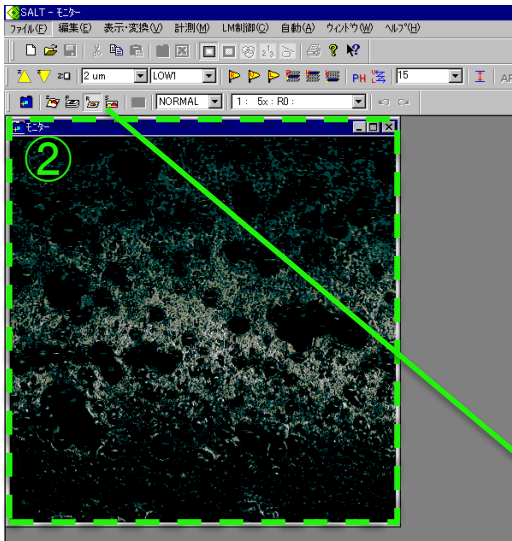
大きな試料を扱う場合は顕微鏡後方にある顕微鏡鏡基Z軸を調整して接眼レンズとステージの距離を広げられます

3. 観察・撮影

◆ピント合わせ



- ① PCが起動したら、デスクトップ上の「SALT V4.0」を起動します(観察・解析アプリケーション)



- ② SALTが起動すると「モニター」ウィンドウが表示され、リアルタイムの顕微鏡の像が表示されます

✓最初はピントが合っていないため画面は真っ黒です

✓ツールバーのRが選択された状態になっているか確認して下さい



③ Z軸ダイヤル

- ③ Z軸ダイヤル(大きく動く)と、Z軸コントローラ(小さく動く)を使用し、ピントを合わせる(明るくなる=ピントが合う)

