

隔膜型環境制御試料室システム

福嶋 球琳男^a, 石川 晃^b^a 日本電子株式会社電子光学機器本部EMグループ, ^b 日本大学文理学部物理学科

キーワード: E-TEM, 環境 TEM, 環境制御, EC, 隔膜

1. はじめに

「生のイカ」を電顕観察しようとしても、鏡筒内真空により干上がって「スルメ」になってしまい、さらに電子線の照射を受るため「焦げたスルメ」が観察されるにすぎない」という比喩が古くより語られてきた。「生のイカ」を知らない者は、観察結果（「焦げたスルメ」）から試料（「生のイカ」）が持つ機能はもちろぬ。本来の姿さえも想像できない。

先人達は「イカ」を「スルメ」にしない創意工夫に取り組んできた。その方法を大別すると、①化学的あるいは物理的に組織を固定処理する方法、②鏡筒内に湿潤ガス環境空間を設け、その中に試料を支持する、いわゆる“環境 TEM (E-TEM)”^{*1} と呼ばれる方法の2つが挙げられる。後者は、形態や構造を保持するばかりでなく、機能や活性をも保持できるため、環境制御に伴う試料変化の様子のその場観察が可能となる。

環境 TEM 開発のルーツは、電子顕微鏡が発明されて間もない 1940 年代に見られる¹⁾。1960 年代には試料周囲に導入されたガスによる試料コンタミネーションの制御効果が報告されている²⁾。1970～80 年代には世界各地で様々なタイプの E-TEM システムが研究室レベルで開発され、試料と雰囲気ガスとの反応のその場観察や、含水試料観察に応用された³⁾。その後、この分野の開発スピードは鈍ったが、1990～2000 年代にはナノテク分野の隆盛を背景に、触媒反応やナノ粒子成長過程のその場観察を目的とした E-TEM システムが電顕各メーカーで開発され、制御された環境場における試料変化の過程をその場観察することへの機運が再び高まっている。

装置構成の面から環境制御型試料室 (Environmental Cell : 以後 EC と記す) を大別すると、①環境ガスが EC 内から鏡

筒内へ漏洩するのを防ぐため、EC の天井と床に相当する部分に開けられた電子線通過用の窓孔に薄膜 (以後、隔膜と記す) を貼りつけた「隔膜型 EC」、②隔膜は貼らずに上記窓孔を開け放したまま、同軸多段のオリフィスを EC の上下に組み込み、それらによって形成される中間室内を独立した排気系で真空排気して鏡筒内の高真空を維持させる「差動排気型 EC」、③鏡筒内真空に影響を与えない程度の微量のガスを試料に噴きつけるノズルを組み込んだホルダを利用する「ノズルホルダ型 EC」に分類できる。本項では隔膜型 EC の構造・特徴・応用について現状を述べる。国内において隔膜型 EC を利用している主な研究グループは以下のとおりである。

- 1) 日本大学グループ⁴⁾: ガス雰囲気内での試料の電子線照射損傷や隔膜の電子線透過率など、EC を利用する上で必要となる各種基本特性の取得に取り組み、最近では高耐圧性隔膜や密閉型 EC の開発を試みている (本稿の別項目に詳細を記す)。
- 2) 帝京大学・東京農工大学グループ⁵⁾: ミオシン頭部のアクチン束縛サイトにマーカーとなる Au 微粒子を付与したミオシン線維を試料にして、生体活性を保持させたまま観察し、アクチン投与前後におけるマーカーの位置変化から ATP 誘起に伴うミオシンフィラメントの運動の解明を進めている。
- 3) 名古屋大学グループ⁶⁾: TiO₂ に担持した金ナノ粒子を CO ガス (1%) を含む空気 (375 Pa) 雰囲気中に置き、触媒作用により金ナノ粒子の表面構造が変化する様子を高分解能でその場観察している。
- 4) 北海道大学グループ⁷⁾: 水素貯蔵合金として利用される Mg 合金の機能解明を目的に、脱水素化された Mg 微粒子を 0.1MPa 水素雰囲気下で観察し、水素添加に伴う形態ならびに構造の変化を報告している。

