

## 大気に開放された試料室を持つ大気圧走査電子顕微鏡の開発

## Atmospheric Scanning Electron Microscope System with an Open Sample Chamber

西山 英利<sup>a</sup>, 小泉 充<sup>b</sup>, 小川 康司<sup>b</sup>, 北村 真一<sup>a</sup>, 小入羽祐治<sup>a</sup>, 須賀 三雄<sup>a</sup>, 佐藤 主税<sup>c</sup>  
Hidetoshi Nishiyama, Mitsuru Koizumi, Koji Ogawa, Shinich Kitamura, Yuji Konyuba, Mitsuo Suga and Chikara Sato

<sup>a</sup> 日本電子(株)

<sup>b</sup> 日本電子テクニクス(株)

<sup>c</sup> 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門

**要旨** 大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) と光学顕微鏡を搭載した装置について、改良・追加された機能を述べる。試料は、大気に開放された薄膜ディッシュ上におかれる。ディッシュ底には電子線を透過可能な薄膜があり、その上に置く試料は液体に浸された状態でも良い。薄膜ディッシュは、倒立型 SEM 鏡筒の先端に設置され、鏡筒内を真空中に保つシールの役割も果たす。また、薄膜ディッシュの上方には光頭を搭載しており、上から光頭像、下から薄膜を通して電子線を試料に照射し SEM 像の取得ができる。改良・追加された機能は、モーターステージ、万が一の薄膜破壊に備えた鏡筒汚染保護機構、装置を制御するグラフィカルユーザーインターフェイスである。本装置は、ASEM 観察しながらの試薬の投与を可能にし、体積変化のある現象にも対応できる。このような利点により、液中のシリカ粒子のランダムな運動を観察しながら、食塩水を滴下した際の反応を観察できた。

キーワード：電子顕微鏡，環境セル，ランダム運動，大気，ASEM

## 1. はじめに

光学顕微鏡（光頭）と違い、電子顕微鏡は試料室を真空にする必要がある。そこで、真空中でも試料が変形しないように、液体を含む試料に対して時間と手間が必要な観察前処理（例：脱水・乾燥・樹脂包埋）を行っている。これらの処理は、繊細な構造に影響を及ぼす可能性がある。さらに、真空室内では液体が蒸発するため、液中での動的な現象の観察は困難であった。このような困難を克服するために、電子線透過膜を持つ小さな環境セルが、透過電子顕微鏡<sup>1~4)</sup> (TEM) や走査電子顕微鏡<sup>5,6)</sup> (SEM) 用に開発された。しかし、内部の試料室の空間は狭く（例：20  $\mu\text{l}$ ）、使い勝手が悪かった。このような環境セルの欠点を補うために、大気に開放された試料室を持つ ASEM (Atmospheric SEM)<sup>7~12)</sup> は開発された。本論文では、追加・改良された機能と、開放試料室の特徴を生かしたリアルタイムなその場観察の結果を報告する。ASEM を用いた新たな応用を期待させるものである。

## 2. 装置

## 2.1 ASEM の基本構成

ASEM と光頭を複合した装置 (ClairScope, JASM-6200 (日本電子)) を図 1A に示す<sup>7)</sup>。本装置は倒立させた SEM (ASEM) を有し、試料を載せる薄膜ディッシュは ASEM 鏡筒先端に

置く (図 1B, C)。薄膜ディッシュは、直径 35 mm 高さ 13 mm のポリスチレン製で中心に SiN 薄膜 (100 nm 厚, 0.25 mm 角) 窓を加工した 4 mm 角の Si チップを組み込んであり、装置から取り外し可能である (図 2A-D)。薄膜ディッ

