

液中材料のサイズ分布を精確に測る

— 新規ナノ材料の開発やナノ材料規制対応に役立つ粒子計測技術 —

加藤 晴久^{1*}、中村 文子¹、衣笠 晋一¹、藤本 俊幸²

液中分散材料のサイズ分布を精確に計測する技術として、流動場分離法 (FFF) を利用したサイズ分布計測法を確立した。この計測法の開発は2010年初頭に開始されたナノ材料規制に端を発したサイズ分布計測ニーズに基づいたものである。また、この開発では計測手法の開発のみならず、開発した手法をユーザーが安心して利用するために、FFFに関連する標準化 (ユーザーの計測精度確認を実施するための認証標準物質開発、計測手順を確認するための国際標準文書策定) と国内ユーザーのための国産FFF装置開発を並行して実施した。この論文ではこの開発の経緯・進め方や開発シナリオ達成に係る要点を述べる。

キーワード: 流動場分離法、サイズ分布、認証標準物質、標準化、TS21362

Accurate determination of size distribution of materials in liquid phase

—For supplying effective characterization technique on development of novel nanomaterial and regulation—

KATO Haruhisa^{1*}, NAKAMURA Ayako¹, KINUGASA Shinichi¹, FUJIMOTO Toshiyuki²

Accurate determination method of size distribution of materials in liquid phase using field-flow fractionation was developed. The nanomaterial regulation started from early 2010 was the significant motivation for this development. In this development, not only development of a novel characterization method, but also related standardization such as certified reference materials and international standardization documents had been implemented. Furthermore, a domestic FFF instrument was also produced. In this manuscript, historical background of this development and the significant points of the process of this achievement were described.

Keywords: Field-flow fractionation, size distribution, certified reference material, standardization, TS21362

1 はじめに: 液中サイズ分布計測のニーズ

現在さまざまな部材・バイオ分野に適用されているナノテクノロジーは、2000年に当時アメリカ大統領であったビル・クリントンがナノテクノロジー・イニシアティブに係る国家戦略を宣言したことにより急速に発展したと言われている。マイクロメートルの1000分の1のサイズ領域において精確なサイズ制御に基づく材料を開発することにより、今まで実現されることのなかった新規製品が世に出ることとなった。例えば、粒子サイズが異なることによって発光色が異なることを利用した環境に安全な単一物質による3原色を発光させたナノ粒子配列型薄型平面ディスプレイの開発^[1]等が挙げられる。

ナノテクノロジー産業界では1~100 nmのサイズ領域の材料を特にナノ材料として定義する^[2]。100 nmを1つのサ

イズ区分としている理由は、当サイズ領域を境として新たな特性が発現されるからとされており、例えば顔料特性である着色力、隠ぺい力は材料のサイズに依存し100 nm以下で大きく変化する^{[3][4]}、磁性粉体が100 nm付近の粒径を境に多磁区材料から単磁区材料になる^[5]、等、精確なサイズ制御に伴う新規機能材料開発はサイズに依存した電子状態や表面・界面に露出する原子の割合制御に繋がり、上記宣言から20年経過した現在においても活発に開発が進められている^{[6]-[11]}。

さて、このような精確なサイズ制御が鍵となるナノテクノロジー産業において、最も重要な基幹技術の1つはサイズ計測技術となる。サイズが鍵であるナノテクノロジー業界において、製作された材料が実際にどのようなサイズであるかわからなければ、さらなる材料開発に繋がらないこと

1 産業技術総合研究所 計量標準総合センター 物質計測標準研究部門 〒305-8565 つくば市東 1-1-1 中央第5、2 産業技術総合研究所 計量標準総合センター 研究戦略部 〒305-8563 つくば市梅園 1-1-1 中央第3

1 Research Institute for Material and Chemical Measurement, AIST Tsukuba Central 5, 1-1-1 Higashi, Tsukuba 305-8565, Japan

* E-mail: h-kato@aist.go.jp, 2 Research Promotion Division of National Metrology Institute of Japan, AIST Tsukuba Central 3, 1-1-1 Umezono, Tsukuba 305-8563, Japan

Original manuscript received October 1, 2020, Revisions received September 3, 2021, Accepted November 10, 2021

は自明である。このようなニーズに基づき、電子顕微鏡や原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscope：AFM）等の目的対象を常圧下で実観測する技術は非常に重要であり、実際ナノテクノロジー産業界にとってはなくてはならない計測法である。その結果、AFM 計測に代表される、ナノオーダーでサイズのみならず物質表面構造を見ることが可能になるという高い空間分解能計測の実現は、近年のナノ材料開発に大きな貢献を果たしたと言える。さらに近年では電子顕微鏡法も低真空下にて観測することが可能となっており、その適用範囲が広がっている。一方、顕微鏡法はいまだ高分解能にて液中に存在するナノ材料のありのまま観察 (*in situ* 観察) を実施することはできない。また、材料はデルタ関数的なある1つのサイズのみを有するわけではなく、必ずサイズ分布を有することから、その測定時間の関係から、広いサイズ分布を有する材料のほんの一面しか見ることができない顕微鏡法ではサイズに係る真の平均情報（サイズ分布情報）を得ているとは言い難いのが実情である。図1 (a) と (b) は分布の狭い70 nm と180 nm の2つの異なるサイズをもつ粒子の混合試料における走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope：SEM）画像の例である。図中に示されるように左図では大きな粒子が多い一方、右図では小さい粒子数が圧倒的に多いことがわかる。このように顕微鏡法は材料を実際に画像として見るができる一方、代表性の高いサイズ分布情報を取り出すには非常に労力が必要であることは予想できであろう。また、電子線・電子レンズを用いる手法は、有機物のように電子線により物質が破壊される可能性があるため、非破壊の計測法とは言えない欠点を有する。さらに液中分散試料を顕微鏡観察用試料として乾燥させる際に凝集が生じる等、液分散から乾燥させることによる状態変化に関する懸念もある（一部超低真空下での未乾燥状態で計測可能な電子顕微鏡評価^[12]についてはここでは鑑みない）。このように顕微鏡法は直観測できるという意味で非常

に有効なサイズ計測法であるが、液中材料計測には上記不便性をもつ。

一方、一般に使用されているナノ材料は塗料や体質顔料の代表であるシーリング材、食品、化粧品等の液中にナノ材料が分散された製品として実用化されていることが多く、液中における精度の高いサイズ分布計測技術は必須とされていた。このような背景から、我々は液中において精確にサイズ分布の計測を可能とする技術として、特に流動場分離法（後述にてその技術詳細を説明する）に着目し、その実用化を踏まえた技術の高度化・多様化・製品化・標準化展開を観点とした多方面並行的な研究開発を実施した。そこでこの論文では研究開発の経緯ならびに研究開発当初の問題点と、その解決に向けた研究開発戦略とその実施内容・シナリオの進め方について構成学の視点から整理することとする。

2 問題だらけであった2010年初頭における液中サイズ分布評価技術とその転機

2010年初頭において液中ナノ材料の平均サイズならびにサイズ分布計測法として最も利用されていたのは、光散乱法やレーザー回折法のような、液中に分散された材料からの散乱光の揺らぎ・回折光の回折パターンからアンサンプル平均的なサイズ計測を実施する方法であった。その利用の簡便さから、現在においてもこれらの測定法は多く利用されているものの、サイズ分布の広い材料の計測を行うと、装置や解析法により算出される平均サイズ・サイズ分布が大きく変化してしまうことは利用者のほとんどは皆暗黙で理解していた。以下にその事例を示す。

図2は図1においても使用された70 nm（分布の狭い小さいサイズの粒子）と180 nm（分布の狭い大きいサイズの粒子）の粒子混合試料において、動的光散乱（Dynamic Light Scattering：DLS）測定ならびにレーザー回折散乱（Laser Diffraction scattering：LD）測定を実施した結

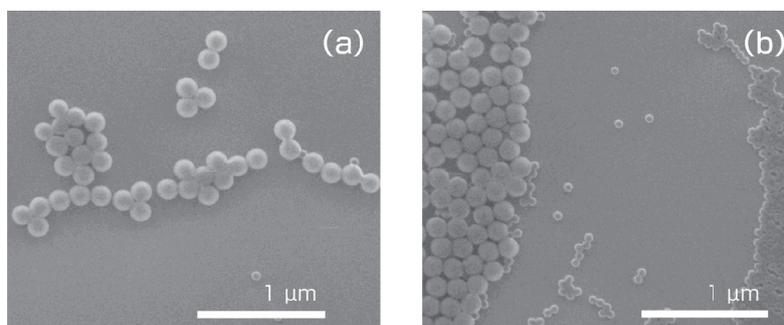


図1 70 nm（分布の狭い小さいサイズの粒子）と180 nm（分布の狭い大きいサイズ粒子）の粒子混合試料におけるSEM観測結果。図1 (a) と図1 (b) は全く同じ試料を測定した異なる視野画像。

果である。図 2 (a) の DLS 測定結果からは 70 nm の粒子の存在は観測されていないことが見て取れる。一方、図 2 (b) の LD 測定からは、70 nm と 180 nm の二峰性のサイズ分布が全く評価されていないことがわかる。このような結果が得られた原因は、それぞれの計測法そのものが有する原理的な問題である。DLS 法はある 1 つの散乱角において粒子からの光散乱とその散乱光の干渉減衰を読み取り評価する方法であるが、結果として通常小さい粒子の散乱は大きい粒子の散乱にかき消されてしまい、大きい粒子しか観測することができない（例としてレーリー散乱領域での粒子の散乱強度はそのサイズの 6 乗に比例する）。一方、LD 法はさまざまな角度における粒子からの散乱を計測するため、ある程度サイズ分布をもつ粒子の評価が可能であるものの、解析アルゴリズムの限界から、サイズ分布分解能が非常に低く、図 2 (b) に示されるように本来二峰分布である試料においても広い単峰分布試料であると評価されてしまうこととなる。このように現在においても液中材料の計測法として頻繁に利用されている 2 つの計測法はそのサイズ分布に係る計測精度について重大な問題を抱えていた。一方で先にも述べたようにこれらの計測法は短時間で計測ができ、利用も簡便であることから、ナノテクノロジー産業界では広く利用されていた。

このように、実際に定性的なサイズ分布計測が主に実施されてきた状況の中、大きな転機が訪れた。2011 年において欧州議会 (European Commission: EC) より発表されたナノ材料規制に用いるナノ材料の定義の宣言である^[13]。2000 年後半より、ナノ材料は必ずしも印象のよい製品を供するイメージだけではなく、そのサイズの小ささ故に人体に容易に侵入し、体に害をなすのではないかという懸念が欧州を中心に広がっていた。結果として、ナノ材料の毒性評価に係る研究^{[14][18]}も非常に多く実施され、特に 2010 年には国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer: IARC) が *in vivo* 試験にて酸化チタンナノ粒子の発がん性を示すと結論付けた^[19]。この