2. 隔膜型 EC の装置構成

隔膜型 EC は、図 1 に示す 4 つのバリエーションを持つ。ガス流路の無い最も簡単な構造の「密閉型」(図 1-a) は、

Kurio Fukushima and Akira Ishikawa: Film-sealed type Environmental Cell system

^a 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2

E-mail: fukushima@jeol.co.jp

^b 〒156-8550 東京都世田谷区桜上水 3-25-40

E-mail: ishikawa@chs.nihon-u.ac.jp

2007 年 11 月 12 日受付

*1 “環境 TEM” は、含水試料観察への応用だけでなく、制御された環境下における各種材料の成長過程、酸化還元過程などのその場観察にも広く応用されている。

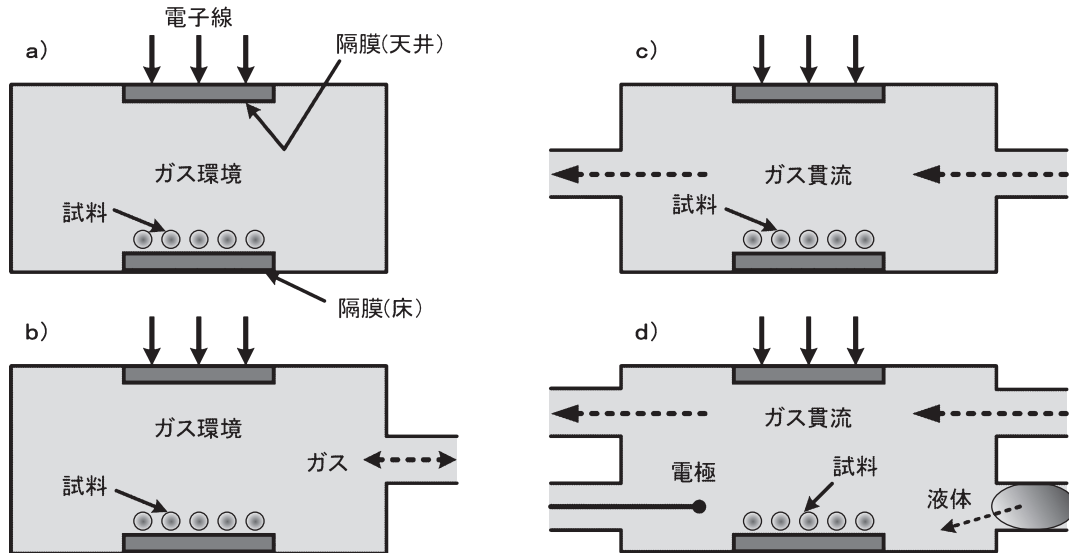


図1 隔膜型 EC のバリエーション. a) 密閉型, b) 圧力調整型, c) ガス貫流型, d) 多目的型

ガス環境下で観察する目的は達成できるが、その場で環境を制御することができない。ガス流路を1本備えれば(図1-b)、環境圧力のその場制御は可能になるが、絶え間なくフレッシュなガスを供給することはできない。これを可能にするには2本のガス流路を備える必要がある(図1-c)。そして、制御されたガス環境下で観察中の試料に反応液を作用させるなど、他の環境場を制御する機能を付加するには、外部との接続通路をさらに増やす必要がある(図1-d)。

隔膜型 EC を利用する上での基本的な装置システムの構成は、以下の3つの要素からなる(図2)。

- 1) **TEM 試料予備排気系改造**：通常、試料予備排気室内は排気の開始とともに一気に減圧される。この時、大きな応力がかかり隔膜が破損することもある。この破損を防止するために、試料予備排気系に排気速度を調整できるバイパス排気経路を追加する^{*2}。
- 2) **ガス雰囲気試料ホルダ**：この試料ホルダの先端には、隔膜型 EC を組み込むシーリングブロックが装着される。シーリングブロックには環境制御に利用する複数の細管が接続さ

れ、それらは試料ホルダの軸内を通して他端がホルダ外部に取り出されている。

3) **ガス環境調整装置**：隔膜型 EC の内部環境や試料予備排気室内の圧力を調整するユニットであり、その内部には開閉バルブ、微小流量調整バルブ、水蒸気補給用水槽などが組み込まれている。これらをつなぐガス流路の一端には貫流ガスの供給源を接続し、他端に真空ポンプを接続する。そして、シーリングブロック内に組み込まれた EC につながるガス貫流用細管の外部接続端子をガス流路の途中に接続して、流路が一つの系としてつながる。