✓試料との衝突を防ぐため、必ず目視で試料と対物レンズを最接近させ、ステージを下げながらピントを合わせる

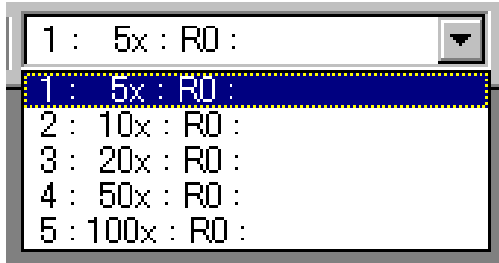
✓特にZ軸ダイヤルは大きく動くため注意して下さい



③ Z軸コントローラー

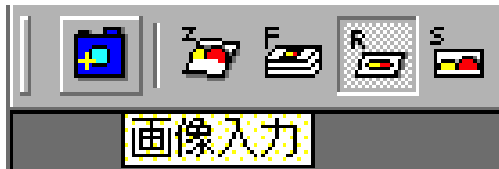
3. 観察・撮影


◆スケール表示

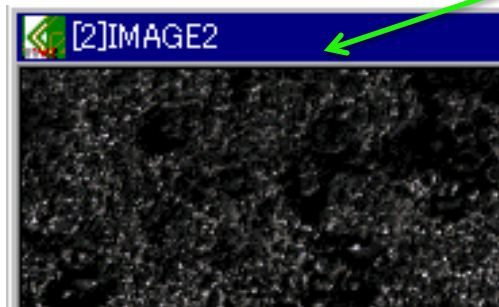


① 現在の対物レンズを選択

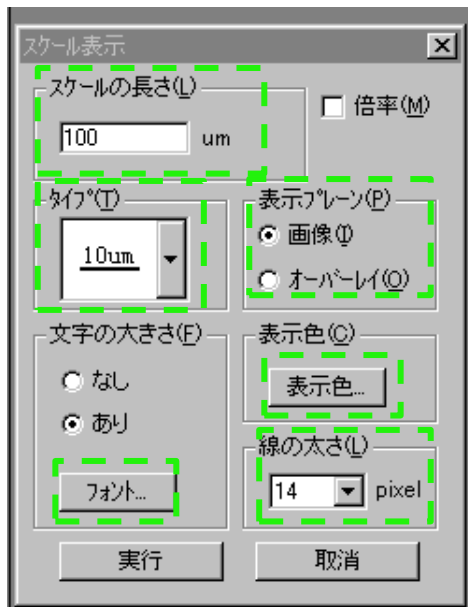
✓スケールの大きさに影響するため、必ず確認して下さい



②  画像入力アイコンをクリックして、IMAGEウィンドウを開く



③ IMAGEウィンドウを選択した状態で、メニューの「表示・変換」→「スケール表示」をクリックすると、ウィンドウが出ます



④ スケール長さ、タイプ、表示プレーン、フォント、表示色、線の太さを調整して、「実行」でスケールが表示されます

✓スケールの位置は、実行前にドラッグで動かします。↓の点線部分




3. 試料の観察・撮影

◆画像の保存



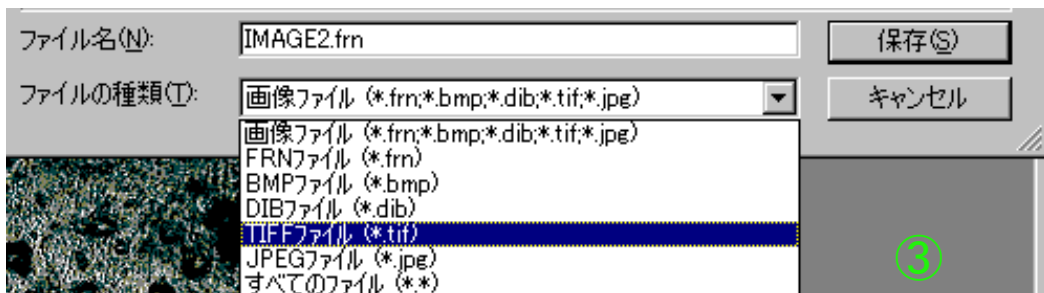
① 対象のIMAGEウィンドウを選択した状態にします

②  アイコンをクリックして、名前を付けて保存する

③ 保存前に、ファイルの種類を「TIFFファイル」に変更し、保存ボタンを押して任意のフォルダへと保存する

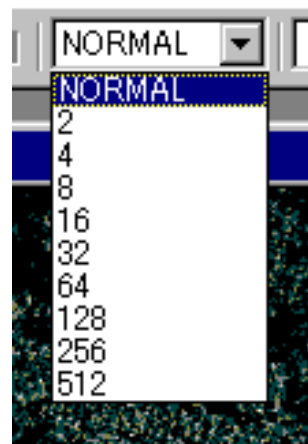
✓ tiff形式で保存しておく、後でアプリケーションを用いた画像の解析が可能になり、更に他のPCでは画像として開くことができます

✓ 用途に応じて任意のファイル形式を自由に選択して下さい



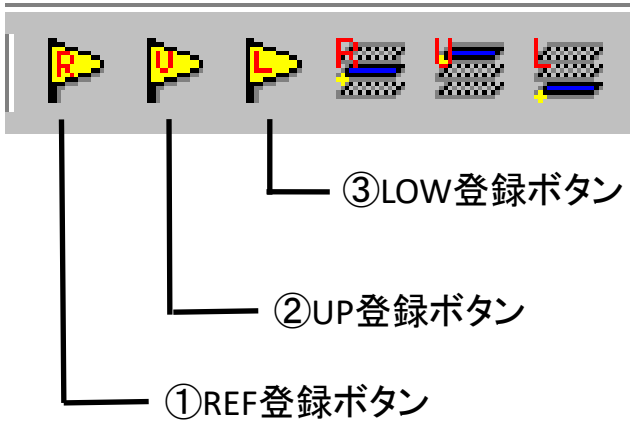
◆スキャンレートを大きくする

サンプルの反射が低く、像が暗い・不鮮明である時はスキャンレートを変更してみてください。2にすると感度がNORMAL時の2倍になります



3. 試料の観察・撮影

◆2次元Z画像、FSM画像の入力①



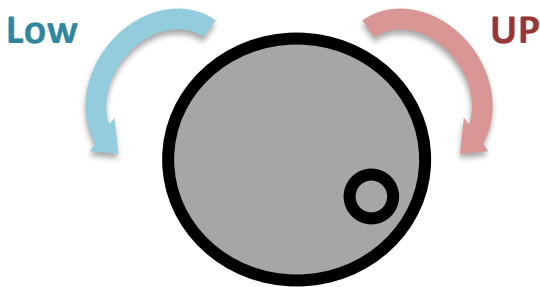
① モニターにリアル画像が表示された状態で、ピントが中心に合っている場所でREFを登録します

② Z軸コントローラーでステージを上昇させ、ピントが合わなくなる境目の位置でUPを登録します

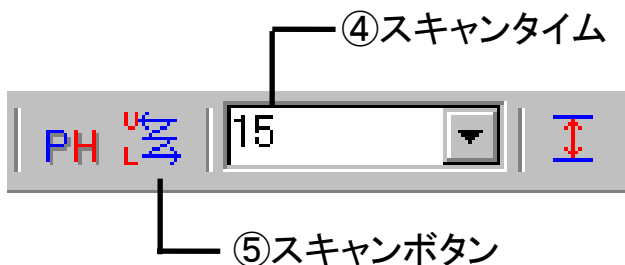
③ Z軸コントローラーでステージを下降させ、ピントが合わなくなる境目の位置でLOWを登録します