ことはこのナノ材料規制開始の 1 つの契機とも言われており、前記 2011 年の EC によるナノ材料の定義宣言以降、欧州各国がナノ材料の輸出入規制や化粧品などのナノラベル義務化等さまざまなナノ規制が動き始めることとなった。EC により定義されたナノ材料は簡易的に述べると“個数濃度で 100 nm 以下のサイズ材料が 50 % 以上含まれる材料”とされ^[13]、先にも述べたように材料は必ずサイズ分布をもつため、当該定義に基づくナノ材料該非判定には正確なサイズ分布計測が必要不可欠であることが明確化された。さらに、2012 年、EC の共同研究センター (Joint Research Center: JRC) は“Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term “nanomaterial””との題目レポート^[20]を発行し、当該レポートにて、当時サイズ分布計測を実施可能とされていた 8 つの計測法 (前記 DLS や AFM を含む) を選択され、一方で一部の計測法におけるサイズ分布計測能に関して疑問を呈する記述をした。当該レポートは非常に重大な意味をもち、すなわち EC がナノ材料規制に適用する定義が定量的な材料サイズ分布評価が必要とされる定義であるにもかかわらず、一般的に利用されていた 8 つの計測法が、必ずしもナノ材料の該非判断法として適用可能ではないことを取って EC 直属の JRC が公表したからである。結果として、EC は巨額予算を投入したナノ材料該非判定を可能とするサイズ分布計測法の開発プロジェクトを開始することとなった (代表例として 2013 年に開始された Nano Define プロジェクトが挙げられる)。このように、2010 年の EC の規制に使われるナノ材料の定義宣言を契機とし、正確なサイズ分布計測の必要性が注目されることとなった。このような急速なナノ材料規制に関連する国際整合性を有する計測法確立の観点からナノ材料の計測法に関わる国際文書が策定される動きが強まり、特に 4 つの技術部会: ISO/TC24/SC4 (Particle characterization)、ISO/TC201 (Surface chemical analysis)、ISO/TC229 (Nanotechnologies)、ISO/TC256 (Pigments, dyestuffs

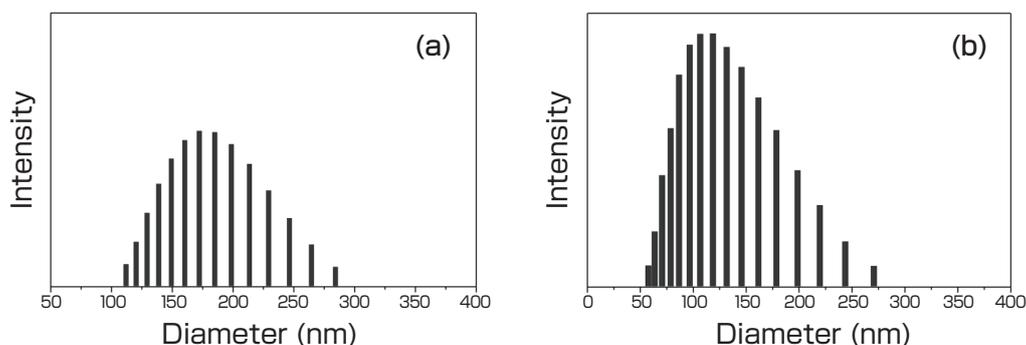


図2 70 nm (小さい粒子)と180 nm (大きい粒子)の粒子混合試料における (a) DLSによる粒子径分布測定結果と (b) LDによる粒子径分布測定結果。

and extenders) では関連する計測法規格を策定している。代表例として、TEM や SEM を利用したサイズ分布 (ISO21363 ならびに ISO19749)、粒子追跡法によるサイズ分布計測 (ISO 19430) のような基本的な計測法に関する基本文書や、作業環境におけるカーボンブラックやシリカの大气中濃度計測法 (ISO/TS21361)、エアロゾル生成による粉体材料からのナノ粒子発生量の評価方法 (TS 12025) 等の作業環境評価を目途とした技術仕様書も出版されることとなった。

3 流動場分離法：ニーズに応える計測法

3.1 流動場分離法の材料評価適用へのイメージ

このような明確なニーズが存在する中、液中サイズ計測法として前記 DLS や LD が主流であった当時において、精確なサイズ分布計測を実施するためにはどのような方法論が必要かをまずは最初の一步として熟考する必要があった。一方、重要（幸運）であったのは、筆頭著者が元々高分子構造評価研究畑の出身であったことから、(1) 静的光散乱法 (Static Light Scattering : SLS) による高分子分子量の計測が可能であるが、高分子分子量分布を計測するためには SLS 単独で評価することは不可能であり、(2) そのためサイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography : SEC) でサイズ分級し、その分級試料それぞれについて SLS にて分子量を値付け、分子量分布に再構成する必要がある、という基本概念を保有していたことである。先に図 2 左に示したようにサイズ分布をもつ材

料が混在すると、大きな材料による隠ぺい効果により小さな材料が見えなくなることとなり、元来感度の高い計測法を用いても精確なサイズ分布評価が困難になる。当該観点から事前にサイズ分級を実施し、その後に各種サイズ計測法により値付けする方法は非常に有効であることが容易に想定された。

一方で、SEC での分級可能なサイズ範囲は理論的に最大でも 100 nm (精度を考慮すると、さらに小さいサイズしか対応できない) と、100 nm を境にそれぞれの大きさがどの程度存在しているかが重要である EC のナノ材料定義には適用できる方法論ではないことは明確であった。一方、当時主流ではないものの超高分子量物質 (分子量が 1000 万を超える高分子) の分級法として、流動場分離法 (Field-Flow Fractionation : FFF) ^[21] が活用されていた。この手法であればマイクロオーダーのサイズの分級適用は可能であり、精確なサイズ分布を評価できることを実証できれば、十分にナノ材料の該非判定にも適用可能なサイズ分布計測として適用できるであろうことが考えられた。

3.2 流動場分離法の原理

前記 FFF は材料のサイズに依存した自己拡散現象と外部から前記材料サイズに依存した拡散とは逆方向に力を与えることによりサイズ分離を実現する。この時外部から与える力として流体の流れ、遠心力、熱、磁場、静電エネルギー等多々存在する ^[21]。図 3 では流れ流動場分離法 (一般的に利用されているのは非対称流れ流動場分離法 : Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation : AF4)

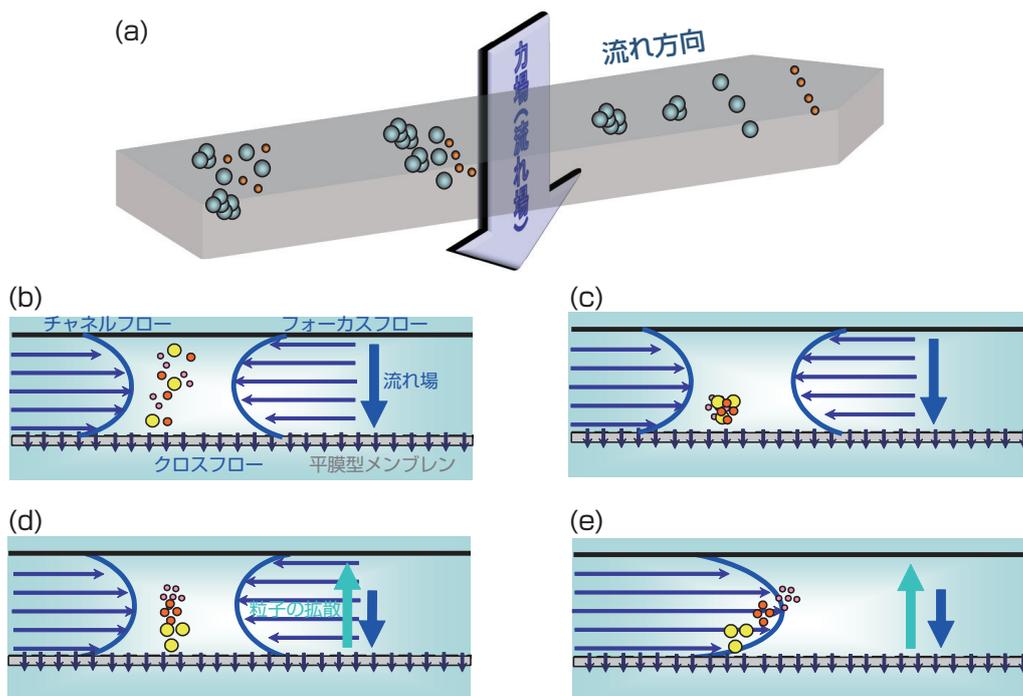


図 3 AF4 チャンネル内における異なるサイズを有する材料のサイズ分級のイメージ

の分離原理を表したものである。図3(a)に示されるようにAF4では流れに直行する力場として流れ場を使用し、力場の影響で異なるサイズの混合物を分離する方法論である。尚、図3(b)～(e)は平板のFFFチャンネル(クロマトグラフィーで言うところのカラム)の側面図を示しており、漫画的に描写したものとなる。1 mm以下の厚さに内部高さが保たれたチャンネルにおいて、上面は金属板またはアクリル板を用い、下面は平膜型メンブレンを用いた構造となっている。チャンネル厚さを1 mm以下に保つことにより図中に示されるようにチャンネルフロー(図では左から右の流れ)は層流となり、一方下面にメンブレンを用いることにより、縦方向の流れ(図におけるクロスフロー)も生じさせることが可能となる。

まず図3(a),(b)に示されるように、まず先に説明したチャンネルフローやクロスフローだけではなく、逆向きに流れるフォーカスフロー(図では左から右への流れ)を用いることで、左右方向ならびに下方向への流れを与え、様々なさまざまなサイズを持つ材料を一か所一か所にフォーカスする。その後、クロスフローを弱める、すなわち流れ場を弱めることで、サイズの大きい材料は自己拡散速度が小さく、サイズの小さな材料は逆に自己拡散速度が大きい特性を利用し、チャンネル内においてサイズ分布を縦方向に作成する(図3(d))。さらにフォーカスフローを止めることで、図中においてサイズの違いによる自己拡散の違い(小さい粒子は大きい粒子に対して早い拡散を起こす)とクロスフロー差分を利用することで広範囲サイズ領域における分離を可能にし、さらに層流場での流れの不均一さを利用して材料の縦方向の配置に依存した流出時間の違いが現れサイズ分級することができる(図3(e))。ちなみにAF4における異なるサイズ材料の各溶出時間は式(1)で表記される。

$$t_r = \frac{\pi \eta d w^2 V_{cross}}{2kTV_{channel}} \quad (1)$$

ここで、 t_r は流出時間、 d は試料の粒径、 w はチャンネルの厚さ、 η は溶媒粘度、 k はボルツマン定数、 T は温度、 V_{cross} はクロスフロー流量、 $V_{channel}$ はチャンネル流量となる。温度が不変であるとするならば、クロスフロー流量ならびにチャンネル流量を一定にすることで、サンプルの溶出時間はサイズに比例し、流出時間に応じた特定のサイズ分離が理論上可能となる。実のところ、この分級原理は決して近年提案されたものではなく、Giddingsによって1966年に発表されていた^[22]。一方で精確な流れ制御などが重要であるこの計測法はまだ研究開始段階であり、一般ユーザーが使用できるような実用化の視点が見えるには程遠い状況であった。その後1995年に初めての汎用型FFFが開発さ