3. ガス雰囲気試料ホルダ

汎用 TEM (200 ~ 400kV) 用に開発した3種類のガス雰囲気試料ホルダについて、それらの構造と特徴を以下に述べる。

1) **ガス貫流用雰囲気試料ホルダ**(図3-a)：シーリングブロック内にガス雰囲気空間(EC)を確保するため、スペーサーを挟んで天井と床に相当する2枚のグリッドを配置しキャップで固定する。両グリッドの窓孔は隔膜で塞がれている。また、各パーツ間のガスシールにはバイトンOリングが使用されている。試料は床に相当するグリッドに貼られた隔膜上に支持する。ガス貫流用に、外部からホルダ軸内を通して EC に通じる2本の細管が配置されている。スペーサーの厚さ(=ガス層の厚さ)を極限まで薄く(0.1mm以下)できるため、比較的高い圧力環境を必要とする含水試料などの高分解能観察に適している。EC内の環境変化に伴う試料変化の過程をその場観察することも可能である。

2) **液体注入用雰囲気試料ホルダ**(図3-b)：ガス貫流用ホルダとの違いはスペーサー(1mm厚)がシーリングブロック内に作り付けられている事と、ECにつながる細管の数が4

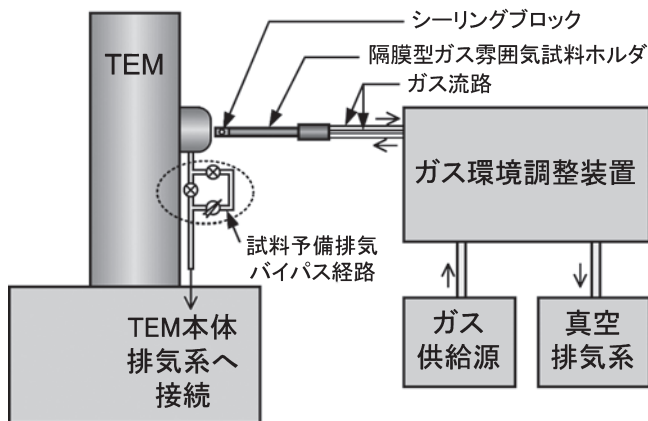


図2 隔膜型 EC の装置構成

^{*2} 高耐圧性隔膜を利用する際には、この改造は必ずしも要求されないが、安全性確保の立場からは改造するのが良い。

本に増えたことである。試料は床となるグリッドに貼られた隔膜上に支持する。4本の細管の内の2本はガス貫流に用い、注入する2種類の液体は残りの2本の細管先端に準備しておく。各々の液体はその前後の圧力バランスの調整により全量がガス雰囲気内で観察中の試料上に一気に注入される。スプレー内にはろ紙の小片が設置され、余分な液をすばやく吸い取る。固体-液体あるいは2液間の反応過程のその場観察に用いる。同方式のホルダを利用した観察例として、写真用ハロゲン化銀粒子の現像過程における還元銀成長の様子を図4に示す。

3) 加熱雰囲気試料ホルダ (図3-c) : このホルダのシーリングブロック内部にはワイヤヒーターを設置する電極端子が作り付けられている。試料はワイヤヒーターに付着支持する。ECにつながる細管はガス貫流用に2本を備えている。パイトンOリングを使用しているため、加熱温度の上限は350°Cである。S. Giorgioら⁸⁾は、本ホルダを利用しTiO₂粒子やカーボン膜に付着させたAuあるいはPdクラスターの構造や形状が、H₂あるいはO₂雰囲気中で変化する様子を高分解能観察し、触媒作用の解明に取り組んでいる。

4. ガス環境調整装置

配管図を図5に示す。EC内ガス雰囲気(圧力、流量)の調整ライン(緑色)、試料予備排気室の圧力調整ライン(赤色)、液体注入用ライン(青色)が組み込まれている。2つのガス導入口を備え、雰囲気の切換が可能である。ガス導入ラインには水蒸気補給用の水槽が設置され、貫流ガスはフィルターを通し小さな気泡となってここに送り込まれる。水槽をバイパスさせれば、乾燥ガスをEC内に導入できる。排気系にはターボ分子ポンプが使われている。PC制御による自動シーケンスにより以下の操作が行える。

1. EC内/試料予備排気室内の圧力・流量調整
2. 供給ガスの切換
3. 湿潤ガス環境と乾燥ガス環境の切換
4. EC内の高真空排気
5. ガスの再貫流
6. 微量液体の注入

5. 隔膜

隔膜は、隔膜型ECを構成する最も重要な要素であり、その特性と作製の容易さがEC観察の効率を左右する。要求される特性と、それを満たす隔膜の作製法について述べる。

5.1 隔膜に必要な特性

隔膜に要求される最も重要な特性は、電子線透過性と耐圧性であるが、両者は背反する特性であり、双方の要求を満たすような材質と適切な厚さの選択が必要である。この他、観察を妨げないためには無構造(無コントラスト)性が、そして安定な観察のためには導電性、電子線照射耐性が要求される。また、化学反応等のその場観察のためには耐薬品性が要求され、さらに実用面からは作製の容易性が重要となる。