④ スキャンタイムを設定します。凹凸が大きいサンプルは大き目に設定

⑤ スキャンボタンをクリックすると、スキャンがスタートし、サンプルの全面に焦点のあった画像が取得されます

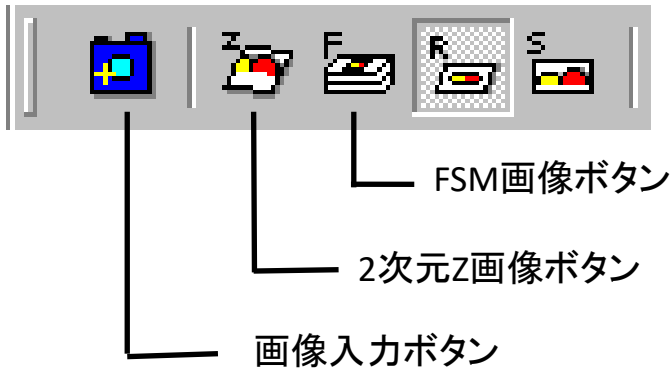


Z軸コントローラー



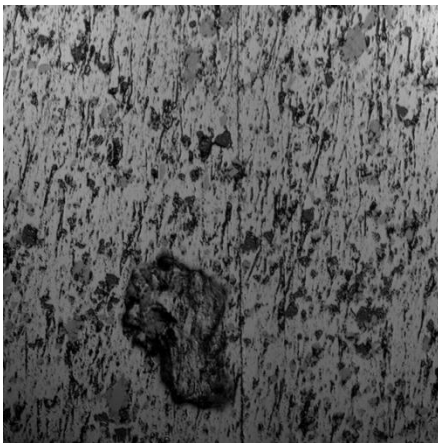
3. 試料の観察・撮影

◆2次元Z画像、FSM画像の入力②

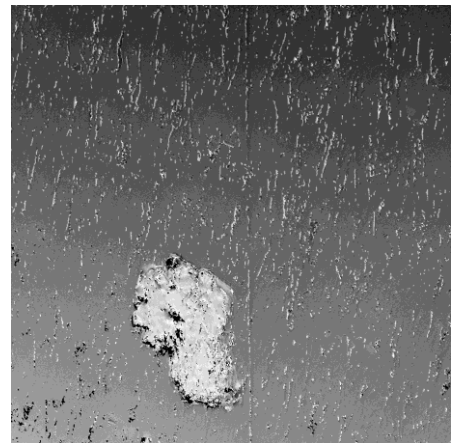


- ① 取込みたい方のボタンを押し、FSM画像or2次元Z画像を表示させる
- ② P8と同様にして画像を保存する

FSM画像



2次元Z画像



◆リアルタイム画像

サンプルの焦点があった場所だけが表示される。レーザーの焦点合わせやFSM, 2次元Z画像のZ軸方向のスキャン移動範囲を決める時に用いる基本的な画像

◆FSM画像(焦点移動メモリ画像: Focus Scan Memory画像)

サンプルをZ軸方向へ移動させながら、各画素の最大となる輝度だけ記憶し、それらを重ねあわせた画像。サンプルに凹凸があるとFSM画像の場合、サンプル全面に焦点が合うため、鮮明な観察像が得られる。幅・ピッチ計測に適する

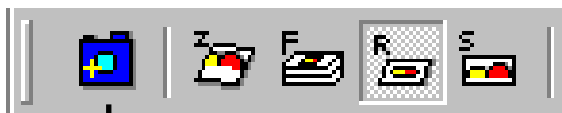
◆2次元Z画像(二次元表面形状画像)

サンプルをZ軸方向に移動させながら得たサンプルの高さ情報をコントラストで表した画像。高度差、表面粗さなどを計測する際に使用する

4. 画像解析

◆水平補正

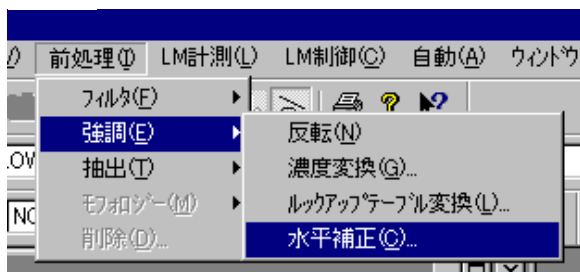
①



画像入力ボタン

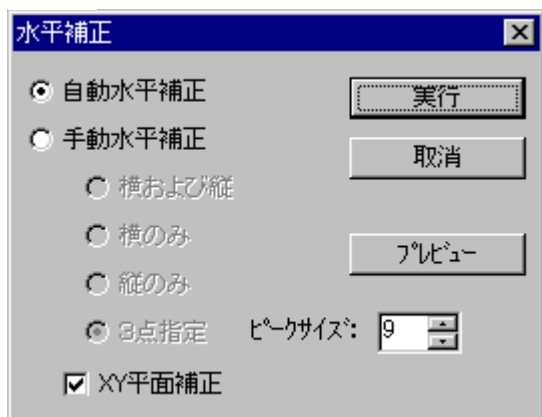
① FSM画像or2次元Z画像を選択後、
画像入力アイコンをクリックして、
IMAGEウィンドウを開く

②



② IMAGEウィンドウを選択した状態で、
タブの「前処理」→「強調」→「水平補
正」をクリックすると、ウィンドウが出
ます

③



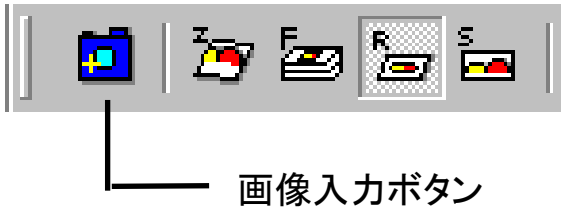
③ 「自動水平補正」をオンにし、「実行」
をクリックしてしばらく待つと自動的
に水平が補正されます