れることとなり、その後2001年にFFFの専門メーカーであるPostnova社が設立されることとなったが、未だいまだ発展途上の領域であり、その分級能は決して高くなかった。これは後述する1) FFF分離において起こる様々なさまざまな現象の解明がなされていない、2) FFF分級結果の論理的に解析によるサイズ分布の定量的評価法が確立していない、3) 流体力学的検討に基づくFFF設計が実施されていなかったことに起因する。このことは我々にとってFFFはまさに研究対象とするに資する様々なさまざまな課題を抱えた計測法であり、様々なさまざまな課題を解決していくことにより新たな計測法として昇華することが可能と言えるテーマであった。一方このような発展途上のFFFは当時日本ではほとんど知られておらず、ナノ材料関係者にとっては手を出すには障壁が非常に高かった。このような背景を鑑みると、当該方法論が約50年経った21世紀にこの手法が我々らによって改めて定量的粒子径分布計測法の評価対象として注目を集めることになるとは当時想像していなかったかも知れない。

4 流動場分離法を用いたサイズ分布評価：ニーズに対応する評価法と認証標準物質の開発

4.1 流動場分離法によるサイズ分布評価法の確立

前節において記載されたようにFFFはクロマトグラフィー法の一種である。クロマトグラフィー法に精通している関係者には容易に想像がつくと考えられるが、クロマトグラフィー法で分級された材料は、必ずバンドブロードニング効果(ピークの広帯域化)の影響を受ける。FFFにおいて、この効果が生じる原因は、主に材料そのものもつ拡散の影響と、材料・材料間または材料・基底間の相互作用となる。我々はこれらの定量的な影響評価を実施したがこの節で詳細は触れない。前者の効果については非常にサイズ分布の狭い異なるサイズを有する粒子を用いた影響評価を実施し^[23]、後者については材料ならびに基底間のファンデルワールス力ならびに静電反発相互作用の関係を議論^[24]することで、バンドブロードニング効果は定量的に整理することが可能となった。無論、FFFを用いて材料のサイズ分布を精確に評価するためには当該バンドブロードニング効果による実測粒子径分布値の補正を実施する必要がある。この定量的整理に基づき、ブロードニング効果を補正したサイズ分布計測値は微分型電気移動度分析器(Differential Mobility Analyzer: DMA)における評価値と1%以下の精度で一致することを実証した^[23]。この時の各分級分におけるサイズ評価については前記SLS法原理に基づくオンライン装置である多角度光散乱法(Multi Angle Light Scattering: MALS)を用いた評価を実施し

た。図4ではその評価に係る一例を示しているが、図4(a)ならびに図4(b)にて視覚的に明らかにサイズ分布の異なる試料において、DLSではサイズ分布の違いの認識が困難である一方(図4(c)、4(d))、FFF-MALSでは明かにサイズ分布の違いを確認することができる(図4(e)、4(f))。

4.2 流動場分離法を用いた評価により値が付与された認証標準物質の開発

流動場分離法により液中材料のサイズ分布の精確な値評価が可能になったことにより、この手法を利用した認証標準物質(Certified Reference Material: CRM)の値付けを我々は実施した。元々、流動場分離法を用いたサイズ分布計測法の確立の目的の1つは、信頼性の高いサイズ分布情報が付与されたCRMの開発にあった。当該CRMを利用することにより、ナノ規制から派生したサイズ分布計測をナノテクノロジー産業関係者が実施した際に、その評価値の信頼性の付与に資すると考えていたからである。無論、鶏が先か、卵が先か、との、議論はあるが、我々は2010年においていまだサイズ分布の評価手法としては認知されていなかったFFF法によるサイズ分布計測法の確立を

まず優先し、その後、当該CRMの開発を実施した。その結果、開発されたCRMがNMIJ CRM5701a(2012年頒布: 図5)、5702a・5703a(2015年頒布)であり、それぞれ平均サイズならびにサイズ分布値情報とゼータ電位値が付与されていることを特徴としている。これらのCRMはポリスチレンラテックスを材質としており、それぞれ約120 nm、150 nm、200 nmの平均サイズを有している。詳細はホームページ(<https://unit.aist.go.jp/qualmanmet/refmate/crm/22.html>)をご参照頂きたい。これらのCRMは1) ナノ材料を取り扱うユーザーが自身の取り扱うさまざまなサイズ評価手法ならびに利用する評価装置(例えば電子顕微鏡)によって算出された平均サイズならびにサイズ分布測定値の妥当性評価を可能にする、2) ナノテク産業関係者が精確にサイズ分布計測を行うための計測法の選択の一助となる、3) 計測装置メーカーが精確なサイズ分布計測の可能な装置開発のきっかけとなる可能性を生む、の3点にあった。さらに当該CRMは、2015年においてもいまだ国内に多く実在するとは言えなかったFFFユーザーにとって、自身が真にFFFを使いこなしているかを見定める上での技量検

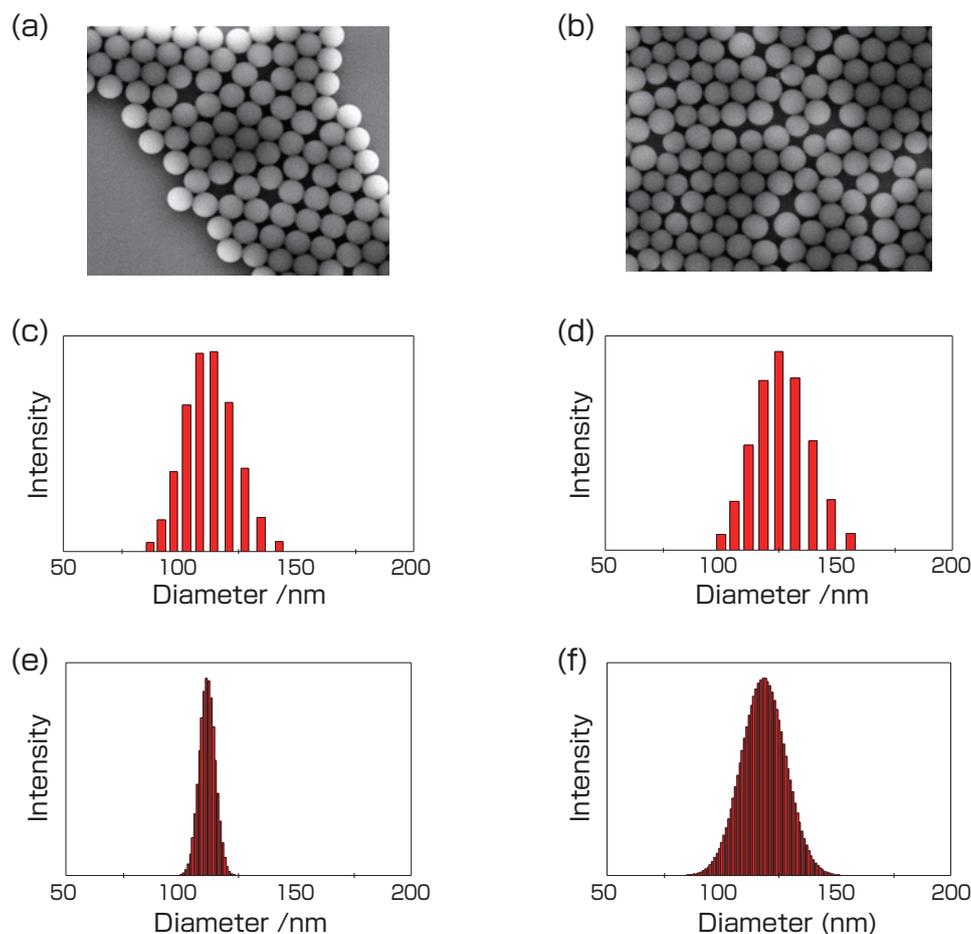


図4 サイズ分布の異なる試料(A:分布が狭い、B:分布が広い)を各種計測法にて評価した結果例。(a) AにおけるSEM画像、(b) BにおけるSEM画像、(c) AにおけるDLS評価結果、(d) BにおけるDLS評価結果、(e) AにおけるFFF-MALS評価結果、(f) BにおけるFFF-MALS評価結果。

証を実施するに資することも想定していた。当該目的のため、これらの標準物質は一般的に頒布されている粒子標準物質とは異なり、敢えてある程度の広さのサイズ分布をもっており、精確なサイズ分布計測が重要となっている現在において、計測装置性能や技能を検証することができるユニークな標準物質となっている。

5 流動場分離法を用いたサイズ分布計測に係る国際標準規格の策定：実用化1

前節までに記述した通り、我々はナノ材料規制等の材料の精確なサイズ分布計測の実施に資する計測技法としてのFFFによるサイズ分布計測技術の開発と、サイズ分布計測を実施する材料メーカーや計測機器メーカーが妥当性評価を実施するためのCRMの開発を達成した。しかし、次の問題として生じたのは当該FFFに関わる標準規格文書が世界中に存在していなかったことであった。実際、我々のところには、ナノテク産業メーカーより分析依頼をされても標準規格文書がなければ対応することができないという分析センターからの切実な問い合わせも当時あり、改めて標準規格文書の重要性に関して知ることとなった。当然ながら、標準規格文書がないことから、FFFに関する世界共通用語も全く存在していない状況である。一方で2015年においては、先に記述したEUのNano DefineプロジェクトにおいてFFFが材料のサイズ分布計測を可能にする技術として集中的に研究され、世界においてその計測法としての認知の広がりを見せていた。

このような潮流は、当該FFFに関する国際標準規格を作成するには非常によいタイミングであり、ISO/TC229（ナノテクノロジー）にて2015年に筆頭著者をプロジェクトリーダーとして予備業務項目（Preliminary Working Item：PWI）として承認を受け、策定作業を開始することとなった。その後、2016年に新規業務項目（New Working



図5 液中粒子径認証標準物質（NMIJ CRM5701-a）

Item：NWI）として承認を受け（この時、NISTのVince Hackley博士を共同プロジェクトリーダーとして迎えた）、2017年にFFF初の国際標準規格（技術仕様書）としてISO/TS21362：Nanotechnologies — Analysis of nano-objects using asymmetrical flow and centrifugal field-flow fractionationの発行承認を得て、その後、2018年に発行することができた^[25]。この規格の特徴は1) 新規にFFFに関わる33の用語の定義を実施、2) 新規にFFFに関係する56の記号・略語の定義を実施、3) FFFの基本原理や分析手順、ナノ材料分析に係る内容の記述、4) FFFを利用する上でのユーザー等が実施すべき事項や注意点等を記載、5) 評価において生じる不確かさ要因等の記述、を実施し、FFF初心者が材料分析する際における教科書となる規格文書となっている。