5.2 隔膜の作製法

深見らが開発したプラスチック・マイクログリッド(MG)を支持体とするカーボン隔膜⁹⁾は、電子線透過性に優れ、高解像度観察を可能にしたが、MGのコントラストが試料構造のコントラストに重なり、観察には支障となっていた。その後、MGの孔の周囲の形状を滑らかにしてカーボンを蒸着し、最終的にMGを溶解除去することで、支持体のコントラストを無くすことができた¹⁰⁾が、液体を注入して観察する場合には膜の窪みに溜まる液体のコントラストが生じる難点があった。これを解決するため、厚さ10~20nm程度のフラットなカーボン薄膜で耐圧性能が0.1MPa以上の隔膜の作製法を開発した。その作製上の要点は以下の2点である。

- 1) 隔膜用保護膜の利用 : 作製過程でのカーボン膜の破損を避けるために、スライドガラス上にトリアセチルセルロース(TAC)膜を作製してその上にカーボンを真空蒸着し、TAC膜と一体化したカーボン膜を隔膜支持用のグリッドに貼ってからTAC膜をアセトンで溶解除去してカーボン膜だけを残す。
- 2) 高真空での低速蒸着 : 厚さ20nm程度のカーボン膜を得るには、カーボン棒の先端を長さ2mm程度細くして尖らせ、電流値50A以上で急速加熱して数秒間で蒸着すればよいが、この方法で得られる耐圧性能は0.04MPa程度であった。そこで、カーボン棒の形状を改良することによって電気抵抗を増し、併せて蒸発源からの熱拡散を抑えることにより、厚さ20nm程度で0.1MPa以上の耐圧性を持つカーボン隔膜が得られるようになった¹¹⁾。この時の蒸着条件は、加熱電流30A程度、蒸着時間30秒程度である。隔膜の作製とグリッドへの貼り付け手順の詳細は他⁴⁾に紹介されている。

通常観察には厚さが約20nmの隔膜を使用しているが、高解像度観察のためには、隔膜の厚さはできるだけ薄くする必要がある。川崎ら¹²⁾は上記作製法を改良し、蒸着源からスライドガラスまでを円筒容器で囲み、容器壁で反射したカーボンを堆積させる方法により、厚さ8nmで0.1MPa以上の耐圧性能を持つ隔膜を作製している。後述の密閉型ECはもとより、通常隔膜型ECでも0.1MPa以上の高耐圧性隔膜を用いれば操作性を大幅に向上させることができる。

5.3 膜厚の測定

カーボン膜の厚さは、光学濃度計でスライドガラス上の膜の透過光学濃度 D を測定し、カーボン膜厚 t の較正式

$$t(\text{nm})=110 \cdot D \quad (1)$$

を用いて求めている。較正式は水晶振動式膜厚計による測定、および電顕観察による折り曲げ法での膜厚測定により求めたもので、5nm~50nm程度の厚さ範囲で有効な方法である。