✓3次元表示、高度差測定、表面粗さ
測定等のZ軸方向の情報が重要となる
解析をする前には、水平補正をかけて
おくことを推奨します

4. 画像解析

◆平均化

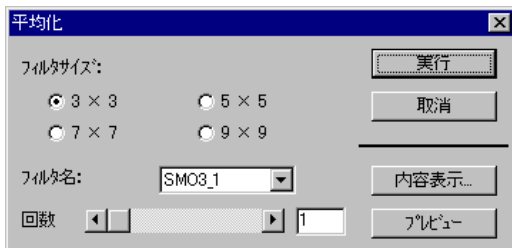
①



画像入力ボタン

① FSM画像or2次元Z画像を選択後、画像入力アイコンをクリックして、IMAGEウィンドウを開く

③平均化ウィンドウ



② IMAGEウィンドウを選択した状態で、タブの「前処理」→「フィルタ」→「平均化」or「ソート」をクリックすると、ウィンドウが出ます

ソートウィンドウ



③ 任意のフィルタサイズ、回数を指定した後、「実行」をクリックしてしばらく待つと自動的に画像処理されます

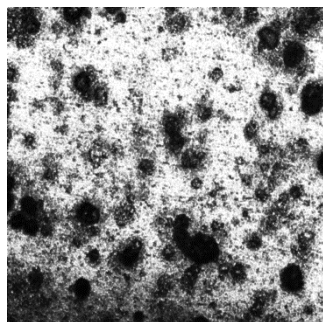
◆平均化: 平均化は画像をぼけさせる効果があるため、グレースケールで緩やかな濃度分配がある画像等に用います。その反面、シャープな画像は劣化します。フィルタサイズが大きいほど、回数が多いほどぼけが大きくなります

◆ソート: ソートフィルタとはフィルタ内の照度値を昇順に並び替え、指定した何番目かの値を出力するものです。出力順位が小さいほど暗い部分が強調され、大きいほど明るい部分が強調された画像となります

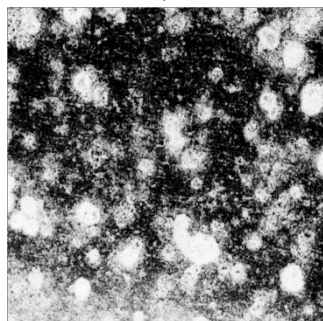
4. 画像解析

◆反転

反転前



反転後



① FSM画像or2次元Z画像を選択後、画像入力アイコンをクリックして、IMAGEウィンドウを開く

② IMAGEウィンドウを選択した状態で、タブの「前処理」→「強調」→「反転」をクリックすると画像が反転されます

✓ 二値化して面積を測定したい時に、測定したい部分の面積が測定出来ない場合、予め反転しておく必要があります

◆濃度変換

② ‘

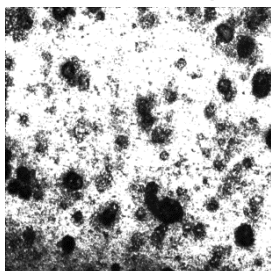


② ‘ IMAGEウィンドウを選択した状態で、タブの「前処理」→「強調」→「濃度変換」をクリックするとウィンドウが出ます

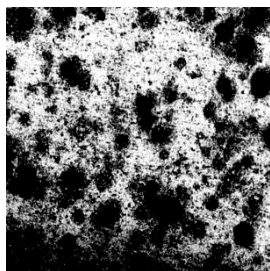
③ ‘ 入力範囲、出力範囲を任意の値に調節して「実行」をクリックすると変換されます