当該規格策定において、スムーズに作業が進んだ理由としては、先にも述べたようにこの規格文書が世界において切望されていたという背景があるものの、この規格文書策定に関わるステークホルダー（図6）のメンバーの献身的かつ積極的な協力があつたことが挙げられる。図6に示されるようにFFFの標準化に関わるステークホルダーを簡単に分けると、FFF装置メーカー・FFFのユーザー・FFFにより評価されたデータの利用者（規制当局等）の3つに分けることができる。また、ステークホルダーを構成するそれぞれには装置の信頼性や評価結果の信頼性に関わる保証・担保を必要としていたことから、規制にも適用可能な材料サイズ分布計測に寄与するFFFの国際標準化は必須であった。当該ステークホルダーにおいて、FFFを販売している装置メーカーとしては、ヨーロッパに本社をもつPostnova社ならびにアメリカに本社をもつWyatt社（ただし、当時、最もFFFの販売に関わっていたのはWyatt Europe社）の2社が主要なメーカーであったが、幸いにして筆頭著者は両装置メーカーと良好な関係があり、Postnova社CEOのThorsten Klein博士ならびに当時Wyatt Europe社の責任者であったChristoph Johann博士それぞれに協力を仰ぎ、この規格策定の合意を得ることができた。規格は時として装置メーカーの足かせになる可能性があ

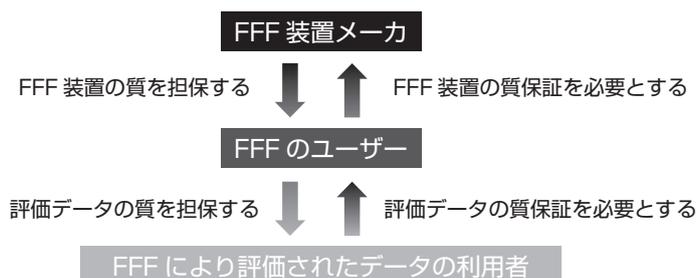


図6 ISO/TS21362 策定に係るステークホルダー

る一方、当該2社の真摯な協力を得ることができたことは非常に大きかったと言える。また、FFFのユーザーとしては先に述べたように世の中の潮流として多数のユーザーが存在しており、Nano Defineプロジェクト等において重要な計測法として注目されていたことから、各国より多数のエキスパートを登録されることとなった。またJRCのような規制当局と連携する機関からもエキスパートを出してもらえらることとなり、ステークホルダーに関わる3系統の機関が介した規格策定を実施することが可能となった。また、NISTのHackley博士はナノ材料計測において非常に高名な研究者であり、AIST-NIST 間国際協調での規格策定を実施してきたことは非常に大きかった。このように当時のニーズとマッチした国際標準化の実施とステークホルダー内のすべての関係者の真摯な協力があつたことがISO/TS21362の策定を迅速に実施できた要因と考えられる。

6 国産流動場分離装置の製品化：実用化2

前節で述べたようにFFF装置メーカはドイツに本社をもつPostnova社とアメリカに本社をもつWyatt社が有力メーカであり、日本国内では該当する装置メーカが存在していなかった。一方、先に示したように2015年頃には、すでにFFFは材料のサイズ分布計測において非常に有効な計測法であることは世界的にも認知され、その有効性や材料評価法としての活用の期待が上昇していた。

さて、少し時期が遡るが、2011年におけるECのナノ材料規制に用いるナノ材料の定義の宣言以降、国産材料メーカの漫然たる不安により、ナノ材料の適正管理に係る材料計測に解を与えてくれる計測法・計測システムのニーズが生じていた。このような背景を踏まえ、2013年に産総研と計測機器5メーカ（株式会社島津製作所・日本電子株式会社・株式会社リガク・株式会社堀場製作所・日立ハイテク株式会社）は当時産総研副理事長であった三木幸信

氏を運営委員長として、新規に計測ソリューションコンソーシアム（Consortium of Measurement Solution: COMS-NANO）を設立し、ナノ計測に関する課題を解決するための活動を実施していた。このような背景に基づき、COMS-NANO内の活動において我々と島津製作所では国産FFF開発に係る検討を実施し、2015年にプロトタイプの遠心流動場分離装置（Centrifugal Field-Flow Fractionation: CF3）を開発し、この装置を元にナノ材料評価に関する検討と汎用装置化に係る検討を実施した。この開発のFFFは図3で示されているAF4とは異なり、材料の拡散方向と逆向きに付加される力は遠心場となる（図7）。

CF3における分離は下記(2)式によって表すことができ、

$$t_r = \frac{\pi \Delta \rho w G d^3 V_0}{36 k T V} \quad (2)$$

$$G = (2\pi \times RPS)^2 r \quad (3)$$

t_r は流出時間、 d は試料の粒径、 w はチャンネルの厚さ、 η は溶媒粘度、 k はボルツマン定数、 T は温度、 $\Delta \rho$ は溶媒と材料の密度差、 V_0 はチャンネル体積、 V はチャンネル流量、 G は遠心における軸方向への加速度となる。 G は式(3)で表され、 RPS は1秒当たりの回転数に基づく角速度、 r は遠心回転軸からの距離となる。式(2)で示されるように、AF4の基本式である(1)とは異なり、分離はサイズではなく、対象材料の質量または材料の密度と関係することから、密度の大きな材料に関してはAF4よりも高分離を示すことが想定される。実際には材料の拡散と重力加速度のバランスによる分離であることから単純にサイズの3乗にて分離が上昇するわけではないが、この原理の最大の利点はやはりサイズの3乗に結びつく結びつく分離能である。この論文ではCF3装置の詳細な開発内容については割愛するが、実際プロトタイプをいざ作製するとメカニカル

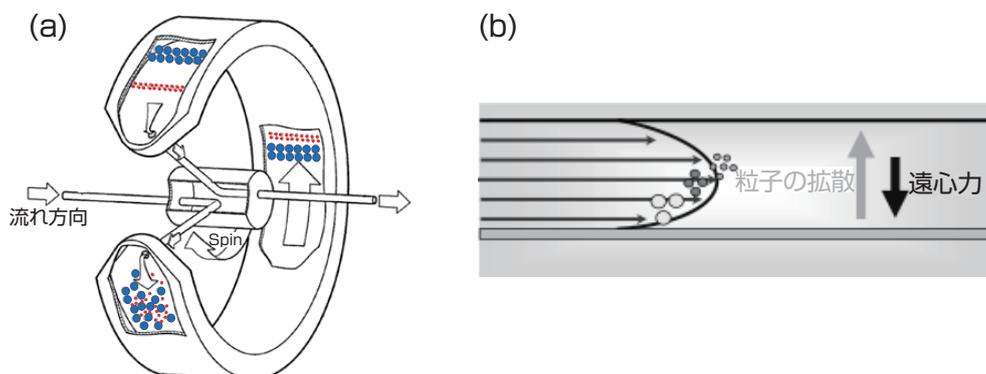


図7 (a) CF3全体イメージ図：遠心軸内流路より試料は注入され遠心によりサイズ分級される、(b) チャンネル内（側面図）における異なるサイズを有する材料は粒子サイズに依存した拡散と遠心力の差によりサイズ分級される。

な問題として液漏れや塵貯まりなど等予期せぬトラブルが多数発生した。適宜シミュレーション（図 8）や実測定（蓄積した塵の発生個所は何処かを調べるための元素分析等を含む）を実施し対応したが、ある程度目的とする分級能を得るまでに 3 年の期間を費やした。一方、当該開発実施の中ではさまざまな意味のある開発を実施することができた。下記は当時実施したシミュレーションの例であるが、長さが数 10 cm で厚さが 1 mm 以下のような高アスペクト比を持つモデル計算を実際に実施可能な有限要素法シミュレーターは当時存在していなかったことから、Navier-Stokes 方程式を直接的に解くことでの完全非経験的なモデル計算による評価手法について重点検討を行った結果である。図 8 は図 7 (b) におけるチャンネルの上面図を表しており、FFF の分離チャンネルにおける左入り口より注入された液が右出口より流出する際に、図 7 (b) に示されるサイズ分離が行われる領域において、流速がすべての部分で一定であることが可能であるチャンネル形状を設計する際に利用されている。このシミュレーターは液中計測を取り扱う我々にとって、FFF に関わらず、さまざまな展開利用を促すことができ、流れ場計測装置の開発に欠かせない武器と現在なっていることを付記する。

また、先にも記述したように、分離対象材料とチャンネル基底との相互作用等の化学的な分離能の低下要因もいくつか発生し、それらについての考慮も必要となった。最終的には、化学的な相互作用に基づく理論的な思考は分離能の定性的な予測に利用することが有効であるものの分離能の定量的な予測は困難であるとの結論に至った。このように実際の装置化では、理論や数式では表現できない現象が多々生じ、理想的な装置とはならない場合が生じる。一方で、この開発において我々が幸運であったのは装置開発に卓越した鳥津製作所の専門家が多数存在しており、その都度経験的な観点からも問題点を解決していくことができたことであった。このようにさまざまな知見や労力の元、国

産の FFF は 2020 年に販売されることとなった。尚、この開発装置は世界最高の遠心回転能 (15900 G) を発生することが可能な広いサイズ範囲における分級を可能とした装置となっていることを付記する^[26]。

7 流動場分離法を用いた多様な材料評価技術：技術展開

7.1 流動場分離法と電子顕微鏡法の組み合わせによる材料評価

FFF は材料の分級法であることから、後段に組み合わせる検出器により、異なる物理化学特性評価を可能とすることができる。4 章においては FFF と光散乱計測法である MALS を組み合わせたサイズ分布計測法について述べたが、例えば後段の検出器として誘電結合プラズマ質量分析装置 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: ICP-MS) を用いることにより、サイズのみならず、サイズに依存した化学組成の違いを評価することが可能である。この手法は実際に環境領域^[27]や製薬領域^[28]ですでに利用され始めており、FFF はさまざまな材料評価に適用できることを意味している。

そこでこの節では FFF により分級された試料の評価検出器として電子顕微鏡を用いることで、精度の高い個数基準サイズ分布計測の実現は勿論、材料のサイズに依存した形状分布・凝集状況の変化を評価可能とした実例を示す^[29]。1つの例として、電界放出形走査型電子顕微鏡 (Field Emission-SEM: FE-SEM) により 1 滴中に含有するシリカ粒子すべてのサイズ評価を実施した結果と CF3 で分級を実施したシリカ粒子について各分級分画毎にサイズ分布評価と個数濃度評価を実施・それらの結果を再構成した結果の比較を図 9 に提示した。

図中に示されるように、これら 2 通りのサイズ分布評価結果は非常に良く一致する。この時、CF3 を利用した意義は、サイズに応じて分級分画することにより、分画分内のサイズ分布が非常に狭くなり、結果として 1 分画について精々