なお、膜厚20nmの隔膜の電子線透過率は、加速電圧100kVのとき、検出半角 1.5×10^{-2} radで92%程度である。

5.4 隔膜支持用グリッド

隔膜を支持してECの天井と床を構成するグリッドへの要求項目としては、隔膜の耐圧性と視野の確保の観点から、窓孔の大きさと数の最適化および、窓孔の配置の対称性が挙げ

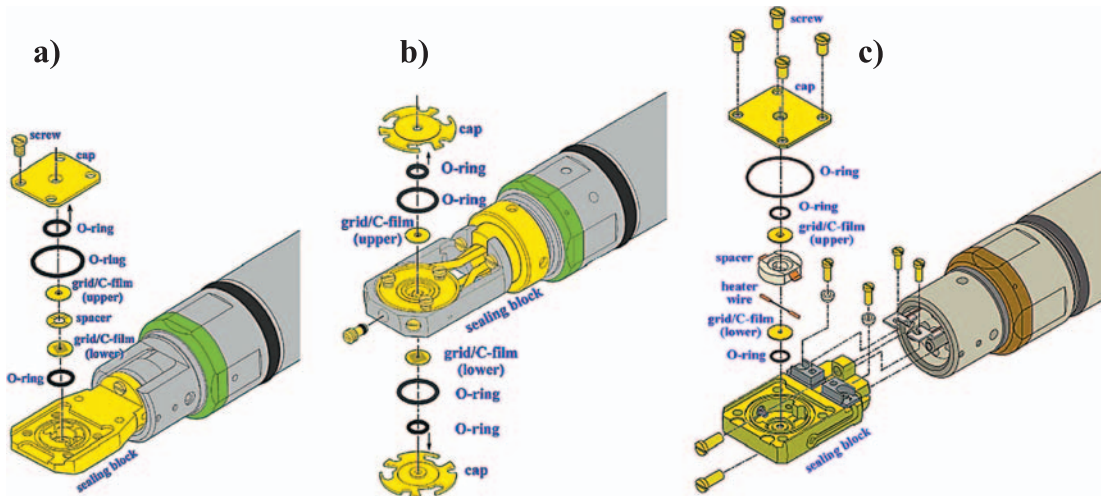


図3 雰囲気試料ホルダ先端のシーリングブロックへ組み込む EC 構成部品. a) ガス貫流用, b) 液体注入用, c) 試料加熱用

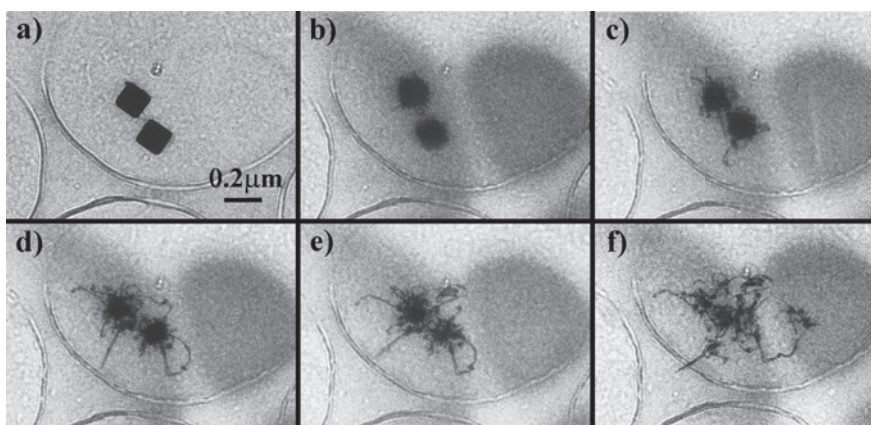


図4 写真用ハロゲン銀粒子の現像過程のその場観察. ガス環境; 乾燥空気 8kPa, 現像液 (CNK-4, 1:4) 注入量; 1.5mm³, a) 注入前, b) 現像液注入 30 秒後, c) 1 分後, d) 2 分後, e) 3 分後, f) 4 分後