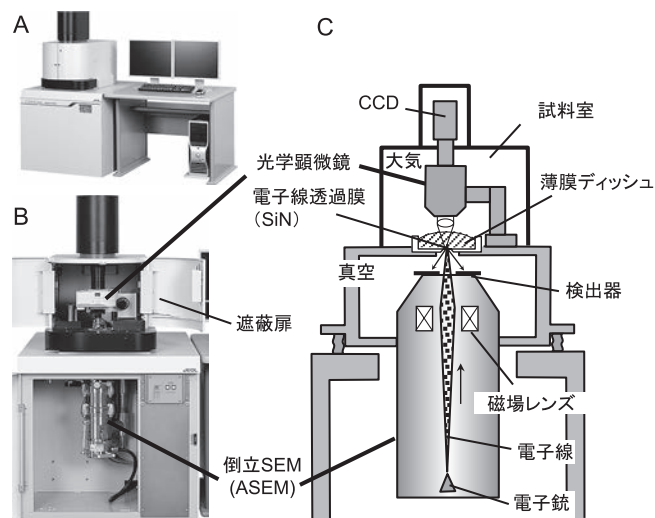


図 1 ClairScope, JASM-6200. (A) 装置外形, モニターには光頭と SEM を制御する GUI が表示される。(B) パネルを開けた内部。(C) 構成図。本装置は、倒立 SEM (ASEM) と光頭から構成されている。光頭を ASEM と対向して設置し、取り外し可能な試料ホルダー (薄膜ディッシュ) を両装置の間に配置する。両顕微鏡の中心には、常に同じ視野が写る。

<sup>a</sup> 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2  
2014 年 1 月 16 日受付

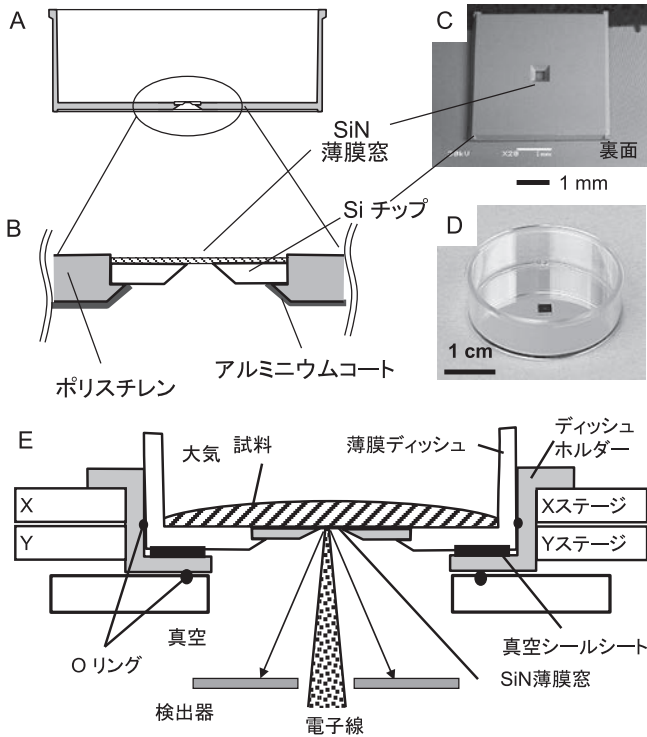


図2 薄膜ディッシュ (A, D) は、直径 35 mm、高さ 13 mm のポリスチレン製である。電子線透過膜の SiN 薄膜は、SiN を成膜した Si 基板 (シリコンチップ) で、Si 側を一部ウエットエッチングすることで形成する (C)。その Si チップを、ディッシュの中央に開けた穴を塞ぐように SiN 膜面を上部にして接着する (B, D)。観察の際、薄膜ディッシュはディッシュホルダーに保持され (E)、ディッシュホルダーは xy ステージ上に載っている。

ディッシュの外側底面は、ASEM 撮像中の帯電を防止するため、アルミニウムでコートしてある。ASEM 観察時は、薄膜ディッシュ下の ASEM 鏡筒内を真空にする。そして、電子線を下から薄膜を透して試料に照射し、試料からの反射電子を検出する (図 2E)。また、薄膜ディッシュ上部に設置した光頭は、ASEM と機械的に光軸を合わせてある。なお、薄膜透過後の

電子線は試料によって散乱されるので、ASEM の観察可能な深さには限度があり 2 ~ 3  $\mu\text{m}$  (試料が水の場合) と推測される<sup>7)</sup>。一方、光頭ではフォーカス調整で観察高さを変えることができるので、ASEM と同一部分を観察するには注意が必要である。