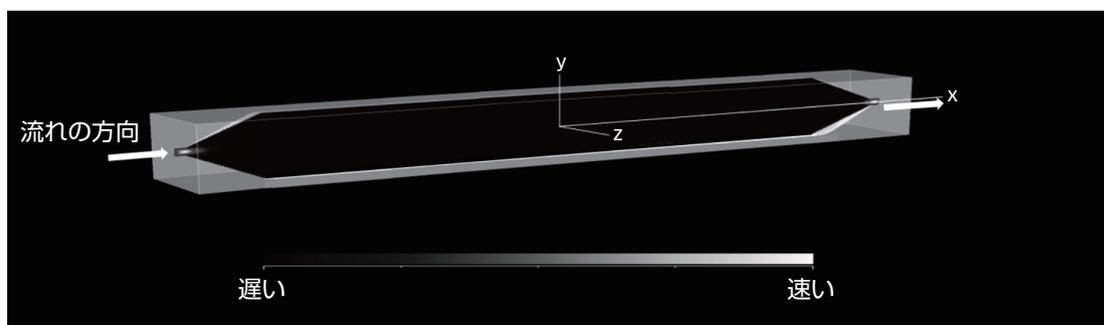


図 8 図 7(b) 記載領域における 3D チャンネル内の液体流れシミュレーションの例。左入り口より注入された液は右出口より流出する。流速は色にて示されており、白いほど速く、黒いほど遅い表記をしている。注入後の液の流速が一定であることを示している。

50 個の粒子をカウントすることで十分な精度でサイズ分布を評価できることである。全数カウントする SEM 評価と比較すると、分級することによりサイズ違いの粒子が混合することによる視野選択問題や倍率設定問題、大粒子による小粒子の隠ぺい効果等が解消され、結果として短時間で全数計測 FE-SEM と同等の結果を得ることができる代表例となった。

また、図 10 では図 9 の評価にて使用したものは異なる市販シリカ粒子試料について、FFF によるサイズ分級を行った際の各分画の形状評価を観測した結果となる。図に示されるように、各分画分のサイズはほとんど整っていることがわかる一方、サイズが大きくなるにつれて、そのシリカ粒子の形状が真球状から外れていくことが観測される。この

ことは、粒子群に存在する大粒子群はほぼ球形状からずれた粒子となっていることを示しており、合成成長によるシリカ粒子の形状のゆがみを明確に示した結果と言える。FFF の最大の利点はこのようにサイズ分級した分画分を回収できることであり、その後、どのような検出器を利用するかにより、目的の分析を実施することができることにある。アンサンブル性の観点から中々使い勝手のよくない電子顕微鏡法を有効に生かすという観点からもこの手法は今後サイズ分布計測以外の利用展開が期待される。

7.2 異なる原理の流動場分離法を組み合わせることによる材料評価

FFF は材料の自己拡散の方向に対して相反する力場を負荷することにより、材料の分級が可能であることは先に述

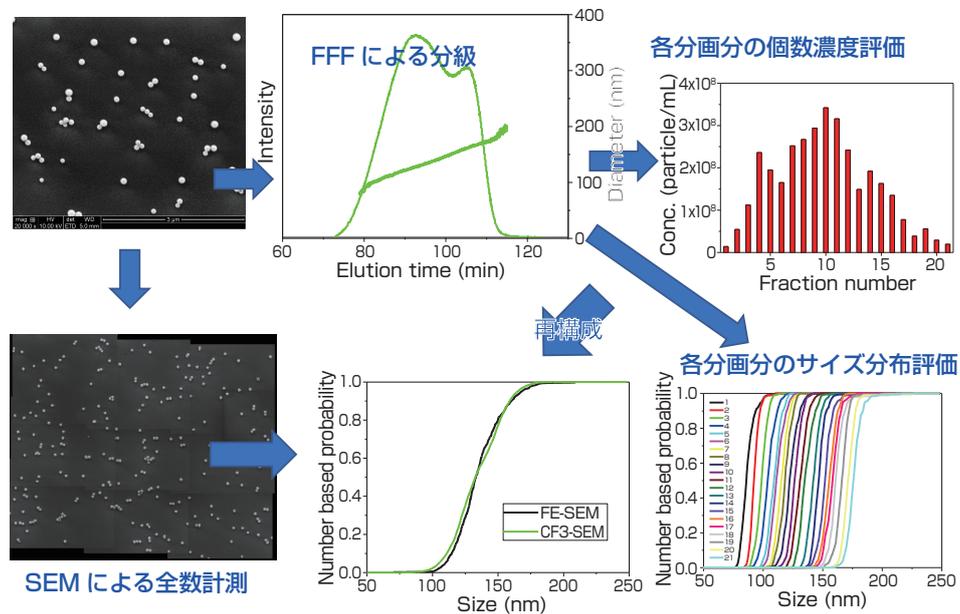


図 9 シリカ粒子について、FE-SEM にて全数評価したサイズ分布と CF3-SEM により評価した結果の比較^[29]。

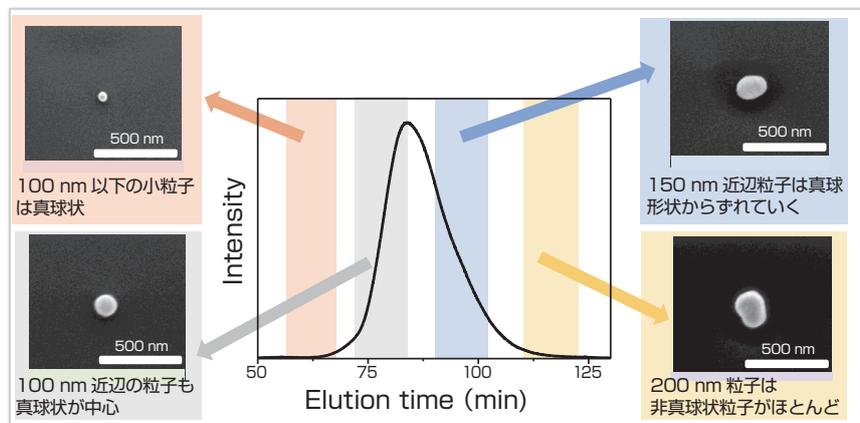


図 10 シリカ粒子について、FFF で分級した 4 分画分について SEM 観測した結果例。図は FFF で分級した際のフラクトグラム（横軸は流出時間、縦軸は強度）。4 つの流出時間範囲で分級した試料の SEM 画像により、サイズに依存した形状の変化が観察できる。

べた。この実施例では先に示した2種類のFFF (AF4とCF3)を接続する^[30]により、二次元的に材料を分級することができる実例を示す。図11(a)にAF4のみで分級した結果を、図11(b)においてAF4の後段に弱い遠心力を与えたCF3を接続したHyphenated FFF (AF4-CF3)の連続分級結果を示した^[31]。評価試料としてはポリスチレンラテックス (PSL) 70 nm、300 nmとシリカ粒子300 nmを混合した粒子分散液を用いた。図において観測されるようにAF4では式(1)で示される原理通り、サイズに依存した分級結果を示しており、70 nmと300 nmにて分離されていることがわかる(すなわち同じ300 nmのサイズをもつPSLとシリカ粒子は分離しない)。一方、CF3をAF4に組み合わせることにより、同一の300 nmのサイズを有するPSLとシリカ粒子がその密度の違いにより分離され、結果としてサイズと密度の2種類のパラメータによる二次元的な分級が可能であることが右図に示されている。このように多種多様な分級原理を有するFFFそのものの組み合わせによっても材料分級の幅は大きく広がることが示している。

7.3 流動場分離法を用いた非球形材料の評価

この論文では主に球状粒子を例としてFFF分析例を示してきたが、FFFではカーボンナノチューブや金ナノロッドのような柱状物質の長さ分級等にも適用されている。図12に金ナノロッドの分級例を示す。分級前の金ナノロッドはさまざまな長さや直径を有するが、分級によりその形状を整えることが図より確認することができる。このことは、形状の違いによる機能性違いの発現を正確に議論することが可能となることを意味している。このように非球形材料へのFFF適用研究はさまざまな研究者によって実施されており、ナノセルロース分析^[32]やグラフェン分析^[33]にも用いられているがここでは各論となるため、詳細な内容紹介は割愛する。

さらにFFFにオンラインの静的光散乱検出器を接続することで、分級された材料の形状評価：すなわち、対象からの光散乱強度の角度依存性を分析することにより、その形状を評価することが可能となる^[34]。また、検出器としてFFFにオンラインの静的ならびに動的光散乱検出器を同時

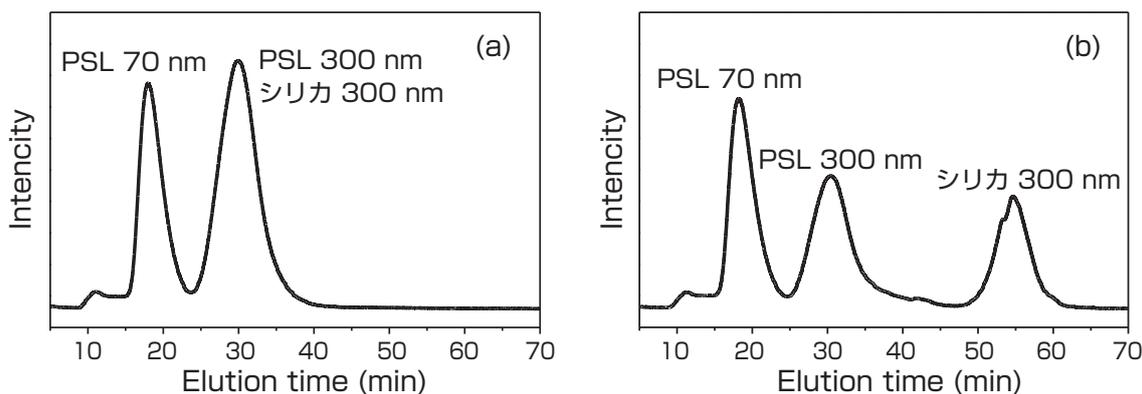


図11 ポリスチレンラテックス (PSL) 70 nm、300 nmとシリカ粒子300 nmの混合した分散液の評価結果。(a) AF4、(b) AF4-CF3による分級結果^[30]。