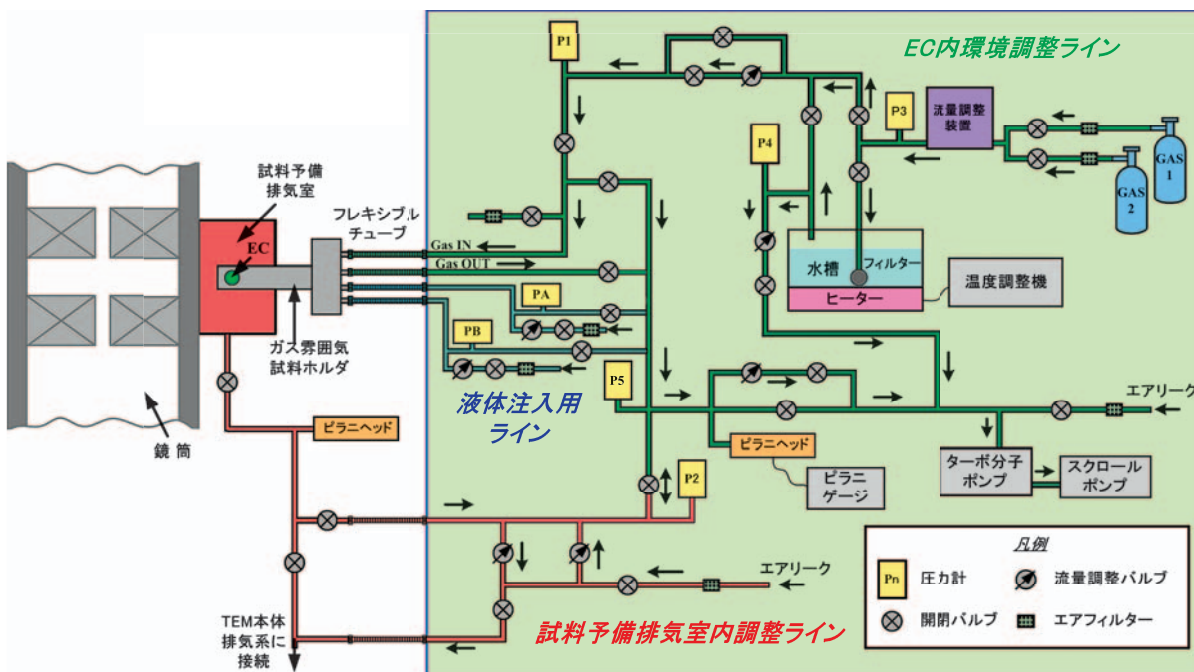


図5 ガス環境調整装置

られる。これらの条件を満たすグリッドとして、図6に示すような、直径3.5mm、厚さ0.2mmのりん青銅製の円盤の中央部に窪ませて、直径0.1mmの孔を7個設けたものを用いている。左は隔膜を貼ったグリッドの写真である。

5.5 隔膜の耐圧性能検査

作製した隔膜をEC観察に用いるには、事前に耐圧性能の検査が必要となるので、0.1MPa以上の耐圧検査装置を製作した。図7にその模式図を示す。真空ポンプ/コンプレッサー兼用の小型ポンプを用いて、まず減圧口に設置したOリング(1)に隔膜を貼り付けた面を上側にしてグリッドを載せ、上蓋を閉じる。減圧口を通してグリッドの下側空間を0.02MPaまで排気し、次いでグリッドの上側の小部屋をコンプレッサーで0.15MPaまで加圧して、膜の上下に0.13MPaの圧力差を与える。この条件で破損しない隔膜を観察に用いている。

6. 密閉型 EC

隔膜型 EC は試料環境の制御が可能なが大きな利点であるが、特別な試料ホルダと EC 環境調整装置、および顕微鏡本体にガス漏れ対策を必要とする。しかし、EC 観察においては、単に含水試料の「生のままの状態」での観察や、微粒子の液体中での分散状態の観察など、環境制御を必要としない場合も多い。このような目的には、隔膜型 EC のガス通路を持たない簡単な構造の密閉型 EC を用いることができる。大気圧下で試料を密閉して、そのまま標準型の試料ホルダに組み込めるのが密閉型の特長である。

6.1 密閉型 EC の構造と密閉性能

最も簡単な密閉型 EC は、隔膜を貼った2枚のグリッドでガスケットを挟み、上からネジ蓋で締め付けてシールドするだけの構造であり、EC のガス層の厚さはガスケットの厚さで決まるが、この厚さを0.1mm以下にするのは困難である。そこで、さらにガス層の厚さを減らすために、上下のグリッドの外側にOリングを置いて密閉する構造のECを開発した¹³⁾。図8にその模式図と構成部品の写真を示す。ガス層の厚さはスペーサーの厚さで決まり、0.0mmから0.25mmの範囲で変えることができる。ECは厚さ3.5mmのシーリングブロック内に組立て、サイドエントリータイプのバルク試料ホルダに組込んで用いている。

密閉型 EC では、大気圧下で密閉する場合、0.1MPa以上の耐圧性能を持つ隔膜が必要であるが、試料ホルダの鏡筒への挿入も、通常の前準備排気操作で行える。また、ガス通路を備えた隔膜型の場合は隔膜の破損によるガス漏れ対策が必要であるが、密閉型の場合には密閉されるガス量は1mm³程度と極めて少量であり、万一漏れても電頭の真空中に影響はないので、漏れ対策が不要であり、通常の前準備でそのまま使用できることも特長である。これまでの実験において、水滴が密閉されてから数時間にわたって保持され、さらに水滴が移動・合体する様子その場観察がなされており、密閉性能は実用上十分であることが確認できている¹¹⁾。

6.2 密閉型 EC 内の圧力と解像度

先に述べたように、大気圧下で密閉してそのまま観察できることが、密閉型 EC の利点であるが、0.1MPaのガス層では厚さが0.1mm程度でも、解像度はかなり低下する。解像度を向上させるには、ガス層の厚さを減らすか圧力を下げる他ないので、圧力を下げてから EC を密閉する低圧密閉装置を作製した。試料ホルダに組み込んだシーリングブロックに EC 構成部品を重ねて装置に挿入し、所要の圧力まで排気した後外部からネジ蓋を回して締め付けることにより密閉す