## 2.2 新たに加わった機能

### 2.2.1 SiN 薄膜破壊時の鏡筒保護機構

ディッシュの薄膜は一気圧の圧力差に対して十分な耐性がある。しかし、この薄膜は機械的な刺激に対しては弱い。それゆえに、偶発的な破壊、例えばピペットを用いた試料への試薬滴下の際に、その先端が薄膜に接触することを避ける必要がある。このような事態に備えて鏡筒の汚染保護機構として、薄膜ディッシュ直下に備えたシャッター (数 ml の容量を持つ皿付)、鏡筒内のオリフィス付きインナーパイプを開発した (図 3A)。薄膜が破壊された後、真空計が真空チャンバー内の圧力上昇を検知し、シャッターが瞬時に薄膜ディッシュの直下に移動し ASEM 鏡筒の先端を閉鎖する (図 3B, #1)。これにより、薄膜ディッシュから流入する液体を皿で保持する。電子銃の電圧は切られ、エアリークバルブが開放される (#2)。シャッターが閉鎖される前に、ASEM 鏡筒にわずかな液体が到達した場合も、それはインナーパイプ内のオリフィスで止まる (#3)。その後、検出器、シャッター、そしてインナーパイプを交換することで装置の復帰が可能である。

### 2.2.2 試料ステージ

薄膜ディッシュは、試料ステージのディッシュホルダー上に置かれ、真空を保持するため円形状の真空シールシートと O リングでシールされている (図 2E)。試作機<sup>7)</sup>では、試料ステージは手動で操作する必要があった。しかし、改良した本装置ではモーターを用いて移動可能 (x, y 共に  $\pm 2.5 \text{ mm}$ ) で、グラフィカルユーザーインターフェイス (GUI) 上で制御できる。

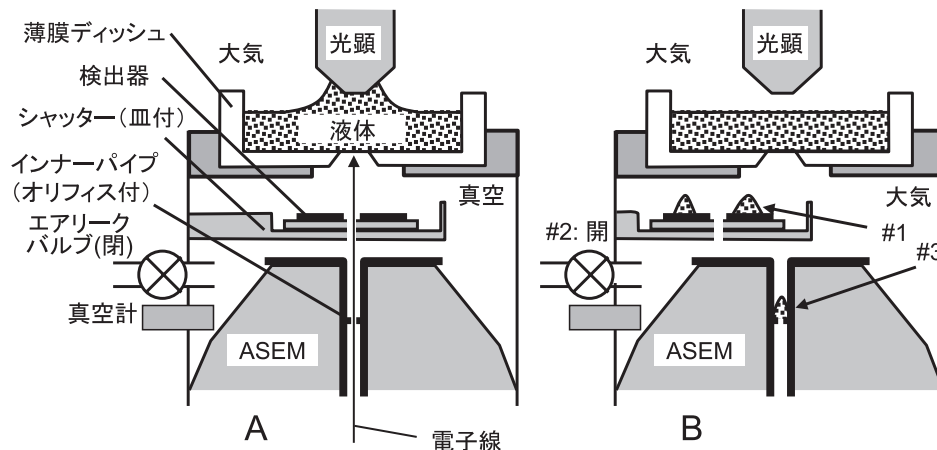


図3 ASEM 鏡筒の汚染保護機構。汚染保護機構は、真空計、エアリークバルブ、皿状のシャッター、そしてオリフィスの開いたインナーパイプから構成されている。(A) ASEM 観察状態。(B) SiN 薄膜が破壊された直後の状態。エアリーク (#2) により試料の侵入を最低限にし、侵入した試料を皿 (#1) とオリフィス (#3) で保持している。

### 2.2.3 光学顕微鏡

光頭は、落射投光管 (BX-RFAA, オリンパス, 図 1B, C), x40 水浸対物レンズと水銀ランプから構成されている。落射投光管には、六個の蛍光ミラーキューブと六個の ND (Neutral density) フィルターを搭載可能である。光頭像は、1600 × 1200 pixel CCD camera (Retiga 2000R, Qimaging) で撮像する。

### 2.2.4 試料室扉

試作機の試料室は三つの扉が付いており、それぞれの間には柱があった (文献<sup>7)</sup> の Fig. 1D)。これら柱は、薄膜ディッシュ交換で手を入れる際に邪魔になる。本装置ではこの柱を無くし、正面に両開きの扉を設けた (図 1A, B)。これにより、扉をあけて、容易に両手を試料室に入れて薄膜ディッシュ交換や試料への試薬滴下ができるようになった。また、この試料室は、光頭で蛍光像を取得する際には暗室になるとともに、ASEM 撮像では放射線防護の役割も果たす。なお、ASEM 観察時には安全のため、扉にロックがかかる。