✓ 主に濃度変換はコントラストを上げたい時に使用します

コントラスト低



コントラスト高



4. 画像解析

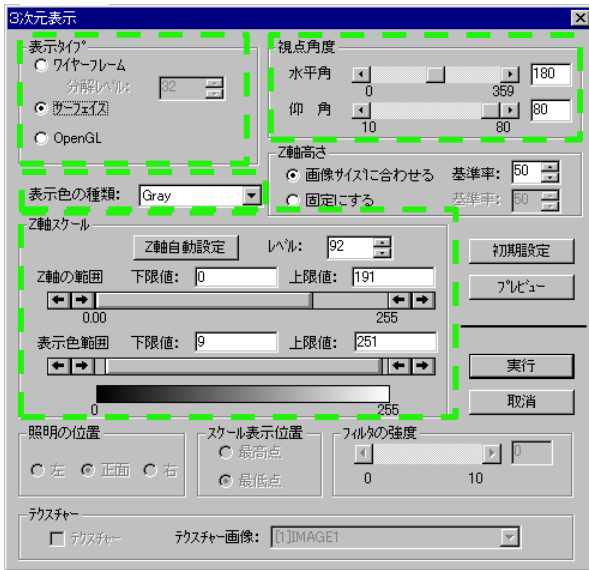
◆3次元表示

①



- ① 画像入力アイコンをクリックして、IMAGEウィンドウを開く

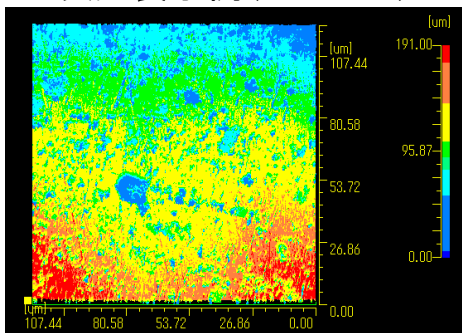
③



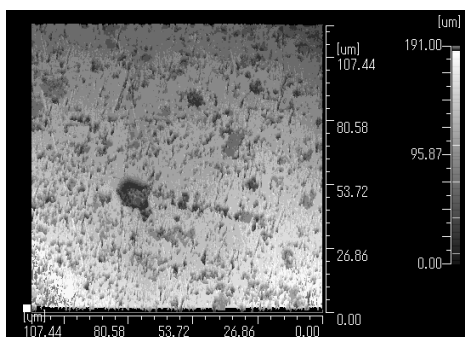
- ② IMAGEウィンドウを選択した状態で、タブの「表示・変換」→「3次元表示」をクリックすると、ウィンドウが出ます

- ③ 表示タイプ、視野角度、表示色の種類、Z軸スケールを調整し、「実行」で3次元画像が表示

3次元表示例 (Rainbow)



3次元表示例 (Gray scale)



- ④ 3次元画像のウィンドウを選択した状態で「ctrl+C」もしくは、タブの「編集→コピー」やスクリーンショットでコピーしてから、ペイントソフトに貼り付けて保存して下さい

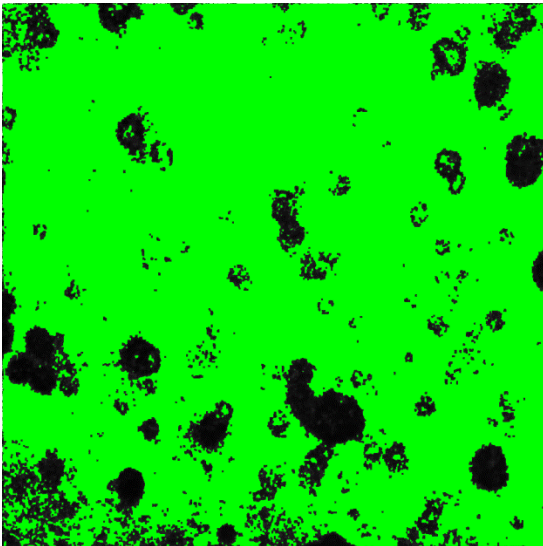
4. 画像解析

◆2値化

②



②



- ① FSM画像or2次元Z画像を選択後、画像入力アイコンをクリックして、IMAGEウィンドウを開く
- ② IMAGEウィンドウを選択した状態で、タブの「前処理」→「抽出」→「単一しきい値による2値化」をクリックするとウィンドウが出ます
- ③ ウィンドウのしきい値のバーを左右にスライドさせると2値化の面積が変わります。任意の場所に設定後、「実行」して下さい

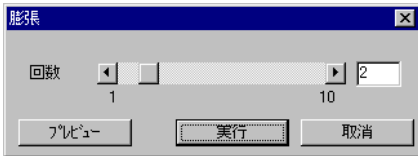
◆2値化とは

濃淡画像に対してしきい値を設定し、各点の濃度値がしきい値以上であれば領域とみなし、それ以外であれば背景とみなします。孔などのコントラストが高い部分の面積の導出に用いられます。暗い領域を抽出する時は反転してから実行します

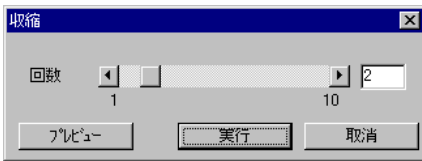
4. 画像解析

◆2値化画像の処理

③ 膨張ウィンドウ



縮小ウィンドウ



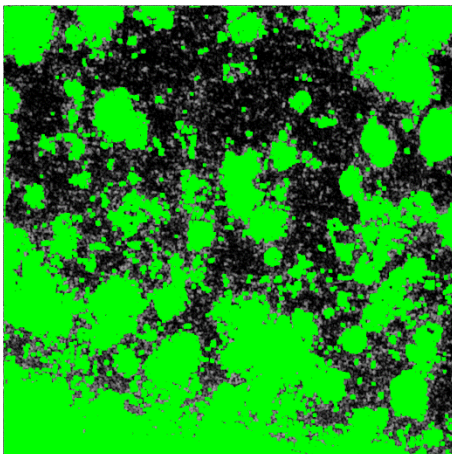
- ① 2値化したIMAGEウィンドウをアクティブな状態にしておく
- ② タブの「前処理」→「モルフォロジー」→「膨張」or「縮小」をクリックするとウィンドウが出ます
- ③ ウィンドウの回数を任意の値にスライドさせ、「実行」して下さい