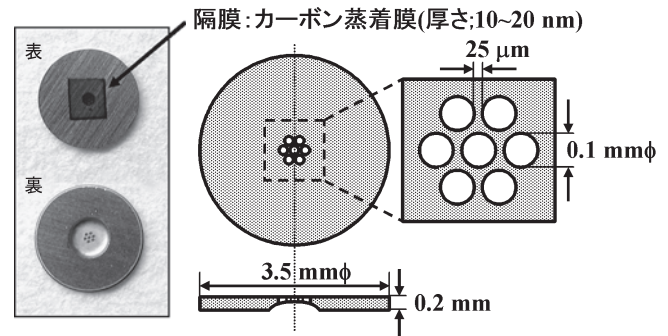


図6 EC用グリッド (材質; りん青銅)

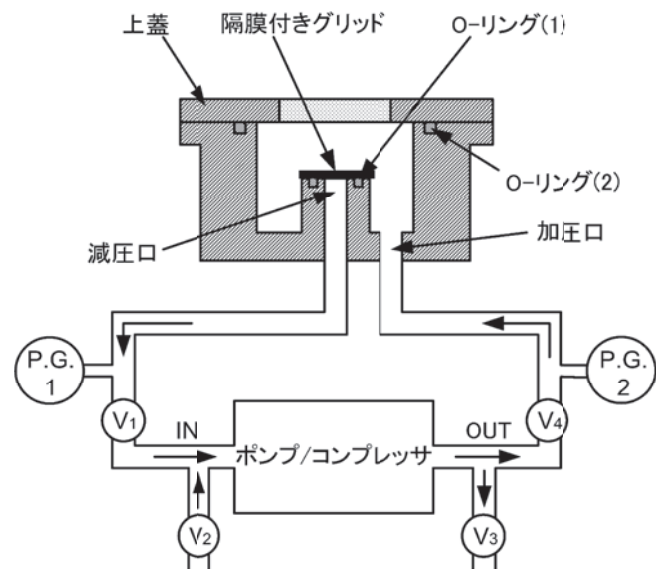


図7 隔膜の耐圧試験機

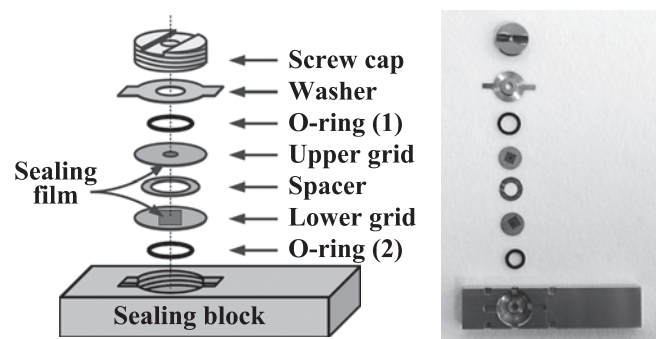


図8 密閉型 EC の構成と構成部品

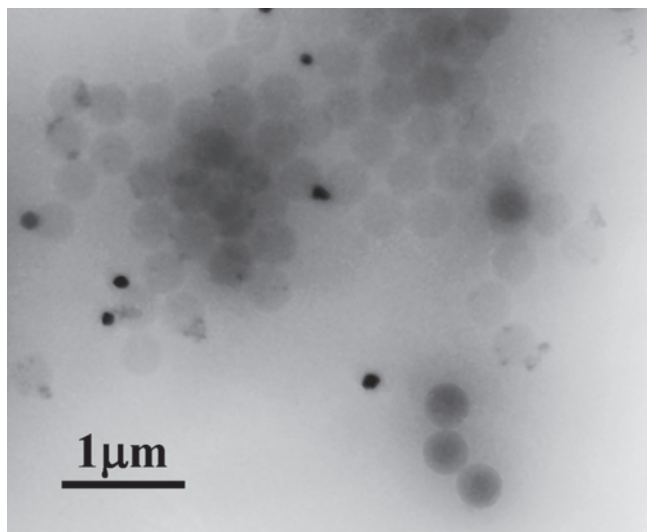


図9 密閉型 EC による水層中のポリスチレン・ラテックス球の観察例 (水層厚さの推定値: 1.5 μm), 加速電圧: 200 kV

る。これを大気圧下に取り出すと、隔膜に逆圧力が加わり、グリッドから剥離するおそれがあるが、グリッド表面にネオプレンゴム (粘着剤: メッシュセメント) 0.05% トルエン溶液を塗布してから隔膜を貼ることにより、剥離を防ぐことができる。