### 2.2.5 グラフィカルユーザーインターフェイス (GUI)

ASEM と光頭は GUI を用いて二つのディスプレイ上で操作する (図 1A)。右のディスプレイは ASEM 用、左は光頭用である。ASEM GUI では、電子銃、走査時間、アベレーシング、フォーカス、そしてダブルクリックによるステージの目的地への移動等を制御する。光頭 GUI では、蛍光ミラーキューブと ND フィルターの切り換え、フォーカス、CCD の露光時間、明るさ、コントラスト等を制御する。

### 2.3 開放試料室の特徴を生かした ASEM 観察中の試薬滴下例

直径 1  $\mu\text{m}$  のシリカ粒子を 2.5 mg/ml になるように水と混ぜてけん濁分散液とした。この溶液 1 ml を薄膜ディッシュ上に置いた。さらに、長いシリコンチューブの一端を薄膜ディッシュの上に固定し、もう一方に扉外に置いたシリンジをつないだ。ここでは、チューブ内に数十  $\mu\text{l}$  の飽和食塩水を満たし、ASEM で連続観察しながら、食塩水を試料に滴下した。ASEM の動画撮像条件はフレームレート 0.075 秒 (アベレーシング無)、加速電圧 30 kV、照射電流値 1.2 nA である。

## 3. 結果と考察

### 3.1 SiN 薄膜破壊後の装置復旧

鏡筒保護機構の確認のため、薄膜ディッシュに 4 ml の水、リン酸緩衝液、もしくは培養液を入れ、SiN 薄膜を意図的に機械的な接触により破壊した。この鏡筒保護機構は、即座に破壊を検知し、「2.2.1 SiN 薄膜破壊時の鏡筒保護機構」と図 3 に記載したように働いた。検出器、シャッター、そしてインナーパイプを交換することで、ASEM を復旧させることができた。

### 3.2 液中に分散している粒子への食塩水滴下による反応

水中のシリカ粒子の運動を、ASEM で動画撮像した。図 4A と B に 2 秒の間隔で動画から切り出した像を示す。多数の 1  $\mu\text{m}$  シリカ粒子を確認でき、粒子の全てがランダムに運動している。数十  $\mu\text{l}$  の飽和食塩水を加えたところ

(図 4C)、シリカ粒子の運動速度は徐々に遅くなっていった。食塩水滴下から 15 秒後、食塩水中のイオンによって粒子の持っている電荷が失われ粒子間の静電反発力が弱まり、粒子は粒子同士で凝集し、さらに SiN 薄膜へ吸着し、ほとんど停止した (図 4D)。さらに 10 秒経過しても (図 4E)、粒子の位置は変化しなかった。

これに対して、環境セルを用いて試料に試薬を滴下するには、顕微鏡の外からシリンジにつないだ細いチューブをセルにつなぐ必要がある。しかし、シリンジから圧力をかけてセル内に試薬を注入した際に、チューブが細いため内圧が高い状態がしばらく続く。その結果、試薬の流れをすぐには止めることができず、注入した正確な量を把握できない。また、セル内圧がさらに上昇するため薄膜が破壊される恐れもある。一方、ASEM の大気に開放された試料室では試料室内圧力が高くなることは無く、シリンジや自動ピペット装置を用いて試薬滴下を正確に行いつつ、その場観察を実現できる。