◆膨張：領域を太らせます。対象の領域の途切れている部分を補完する形でを円に近い状態にします

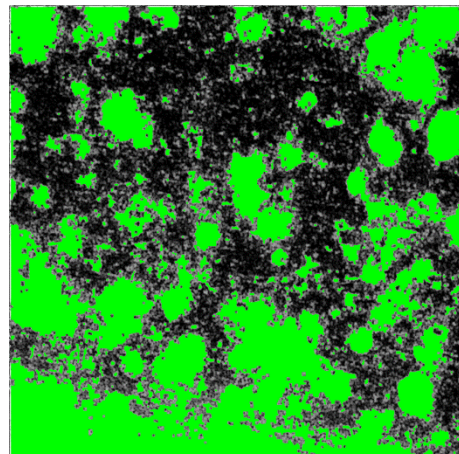
◆縮小：領域を細らせます。縮小処理により突起部分を取り除くことが出来ます

2値化した画像の対象の面積を測定する場合、膨張と縮小を1回ずつ行うと良いでしょう

膨張後画像



膨張→縮小後画像



5. 計測

◆高度差測定

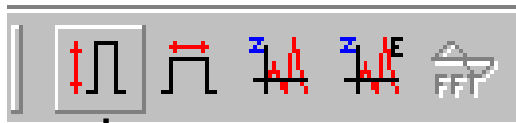
①



画像入力ボタン

① 画像入力アイコンをクリックして、IMAGEウィンドウを開く

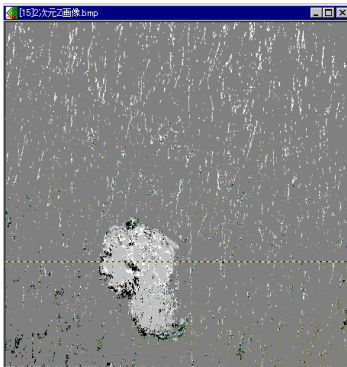
②



高度差ボタン

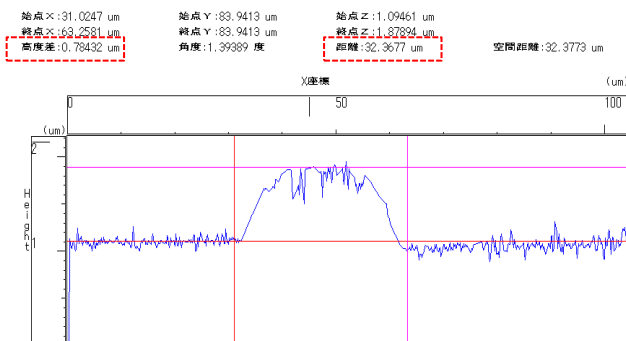
② IMAGEウィンドウを選択して高度差ボタンをクリックすると、ウィンドウが出るので、そのまま「実行」で高度差ウィンドウが開きます

③



③ IMAGEウィンドウ上に表示された黄色い破線を測定したい位置にドラッグして移動します

④



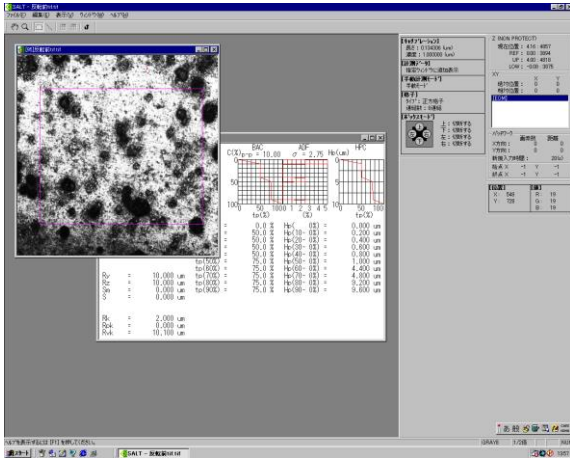
④ 高度差ウィンドウにある赤とピンクの上下、左右の線をドラッグして任意の位置に移動します。画面上の「高度差」と「距離」に赤とピンクの線の間隔が表示されます

⑤ 高度差ウィンドウの画像は、3次元画像と同様の方法でペイントに貼り付けて保存して下さい

5. 計測

◆表面粗さ測定①

③

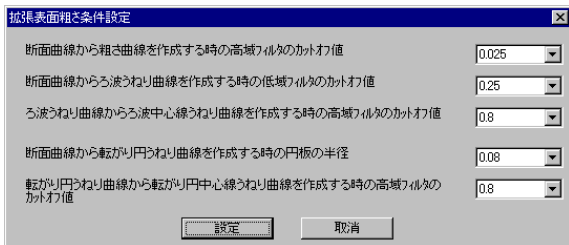


① FSM画像or2次元Z画像を選択後、画像入力アイコンをクリックして、IMAGE ウィンドウを開く

② 「平均化」及び「水平補正」を行う

③ タブの「LM計測」→「拡張表面粗さ」をクリックすると、画面が拡張表面粗さウィンドウに切り替わります

④



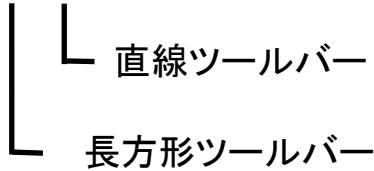
④ タブの「編集」→「条件設定」を開き、各欄のカットオフ値等を選び、「設定」します