6.3 密閉型 EC 内のガス圧力および液層厚さの推定

密閉型 EC では EC 内圧力を直接測定することはできないので、EC 自体の電子線透過率から圧力を推定する方法を用いている。隔膜型 EC を用いて、種々の空気層厚さおよび圧力に対し、種々の開き角で電子線透過率 T_r を測定した結果、隔膜の膜厚、空気層の厚さに依らず、 T_r の実験式は EC の mass thickness T_m に対して次式で表せることが確かめられた¹⁴⁾。

$$T_r = \exp(-\rho T_m) \quad (2)$$

ここで、検出開き角 α に依存する吸収係数 ρ をあらかじめ測定しておけば、 T_r の測定により圧力 P は次式で求められる。

$$P = -(\ln T_r / \rho + 2n \cdot t) / n_g \cdot T_g \quad (3)$$

ここで、 n , t は隔膜の密度と厚さ、 n_g , T_g はガス層の密度と厚さである。

この関係を気体だけでなく液体の極薄層を含む mass thickness の領域まで外挿すれば、液層の厚さを推定することも可能と考えられる。蒸留水に懸濁したポリスチレン・ラテックス球 (0.314 μmφ) を観察した例を、図9に示す。液

層の厚さは、EC の mass thickness 対電子線透過率の関係を外挿して、1.5 μm と推定される。

7. おわりに

これまで、TEM はその高分解能性能を武器にして各種材料の微細構造解明に貢献してきた。しかしながら、TEM の宿命である鏡筒内の高真空環境は、生物試料をはじめとする含水試料の自然状態での観察を拒んできた。これに立ち向かう研究者の長年の努力により、ハード、ソフトの両面において含水試料観察のための多くのハードルがクリアされ、近年では汎用性のある隔膜型 EC が商品機として供給されるようになり、また、簡便性の高い密閉型 EC の安定利用も可能となった。観察・記録時の試料損傷回避法や高感度動画像記録法などの関連技術と連携してこの技術を利用することで、生物試料や各種機能性材料をより自然な状態に維持したまま、その機能や特性を解明・評価し、新たな知見を得ることが期待される。

文 献

- 1) Abrams, I.M. and McBain, J.W.: *J. Appl. Phys.*, **15**, 607-609 (1944)
- 2) Heide, H.G.: *J. Cell Biol.*, **13**, 147-152 (1962)
- 3) Butler, E.P. and Hale, K.F.: in *Glauert, A.M. (Ed.), Practical Methods in Electron Microscopy*, Vol. 9, Dynamic Experiments in the Electron Microscope, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, AMSTERDAM, 1981, Chapter 5 and 6
- 4) 石川 晃: 顕微鏡, **39**, 99-104 (2004)
- 5) 箕田弘喜, 稲吉悠里, 湯本史朗, 田之倉優, 小林孝和, 秋元 剛, 杉 晴夫: 日本顕微鏡学会 第 63 回学術講演会予稿集, 2007, p. 96
- 6) Kawasaki, T., Ueda, K., Tanaka, H., Tanji, T. and Ichihashi, M.: *Microscopy and Microanalysis*, **13** (Suppl. 2), 644CD-645CD (2007)
- 7) Okudera, K., Shiomi, N., Hamada, K., Suda, T., Ohnuki, S., Kawai, Y. and Kojima, Y.: Proc. 16th Int. Micros. Congr., Sapporo, 2006, Vol. 3, p. 1981
- 8) Giorgio, S., Sao Joao, S., Nitsche, S., Chaudanson, D., Sitja, G. and Henry, C.R.: *Ultramicroscopy*, **106**, 503-507 (2006)
- 9) Fukami, A. and Murakami, S.: *J. Electron Microsc.*, **28**, supplement, S-41-S-48 (1979)
- 10) 福島球琳男, 深見 章: 電子顕微鏡, **24**, 20-32 (1989)
- 11) Ishikawa, A. and Miyata, H.: Proc. China-Japan Joint Seminar on Atomic Level Characterization-2002, Guilin, 2002, p. 20-25
- 12) 上田浩大, 川崎忠寛, 長谷川準, 丹司敬義, 石川 晃: 第 67 回応用物理学会学術講演会 2 (2007) 725
- 13) Ishikawa, A.: Proc. 16th Int. Micros. Congr., Sapporo, 2006, Vol. 2, p. 984
- 14) Ishikawa, A. and Miyata, H.: Proc. 8th Asia-Pacific Conf. Electron Microsc. (Kanazawa, 2004) 294-295