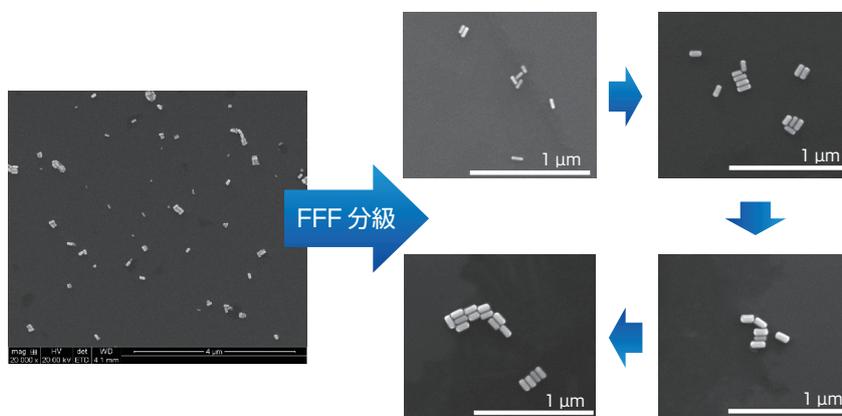


図12 FFFによる金ナノロッドの分級例：FFFを用いることで、さまざまな長さや直径をもつ金ナノロッドの形状を整えることができることを示している。

接続し、流体力学的径と静的散乱径を比較することで、材料の中空性についても議論することが可能となる^[34]。このことは、古典的な静的・動的散乱法による形状評価が元来抱えていた問題点：すなわち評価対象である材料が必ず有するサイズや形状分布の影響により低い信頼結果しか与えられなかったという課題を、FFFが評価対象材料のサイズや形状分布を可能な限り狭くすることができる特性を活用し、散乱法による形状分析の精度向上を促していることを意味する。実材料は必ずしも球状構造でないことから、FFFをうまく活用することで、非球形材料を適切に評価することが可能となる例と言える。

8 さいごに：この研究開発において展開したシナリオと今後のナノ計測に係る展望

この論文では、2010年初頭の欧州ナノ規制に端を発した材料のサイズ分布評価ニーズに応えるために、我々が約10年に渡って進めたFFF研究開発に関して整理した。図13では、この研究において実施した研究開発のシナリオ・進め方についてまとめた。所謂、基盤研究のみを実施するのではなく、実用化までを想定した研究を進めることをミッションとしている産総研という研究環境は、単に計測技法の開発だけではなく、標準化や実用化・装置化研究を並行して進めるのに最適な研究現場であり、この研究ではこのような三位一体型の研究開発を実践してきた一例となった。図における各開発項目を繋ぐ矢印は、矢印の方向における相関的な開発が行われたことを意味している。すなわち、装置性能を発揮・担保すべき、FFF装置における共通基盤を規定した標準を作成し（オープン戦略）、その標準に準拠しつつ、特許化またはノウハウ化された強みを織り込んだ装置・計測法開発を実施したところ（クローズ戦

略）が、今回の計測法・標準化・装置化の三位一体型開発における重要な特徴となっている。この研究では、単なる分級器とされていたFFFを精確なサイズ分布計測技法として昇華させるとともに、開発された技法を用いた標準物質の値付けとその標準文書策定、有する知見を生かした実用化（装置化）と、よい意味での多方面開発戦略を実践することができた。このような研究開発は、関連する専門家や技術者との出会いと協力なくして成し遂げることはできず、またこのような幅広い活動を承認する広い度量をもった上司の存在が不可欠であったと言える。また、この論文記載の研究開発では国内関係者だけではなく、先にも記載した海外のFFFメーカーのPostnova社の製品責任者であるRoland Welz氏による特殊FFFチャネルや内部スペーサーの作製等多大なる協力なくしてはありえず、さらにCEOであるThorsten Klein博士やWyatt社のChristoph Johann博士の専門的且つ友好的なサポートがあったことも大きい。またISO文書策定ではともに活動したNISTのVince Hackley博士は勿論、規格策定において参画してくれた各国のエキスパートのサポートはなくてはならないものであった。このことは、研究は人によって成り立っていることを示す一例であると実感する。

この研究におけるニーズに対する適な標準化戦略に結び付けられた研究開発は、開発当初、国内外においてそれほど広知されていなかったFFFに係る研究開発には非常に合致しており、この論文ではすべて記載することのできなかったFFFを利用したさまざまな材料の評価手法開発やナノ材料有害性評価への展開^{[34][37]}、さらに2020年に開発したFFFと共振式質量測定法との組み合わせによる単一粒子のサイズ・密度同時計測法^[38]等、さらなる新規計測法展開への未来がある。尚、これらの新規計測法



図13 この研究において実施した計測法・標準化・装置化の三位一体型開発の流れ

については、オープンな知財戦略として特許申請中となっている。追加して、この論文において説明した FFF を中核とした材料特性の計測システムについて図 14 にまとめた。先にも述べたように FFF は分級技術であることから、後段の検出器の性質により、さまざまな特性を評価することが可能であり、且つ、後段の検出器の性能を高める特性を有することを示唆している。また、FFF に係る規格文書：ISO/TS21362 は先の欧州のナノ規制に関連して策定された欧州規格 CEN/TS17273：Nanotechnologies - Guidance on detection and identification of nano-objects in complex matrices にても引用され、さらにアメリカの食品医薬品局：(Food and Drug Administration：FDA) において Recognized Consensus Standards として登録されることとなった。このことは、FFF が近将来的に工業材料の評価だけではなく、食品・医薬品等の定量的品質評価にも展開されていくことを意味している。

また、FFF はさまざまな力場を利用した分級装置であることから、今回記載した AF4 (サイズ分離) や CF3 (質量・密度分離) だけではなく、負荷する力場を変化させることで異なる物理化学特性での分級が可能となる。負荷する力場についての検討は今後の FFF のさらなる発展の 1 つの鍵と考えられる。さらに分級後段の検出装置を選択することでも材料等の分析法としてのさらなる広がりが期待できることから、新しい検出器の開発は今後重要となる。この

論文では記述しないが、我々が近年開発した単一粒子のサイズ計測を可能とした流れ場粒子追跡法 (Flow Particle Tracking：FPT)^{[39][40]} 等の新規計測法 (この手法開発も長い物語をもつ) との組み合わせや、FFF 内の粒子の運動・相互作用シミュレーションに基づく AI サポートの新しい粒子特性計測システム開発等、今後のさらなる展開として期待しているところである。また、分析用に注目されていたことから大量分取等大型化に係る開発も今後の取り組むべき課題の 1 つと言える。

謝辞

この研究開発において、関連する実験に携わった産総研 伴野秀邦氏、中村雅英氏に感謝致します。また標準規格策定に協力頂いた ISO/TC229 に所属する国内外委員メンバー、FFF 研究に関して装置的な開発に協力頂いた Postnova 社、Wyatt 社の技術メンバー、装置化を実施した島津製作所 北岡光男 取締役専務執行役員をはじめとする開発メンバー、産総研 同研究チームで液中計測研究に関わった高橋かより博士に感謝致します。また、この論文で紹介した研究の一部は NEDO 研究プロジェクト“ナノ粒子特性評価手法の研究開発”：P06041、次世代バイオ医薬品製造技術研究組合 (MAB)、計測ソリューションコンソーシアム (Consortium of Measurement Solution) の中で実施された。