◆曲線名とカットオフ値

断面曲線は低周波成分と高周波成分を含んだ曲線ですが、この曲線から高周波成分だけを抽出したものを粗さ曲線と呼びます。低周波成分だけを抽出したものは波うねり曲線と呼びます。これらを作成する時に、断面曲線からどの程度の波長をカットオフするかを設定するのがカットオフ値です(単位はmm)

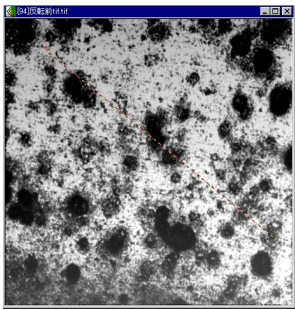
5. 計測

◆表面粗さ測定②

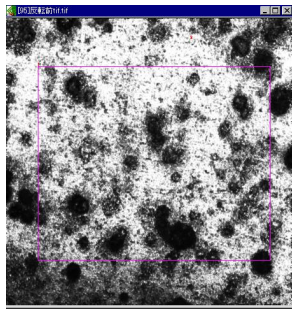


⑤ 粗さツールバーから直線ツールバー or 長方形ツールバーを選択し、測定したい範囲をドラッグします

⑥範囲指定例



直線

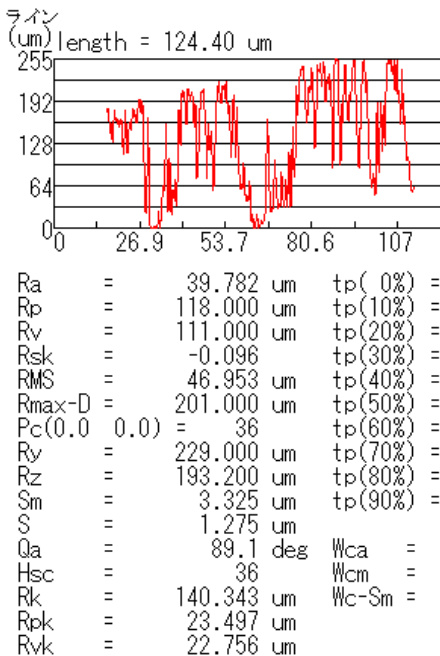


長方形

⑥ ドラッグすると、その範囲の測定結果がウィンドウで表示されます

⑦ 測定データはデータ形式で出力出来ません。これまで同様にペイントに画像を貼り付けて記録して下さい

⑥測定結果例(直線)



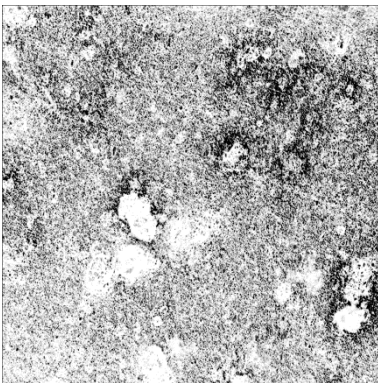
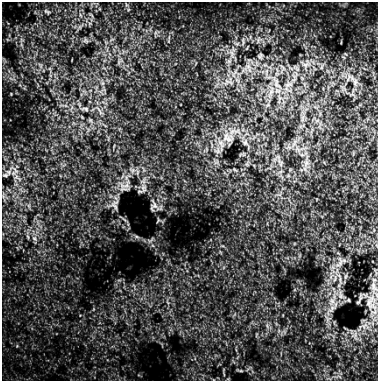
- ◆算術平均粗さ(Ra): 粗さ局面から測定範囲だけ抜き取り、この平均から測定した高度差の平均を表す
- ◆最大粗さ(Ry): 高度差の最大値を最大高さとする
- ◆凹凸の平均間隔(Sm): 粗さ局面から測定範囲のX方向に1ラインだけを抜き取り、山から谷と成る点を変化点として、その平均間隔を求めたもの