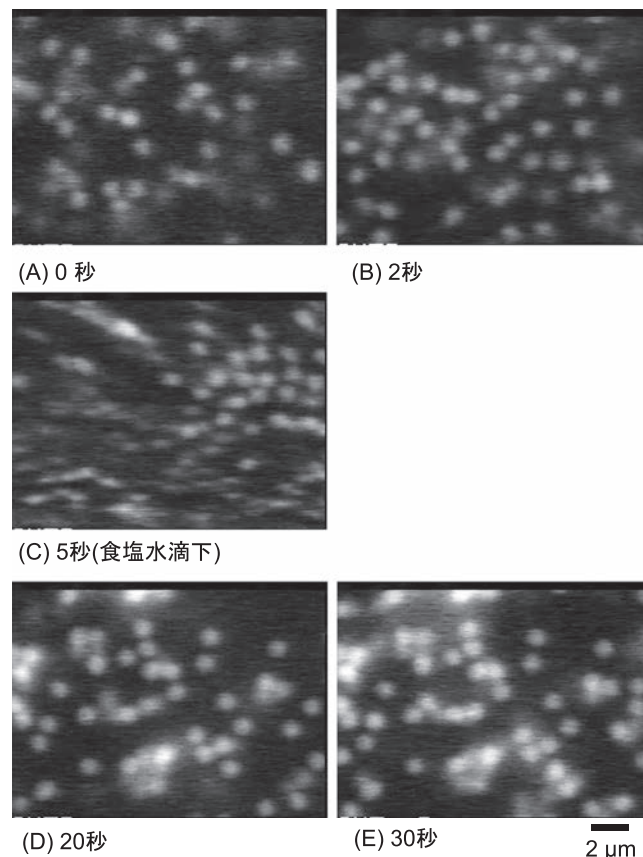


図 4 水中に分散したシリカ粒子の運動と食塩水滴下の影響。ASEM で撮像した動画から切り出した像を示す。(A, B) 粒子はランダムに運動しているため、それらの位置は A の 2 秒後の B では全く異なり、運動はランダムであった。(C) 運動をモニターしてから 5 秒後に、飽和食塩水を薄膜ディッシュ内に滴下した。(D) シリカ粒子の運動は徐々に低下し、食塩水の滴下から 15 秒後には粒子間の凝集や SiN 薄膜への吸着が起こる。(E) さらに 10 秒経過してもそれら粒子の位置は変化しなかった。

#### 4. まとめ

ClairScope の使い勝手向上のため、偶発的な薄膜破壊時の鏡筒保護機構、光頭と ASEM を机上で操作可能な GUI とモーターステージ、試料へアクセスを容易にする両開きの扉を新規に採用した。ASEM は試料室を真空にする従来の SEM では観察できなかった様々な試料・現象を観察することができる。そのため、生物や材料科学の分野で重要なツールになると考えている。

#### 謝 辞

ClairScope 開発では、産業技術総合研究所の小椋俊彦博士、製造では、日本電子と日本電子テクニクスの皆様、薄膜ディッシュの開発では山形県工業技術センターの渡部善幸博士、小林誠也博士、岩松新之輔氏、阿部泰博士、矢作徹氏に御協力していただきました。皆様方に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Butler, K. and Hale, F.: in Glauert, A.M. (Ed.), *Dynamic experiments in the electron microscope*, in *Practical Methods in Electron Microscopy*, Elsevier Science, New York (1981)
- 2) Creemer, J.F., Helveg, S., Hoveling, G.H., Ullmann, S., Molenbroek,

- A.M., Sarro, P.M. and Zandbergen, H.W.: *Ultramicroscopy*, **108**, 993–998 (2008)
- 3) de Jonge, N., Peckys, D.B., Kremers, G.J. and Piston, D.W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 2159–2164 (2009)
- 4) Zheng, H., Smith, R.K., Jun, Y., Kisielowski, C., Dahmen, U. and Alivisatos, A.P.: *Science*, **324**, 1309–1312 (2009)
- 5) Green, E.D. and Kino, G.S.: *J. Vac. Sci. Technol. B*, **9**, 1557–1558 (1991)
- 6) Thiberge, S., Zik, O. and Moses, E.: *Rev. Sci. Instrum.*, **75**, 2280–2289 (2004)
- 7) Nishiyama, H., Suga, M., Ogura, T., Maruyama, Y., Koizumi, M., Mio, K., Kitamura, S. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **169**, 438–449 (2010)
- 8) Murai, T., Maruyama, Y., Mio, K., Nishiyama, H., Suga, M. and Sato, C.: *J. Biol. Chem.*, **286**, 1999–2007 (2010)
- 9) Suga, M., Nishiyama, H., Konyuba, Y., Iwamatsu, S., Watanabe, Y., Yoshiura, C., Ueda, T. and Sato, C.: *Ultramicroscopy*, **111**, 1650–1658 (2011)
- 10) Maruyama, Y., Ebihara, T., Nishiyama, H., Suga, M. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **180**, 259–270 (2012)
- 11) Sato, C., Manaka, S., Nakane, D., Nishiyama, H., Suga, M., Nishizaka, T., Miyata, M. and Maruyama, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 1213–1218 (2012)
- 12) Verch, A., Morrison, I.E., Lochter, R. and Kroger, R.: *J. Struct. Biol.*, **183**, 270–277 (2013)