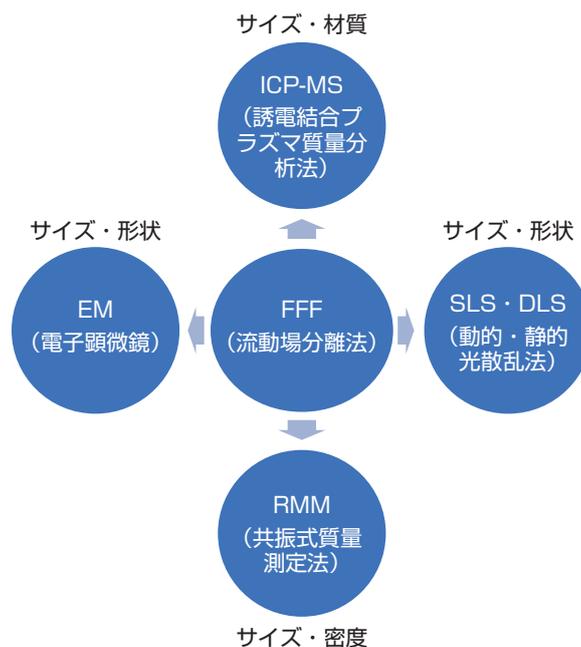


図 14 この論文において記載した FFF を中核とした計測システムのイメージと評価可能な物理化学特性について

参考文献

- [1] 奥山 喜久夫: ナノパーティクルテクノロジー, *化学工学*, 65 (11), 14–603 (2001).
- [2] ISO/TS80004-2:2015, Nanotechnologies—Vocabulary—Part 2: Nano-objects
- [3] G. Mie: Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen, *Ann. Physik* 25, 377–445 (1908).
- [4] M. Tanaka: Phthalocyanines—High performance pigments with new applications, *High Performance Pigments* (E. D. Faulkner, R. J. Schwartz (eds)), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 263–278 (2002).
- [5] P. Fischer, T. Eimüller, G. Schütz and G. Denbeaux: Imaging magnetic domain structures with soft X-ray microscopy, *Structural Chemistry*, 14, 39–47 (2003).
- [6] H. Kato, A. Nakamura, K. Takahashi and S. Kinugasa: Size effect on UV-Vis absorption properties of colloidal C₆₀ particles in water, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11 (25), 4946–4948 (2009).
- [7] J. A. Sichert, Y. Tong, N. Mutz, M. Vollmer, S. Fischer, K. Z. Milowska, R. G. Cortadella, B. Nickel, C. Cardenas-Daw, J. K. Stolarczyk, A. S. Urban and J. Feldmann: Quantum size effect in organometal halide perovskite nanoplatelets, *Nano Lett.* 15 (10), 6521–6527 (2015).
- [8] P. Liu, R. Qin, G. Fu and N. Zheng: Surface coordination chemistry of metal nanomaterials, *J. Am. Chem. Soc.*, 139 (6), 2122–2131 (2017).
- [9] S. Rakshit, S. P. Moulik and S. C. Bhattacharya: Understanding the effect of size and shape of gold nanomaterials on nanometal surface energy transfer, *J. Colloid Interface Sci.*, 491, 349–357 (2017).
- [10] Q. He, J. Liu, J. Liang, X. Liu, D. Tuo and W. Li: Chemically surface tunable solubility parameter for controllable drug delivery—An example and perspective from hollow PAA-coated magnetite nanoparticles with R6G model drug, *Materials*, 11 (2), 247–1–247-16 (2018).
- [11] Z. Zhang, Y. Ouyang, Y. Cheng, J. Chen, N. Li and G. Zhang: Size-dependent phononic thermal transport in low-dimensional nanomaterials, *Phys. Rep.*, 860, 1–26 (2020).
- [12] H. Kato, A. Nakamura and K. Matsubara: Dynamics and role of rosin acid molecules for preparation of well-dispersed CaCO₃ Colloidal suspensions, *J. Nanopart. Res.*, 14 (6), 950-1–950-9 (2012).
- [13] Definition of nanomaterial, *Official Journal of the European Union*, L 275 (54), 38 (2011).
- [14] M. Horie, H. Kato, K. Fujita, S. Endoh and H. Iwahashi: In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles, *Chem. Res. Toxicol.*, 25 (3), 605–619 (2012).
- [15] A. Sarkar, M. Ghosh and P. Sil: Nanotoxicity: oxidative stress mediated toxicity of metal and metal oxide nanoparticles., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 1, 730–43 (2014).
- [16] M. Horie, H. Kato and H. Iwahashi: Cellular effects of manufactured nanoparticles: effect of adsorption ability of nanoparticles, *Arch. Toxicol.*, 87, 771–781 (2013).
- [17] I. Gosens, F. R. Cassee, M. Zanella, L. Manodori, A. Brunelli, A. L. Costa, B. G. H. Bokkers, W. H. de Jong, D. Brown, D. Hristozov and V. Stone: Organ burden and pulmonary toxicity of nano-sized copper (II) oxide particles after short-term inhalation exposure, *Nanotoxicology*, 10 (8), 1084–1095 (2016).
- [18] Y. Wang, A. Santos, A. Evdokiou and D. Losic: An overview of nanotoxicity and nanomedicine research: principles, progress and implications for cancer therapy, *J. Mater. Chem. B.*, 3 (36), 7153–7172 (2015).
- [19] I. Iavicoli, V. Leso and A. Bergamaschi: Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vivo studies, *J. Nanomater.*, 2012 (5), 1–36 (2012).
- [20] T. P. J. Linsinger, G. Roebben, D. Gilliland, L. Calzolari, F. Rossi, N. Gibson and C. Klein: Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term “nanomaterial”, *JRC Reference Report*, (2012).
- [21] M. Schimpf, K. Caldwell and J. C. Giddings (eds): *Field-Flow Fractionation Handbook*, John Wiley & Sons, Inc., (2000).
- [22] J. C. Giddings: A new separation concept based on a coupling of concentration and flow nonuniformities, *Separation Science*, 1 (1), 123–125 (1966).
- [23] H. Kato, A. Nakamura, K. Takahashi and S. Kinugasa: Accurate size and size-distribution determination of polystyrene latex nanoparticles in aqueous medium using dynamic light scattering and asymmetrical flow field flow fractionation with multi-angle light scattering, *Nanomaterials*, 2 (1), 15–30 (2012).
- [24] H. Kato, A. Nakamura, H. Banno and M. Shimizu: Separation of different-sized silica nanoparticles using asymmetric flow field-flow fractionation by control of the Debye length of the particles with the addition of electrolyte molecules, *Colloids Surf. A.*, 538, 678–685 (2018).
- [25] ISO TS21362: 2018, Nanotechnologies—Analysis of nano-objects using asymmetrical-flow and centrifugal field-flow fractionation
- [26] 産業技術総合研究所: 10nm～40μmの粒子を同じサイズごとに細かく分けることに成功, https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2020/pr20200824/pr20200824.html, (2020).
- [27] E. K. Leshar, A. R. Poda, A. J. Bednar and J. F. Ranville: Field-flow fractionation coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry (FFF-ICP-MS): Methodology and application to environmental nanoparticle research, *Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis* (S. Kim, R. Williams, K. D. Caldwell (eds)), Springer Vienna, 277–299 (2012).
- [28] C. R. M. Bria, J. Jones, A. Charlesworth and S. K. R. Williams: Probing submicron aggregation kinetics of an IgG protein by asymmetrical flow field-flow fractionation, *J. Pharmaceutical Sci.*, 105 (1), 31–39 (2016).
- [29] H. Kato, A. Nakamura and H. Banno: Determination of number-based size distribution of silica particles using centrifugal field-flow fractionation, *J. Chromatogr. A*, 1602, 409–418 (2019).
- [30] 加藤晴久: 微小材料分級方法 特許6245601
- [31] H. Kato and A. Nakamura: Separation of nano- and micro-sized materials by hyphenated flow and centrifugal field-flow fractionation, *Anal. Methods*, 6, 3215–3218 (2014).
- [32] C. Ruiz-Palomo, M. L. Soriano and M. Valcarcel: Detection of nanocellulose in commercial products and its size characterization using asymmetric flow field-flow fractionation, *Microchim Acta*, 184, 1069–1076 (2017).
- [33] J. Amaro-Gahete, A. Benitez, R. Otero, D. Esquivel, C. Jiménez-Sanchidrián, J. Morales, A. Caballero and F. J. Romero-Salguero: A comparative study of particle size distribution of graphene nanosheets synthesized by an ultrasound-assisted method, *Nanomaterials*, 9 (2), 152 (2019).
- [34] H. Kato, N. Shinohara, A. Nakamura, M. Horie, K. Fujita, K. Takahashi, H. Iwahashi, S. Endoh and S. Kinugasa: Characterization of fullerene colloidal suspension in a cell culture medium for in vitro toxicity assessment, *Mol. Biosys.*, 6, 1238–1246 (2010).
- [35] H. Kato, A. Nakamura, M. Horie, S. Endoh, K. Fujita, H. Iwahashi and S. Kinugasa: Preparation and characterization

of stable dispersions of carbon black and nanodiamond in culture medium for in vitro toxicity assessment, *Carbon*, 49 (12), 3989–3997 (2011).

- [36] H. Kato, A. Nakamura and N. Noda: Determination of size distribution of silica nanoparticles: A comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering, and flow field-flow fractionation with multiangle light scattering methods, *Mat. Express*, 4, 144–152 (2014).
- [37] H. Kato, A. Nakamura, M. Shimizu, H. Banno, Y. Kezuka, K. Matsubara, K. Hosoi, S. Yoshida and T. Fujimoto: Acceleration of dispersing calcium carbonate particle in aqueous media using jet milling method, *Colloids Surf. A*, 520 (C), 570–579 (2017).
- [38] H. Kato and A. Nakamura: Particle density determination using resonant mass measurement method combined with asymmetrical flow field-flow fractionation method, *J. Chromatogr. A*, 1631, 461557 (2020).
- [39] Y. Matsuura, A. Nakamura and H. Kato: Determination of nanoparticle size using a flow particle-tracking method, *Anal. Chem.*, 90 (6), 4182–4187 (2018).
- [40] Y. Matsuura, A. Nakamura and H. Kato: Novel approach for reliable determination of the refractive index of particles in the liquid phase using a hybrid flow particle tracking method, *Anal. Chem.*, 92 (8), 5994–6002 (2020).
- [41] T. Yamaguchi, T. Mori, K. Aoki, R. Oda, M. Yasutake, A. Nakamura, K. Takahashi, T. Shigehuzi and H. Kato: Characterization of the volume-based or number-based size distribution for silica nanoparticles using a unique combination of online dynamic light scattering having a unitau multi-bit correlator and high resolution centrifugal field-flow fractionation separator, *Anal. Sci.*, 36 (6), 761–768 (2020).

執筆者略歴

加藤 晴久（かとう はるひさ）

産総研計量標準総合センター物質計測標準研究部門主任研究員。工学博士。2003年千葉大学大学院自然科学研究科博士後期課程修了後、ウプサラ大学勤務を経て、産業技術総合研究所入所。散乱光学・流体力学・計算機科学・各種分光学を基礎とした材料の特性評価に関する研究に従事している。この研究では研究の中心として、計測法開発・標準化・装置化を担当した。



中村 文子（なかむら あやこ）

産総研計量標準総合センター物質計測標準研究部門テクニカルスタッフ。理学修士。石巻専修大学 理工学研究科修士課程修了後、2007年よりNEDO研究プロジェクト“ナノ粒子特性評価手法の研究開発”に従事、その後、計測ソリューションコンソーシアム (COMS) 等にて、計測技術開発に関わる研究に従事している。この研究では、FFFを利用した各材料計測評価の主力を務め、標準物質の開発を担当した。



衣笠 晋一（きぬがさ しんいち）

産総研計量標準総合センター物質計測標準研究部門シニアスタッフ。工学博士。1985年京都大学大学院工学研究科博士後期課程修了後、旧工業技術院化学技術研究所（現在の産業技術総合研究所の一部）入所。高分子やナノ材料の光・X線散乱分析を専門とする。この研究では計測法ならびに標準物質の開発を担当した。



藤本 俊幸（ふじもと としゆき）

産総研計量標準総合センター研究戦略部戦略部長。理学博士。1993年北海道大学大学院理学研究科博士後期課程修了後、工業技術院物質工学工業技術研究所（現在の産業技術総合研究所の一部）入所。電子顕微鏡やX線反射率法等による材料分析を専門とし、現在ISOやVAMAS等の各種標準化に関わっている。この研究では国際標準文書策定ならびに研究総括を担当した。



査読者との議論

議論1 全体について

コメント（藤井 賢一：産業技術総合研究所）

ナノテクノロジーやバイオテクノロジー等さまざまな分野で用いられるナノ材料のサイズの高い信頼性で評価することは、2011年に欧州議会（EC）が策定したナノ材料の安全性についての規制に対応する上でも必須の課題であり、計測の立場からそのサイズを正確に評価する技術が必要とされていました。このような状況下で、この研究開発によって得られた成果には社会的な意義もあると言えるでしょう。

ナノ材料には気体中に存在するものと液体中に存在するもの等、用途に応じてさまざまな性状のものがあり、シンセシオロジーでは2019年8月号で「エアロゾル粒子の質量を測る」という気相中の微粒子を評価する計測技術についての論文を紹介したことがありますが、今回のこの論文は液体中の微粒子を対象としています。サイズだけではなく、サイズの分布も高い分解能で正確に計測することが重要な課題となっていました。この研究では流動場分離法（Field-Flow Fractionation: FFF）を世界に先駆けて開発したことで、サイズの異なるナノ粒子が混在した状況下でも、そのサイズと分布を正しく評価することが可能になりました。これは、クロマトグラフのように、FFFによって異なるサイズの微粒子を分離（分級）してからサイズを計測するという発想から生まれたものです。

これによってサイズとその分布が評価された液中ナノ材料の認証標準物質の供給が可能になりました。この認証標準物質を使うことで、測定装置の信頼性を評価し、より性能の高い計測技術を開発することが可能になりました。基礎研究開発だけではなく、その規格化と実用化という三位一体型の開発体制を構築したという点でもこの研究開発によって得られた成果は高く評価されます。ナノ材料を安心して利用できる社会環境を整備したという点でもタイムリーな論文です。

コメント（清水 敏美：産業技術総合研究所）

この論文は、流動場分離法（FFF）を用いて液体中に分散した球状ナノ粒子のサイズ分布を高精度に計測する技術を確認させ、さらにそれと並行して、FFFに関連する標準化や国産FFF装置の開発を進めたシナリオが述べられており、シンセシオロジー誌にふさわしい内容と考えます。

議論2 欧州議会（EC）がナノ粒子のサイズ分布計測に着目した経緯

質問（藤井 賢一）

サイズの異なる粒子が混在すると大粒子による小粒子の隠ぺい効果等があるため、動的光散乱 (DLS) やレーザー回折散乱 (LD) 等を用いた従来の測定方法では、そのサイズと分布を正しく評価できない状況が続いていたということが第2章で述べてありますが、2013年に欧州議会 (EC) が特にサイズ分布計測法にも着目した経緯等について、当時の状況も交えてもう少し詳しく説明して下さい。