結果ウィンドウをアクティブにして、「表示」→「曲線の種類」で表示される曲線の種類を変更できます

5. 計測

◆粒子や孔の個数・面積①

③



① FSM画像or2次元Z画像を選択後、画像入力アイコンをクリックして、IMAGEウィンドウを開き、全体を選択する

② 「平均化」を行う

✓計測対象と背景のコントラスト差が小さい場合、「濃度変換」を行っておく

③ 粒子や孔が背景に対して黒色である場合、反転させる

✓測定したい部分を背景に対して白くさせる必要が有るためです

④ 対象物に緑色の領域が重なるように適切にしきい値を設定し、「単一しきい値による2値化」を実行します

⑤ 「膨張」と「縮小」を1回ずつ行う

⑥

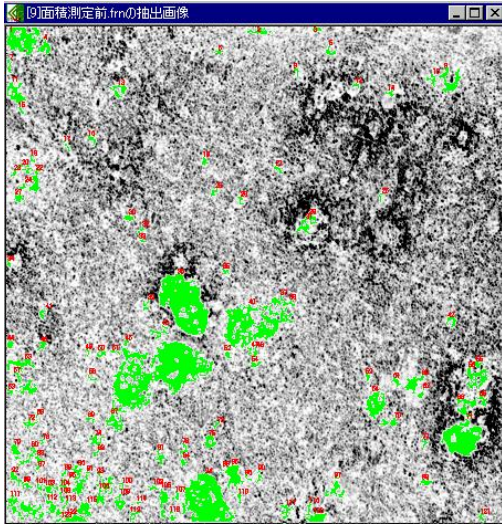


⑥ タブの「前処理」→「削除」を選択し、削除ウィンドウで「第一項目」の欄を「面積」、しきい値を「10」「以下」にして、「第二項目」の欄を「絶対最大値」、「しきい値」を「4」、「以下」にして実行します

5. 計測

◆粒子や孔の個数・面積②

⑨-1



⑦ タブの「LM計測」→「形状特徴」を選択

⑧ 「形状特徴」のウィンドウが表示されるので、測定項目リストの中から「面積」、「個数」、「絶対最大長」、「周囲長」にチェックを入れる

⑨ 計測を実行すると、新規ウィンドウが開き、10-1のような対象物の個数表示と10-2のような計測結果が表示されます

⑨-2

項目 番号	1 番号	2 面積	3 周囲長	4 絶対最大長
113	113.000000	4.173017	12.252922	5.749719
114	114.000000	3.733752	12.897422	5.076637
115	115.000000	27.673694	28.527661	8.668703
最小値	1.000000	2.123114	8.033426	4.004236
最大値	123.000000	696.015367	355.564781	54.764873
合計値	7626.000000	3598.53196	3662.34309	1022.64346
平均値	62.000000	29.256357	29.775147	8.314174
標準偏差	35.651087	83.468532	38.862172	6.825265
単位:um				

✓面積の合計値や平均、最大、最小が表示されるので、画像としてペイントに貼り付けるか、ファイル保存の際に「〇〇.txt」と拡張子を入力して保存して下さい

6. 終了方法

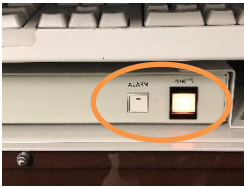
- ① 観察・解析ソフト SALT V4.0を終了させる
- ② 測定したデータをLSCM専用USBに移し、SEM・XPS解析用PCまたはLSCM・AFMデータ移動用PCを経由してデータを自分のUSBに移す
- ③ 利用したPCの電源を切る
- ④ 顕微鏡のステージ上から試料台を下し、レボルバーを回して対物レンズを最も低い倍率に戻す
- ⑤ レーザー顕微鏡で直接観察した場合は光源の電源を切る
- ⑥ 顕微鏡にカバーをかける
- ⑦ スライドガラスから試料を取り出し、粘土をケースに戻し、スライドガラスをエタノールで洗淨する
- ⑧ キー付きのメイン電源を落とす

7. Q&A

Q. ステージコントローラーを回してもZステージが動かない、またはZステージが回した方向と逆の方に動く

A. コントローラーで移動出来る限界に達しています。動かなくなった方向と逆の方向に大きく(1mm程度)Zを動かし、そこで試料にピントが合うように装置本体のZ軸ダイヤルを調整して下さい。それからRef登録などを進めて下さい。

Q. ステージコントローラーを回してもやっぱりZステージが動かない。逆に回しても全く動かない



A. テーブルのキーボード下にあるユニットのPOWERランプを確認して下さい。消えていたらランプを付けて下さい。またALARMボタンが点灯していればALARMボタンを押して消灯して下さい。それでも移動しない場合、PCの再起動、本体主電源を入れ直して下さい。

Q. 測定した形状像の結果がおかしい。上手く測定出来ていない

A. LSCMはレーザーの反射光の輝度の変化で高さを評価しています。光を反射しにくい表面だった場合や逆に反射し過ぎる表面の場合、スキャンレートやゲインの調整を行って、どの高さでも明るさや暗さがサチらないようにして下さい。また、視野内に全く反射率が違うものが混ざっていて、上手く明るさの調整が付けられない、という場合、試料表面を何かでコートして色味を合わせるという手もあります。AuやCのスパッタリングが有効です。また、凹凸のサイズに合わせた対物レンズの設定やステージのスキャン範囲の設定が重要です。凹凸が小さいものはなるべく高倍率で、スキャン範囲は必要十分に留めて下さい。