回答（加藤 晴久）

当時、欧州各国はナノ材料の輸出入規制や化粧品などのラベル義務化等さまざまなナノ規制が動き始めることとなり、関連して欧州議会 (EC) より規制に適用されるナノ材料の定義として“個数濃度で100 nm以下のサイズ材料が50%以上含まれる材料”とされました。これに応じて、2012年、ECの共同研究センター (Joint Research Center: JRC) は“Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term “nanomaterial””とのレポートにて現在利用されている計測法が前記ナノ材料の定義に基づいたナノ材料の該非判定に適用できるかという視点から、サイズ分布計測法に特に着目したという経緯があります。また規制に利用できる計測法との視点での調査も実施され、結果として各計測法の標準化が多数実施されることとなりました。このように1) ナノ材料の該非判定に利用できる計測法が存在しているかという計測法の精度と、2) ユーザーが計測法を利用する上での標準化、すなわち国際同等性が担保された計測法として確立しているか否か、との視点から、当時粒子径分布計測は大きな注目を集めたという経緯があります。そこで、これらに関連する内容を第2章に追記致しました。具体的には経緯や当時のJRCの発言の重要性、その後関連して開発されたISO規格を第2章に追記致しました。

議論3 ナノ材料の次元について

コメント（清水 敏美）

ナノテクノロジー分野において一般的に、ナノ材料の形態として原子クラスター、粒子状等の0次元（球状）、繊維状、棒状、中空状等の1次元（針状）、ナノ薄膜等の2次元（膜状）、超格子半導体等の3次元（バルク状）が知られています。さらに、0次元（球状）でも金属ナノ粒子のように剛性が高いものから、高分子微粒子のように中間の剛性を有するもの、脂質ナノ粒子やタンパク質から構成されるCOVID-19ワクチン等相対的に剛性の低いもの等、多種多様な次元を有するナノ材料が存在します。

この論文で述べられている流動場分離法を活用したサイズ分布計測技術とそれに続く特性評価技術が適用可能なナノ材料の次元や種類、あるいは適用範囲について、どこかの箇所でも言及していただくとナノ材料研究者に有益な情報を与えたいと思います。

また、FFF法の問題点や今後の課題、さらにナノ材料のサイズ分布に関する他の公開されたISO規格や開発中のISO規格（例えば、ISO 21363:2020、ISO / AWI TS 19590、ISO / PRF 19749）に關しても追記、議論していただければと思います。

回答（加藤 晴久）

この論文では主として球状粒子を例として流動場分離法 (FFF) による分析例を示しました。しかし、FFFはカーボンナノチューブや金ナノロッドのような繊維状や柱状のナノ材料の長さ分級等にも適用されています。さらに、FFFにオンラインの静的光散乱検出器を接続することで、分級された材料の形状を評価することも可能です。FFFを活用することで球状ではないナノ材料を適切に評価できるいくつかの事例を、「7.3 流動場分離法を用いた非球形材料の評価」の中で紹介しました。

また、ナノ材料規制に関連して国際整合性を有する計測法を確立する観点から、ナノ材料の計測法に関わる国際文書を策定する動きが急速に高まっています。その詳細については、第2章の末尾に標準文書に係る記述を追記しました。

FFFの今後の課題に関しては、第8章において、負荷する力場を変化させることで異なる物理化学特性での分級が可能となることも示しました。また、この論文では記述していませんが、今後の更なる展開として、(1) 我々が近年開発した単一粒子のサイズ計測を可能とした流れ場粒子追跡法等の新規計測法との組み合わせ、(2) FFF内の粒子の運動・相互作用シミュレーションに基づくAIサポートの新しい粒子特性計測システムの開発、等を進めています。さらに、大量分取等大型化に係る開発も今後の取り組むべき課題の一つと考えています。

議論4 ナノ材料の評価に高分子クロマトグラフの考え方を導入した経緯について

質問（藤井 賢一）

ナノ材料の評価技術に携わる前は、高分子の構造評価に関わっていたという記述が第3章にあり、高分子をクロマトグラフでサイズ分級してから高分子分子量の計測を行うという基本概念を当時から既に保有していたということが書いてあります。高分子の分野では、このような考え方は既に一般化されていたのでしょうか。それとも、高分子の分野でもユニークな考え方だったのでしょうか。発想の原点等について教えて下さい。

回答（加藤 晴久）

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) でクロマトグラフィー内の孔径サイズに応じた分子量 (サイズ) 分級する手法と静的光散乱 (SLS) による各分画の分子量計測の組み合わせに基づく分子量分布計測は、高分子業界として伝統的に行われてきました。その一方で、SECのサイズ分級能は最大100 nmが限界で、ナノからミクロンまでの広い分級範囲の可能性を持つ流動場分離法を材料分級に適用することが可能であれば、広いサイズ範囲かつ高精度なサイズ分布計測が可能であるとしたのがこの研究の重要な部分となります。

当時FFFはまだ若い計測法であり、1) FFF分離において起こるさまざまな現象の解明がなされていない、2) FFF分級結果の論理的に解析によるサイズ分布の定量的評価法が確立していない、3) 流体力学的検討に基づくFFF設計が実施されていない、状態でした。このため、FFFの方法論・原理の確立、(国産) FFF装置の開発、開発した装置や計測法の標準化戦略等を織り交ぜたこの開発につながっています。これらの説明を第3.2節の最後に追記致しました。

質問（清水 敏美）

少なくとも高分子合成に関連する研究者にとって、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は高分子試料を分子量や分子サイズによって分離できるよく知られた分析技術です。しかしながら、流動場分離法に関しては勉強不足で今回初めてこの論文で知りました。1966年にGiddingsによって原理の提唱があり、その後、長い歴史が経過しています。それにも関わらず少なくとも日本では浸透しなかった、さらには国産の流動場分離装置が出現しなかった理由や背景は何でしょうか。アメリカのWyatt社やヨーロッパのPostnova社ではいつごろから市販装置を販売していたのでしょうか。特に100nmを超えるナノ材料として超高分子量の高分子系粒子は一般的ではありませんが、カーボンブラックやシリカ等の無機ナノ粒子や金属系ナノ粒子は日本でも多くが知られていたと思います。

回答（加藤 晴久）

1995年、汎用の流動場分離法 (FFF) を開発したのはドイツの大学ベンチャーでした。しかし、実際にPostnova社が設立され、装置が販売されるようになったのは2001年となります。この時のFFF装置は使い勝手が悪く、装置はあっても専門家以外では使用できないものでした。また、流れの制御や流体力学的観点からの精密流路の構築もできていませんでした。さらにFFF分離中に生じるさまざまな現象の論理的解釈、例えば、基底と分離対象の長距離静電反発相互作用等の化学的な相互作用が解明されていなかったことも、

この分級能が低かった要因となります。逆に、この発展途上な部分こそが我々にとっては研究対象とすべき要因であり、将来的な大きな発展を期待させる研究テーマであったといえます。もちろん、このような発展途上の分析装置は日本では受け入れられず、国産のFFF装置を製作する企業も現れませんでした。このような背景の詳細を第3章に記述しました。

議論5 認証標準物質について

コメント（清水 敏美）

4.2 節に認証標準物質に関する記述があります。しかしながら、NMIJ CRM5701a、5702a、5703a に関して物質名、素性や特性に関する記述が見当たりません。公開情報だと思いますので、読者の理解を深めるためにもこの文中にそれぞれについて追加説明をお願いします。

回答（加藤 晴久）

開発された認証標準物質である NMIJ CRM5701a(2012 年頒布)、5702a、5703a (2015 年頒布) はポリスチレンラテックスを材質とし、それぞれ約 120 nm、150 nm、200 nm の平均サイズを有しています。詳細はホームページ (<https://unit.aist.go.jp/qualmanmet/refmate/crm/22.html>) に記載されていますのでご参照ください。これらの標準物質は一般的に頒布されている粒子標準物質とは異なり、あてである程度の広さのサイズ分布を持っています。精確なサイズ分布計測が重要となっている現在において、計測装置の性能や技能を検証することができる唯一の標準物質となっています。詳細は「4.2 流動場分離法を用いた評価により値が付与された認証標準物質の開発」に記述しました。

議論6 ナノ粒子の表面科学的な評価への応用について

質問・コメント（藤井 賢一）

第 7.2 節の図 11 では、分級技術を使うことによって二次元的にナノ材料をさまざまな観点から評価することができるという、とても発展的な成果が示されています。これは、さまざまな検出器につながることもできる質量分析計と同じ概念だと思います。サイズは同じでも材料や密度が異なるナノ粒子を分離し、更には表面科学的な性質が異なるナノ粒子にも応用できるのではないかと思います。有望な応用があれば述べて下さい。

回答（加藤 晴久）

まず、FFF を中核とした材料特性の計測システムについて図 14 に

まとめました。FFF は分級技術であることから、後段の検出器の性質により、さまざまな特性を評価することが可能です。且つ、後段の検出器の性能を高める特性を有することを示唆しており、現行においても後段の検出器として顕微鏡法を組み合わせることで、サイズ分布・形状分布の同時計測法としての利用が可能です。また、ICP を後段検出器として利用し、サイズと材質の同時計測法として利用することも可能です。2020 年に我々が開発した FFF-RMM 法ではサイズと密度の同時計測を実施することが可能になりました。

また、FFF の今後の課題に関しては、第 8 章において、負荷する力場を変化させることで異なる物理化学特性での分級が可能となることも示しました。また、この論文では記述していませんが、今後の更なる展開として、(1) 我々が近年開発した単一粒子のサイズ計測を可能とした流れ場粒子追跡法等の新規計測法との組み合わせ、(2) FFF 内の粒子の運動・相互作用シミュレーションに基づく AI サポートの新しい粒子特性計測システムの開発、等を進めています。さらに、大量分取等大型化に係る開発も今後の取り組むべき課題の一つと考えています。

これらの現状分析ならびに今後の開発展望を第 8 章の最後に記載しました。

議論7 知財戦略等への対応

コメント（藤井 賢一）

センセシオロジーでは成果の製品化を念頭においた知財戦略等への対応も重視しています。特にこの研究は国際標準化と密接な関係にあります。国際標準化と結びついている重要な特許があれば述べて下さい。また、その特許の国際標準化における役割等についても述べて下さい。

回答（加藤 晴久）

この論文では申請中である特許に関しては記載しておらず、認可済みの特許 6245601 を引用していますが、FFF の製品化に伴う、関連特許が多数存在しています。これらの特許と、ISO/TS21362 に記載した CF3 の装置に係るバリデーション等を合わせることで FFF 装置は運用することが可能となっています。すなわち、装置性能を発揮・担保すべき、FFF 装置における共通基盤を規定した標準を作成し（オープン戦略）、その標準に準拠しつつ、特許化またはノウハウ化された強みを織り込んだ装置・計測法開発を実施した部分（クローズ戦略）が、今回の計測法・標準化・装置化の三位一体型開発における重要な特徴となっております。第 8 章にこの考え方を図 13 の解説として追記しました。