

平成 26 年度名古屋大学技術職員研修(分析・物質コース)

SEM 講習受講報告

板倉広治^{A)}、[○]河合ゆかり^{B)}、高木菜都子^{B)}

^{A)} 医学系技術支援室 生物・生体技術系

^{B)} 教育・研究技術支援室 分析・物質技術系

概要

平成 26 年 9 月 24 日から 9 月 26 日にかけて、名古屋大学技術職員研修(分析・物質コース)が名古屋大学東山地区で開催された。研修は講義と実習により SEM、NMR、MS 等の各分析法について学ぶ形式であった。このうち、SEM の講習として、9 月 25 日と 26 日、専門講義「SEM による分析技術の基礎と応用」と実習「SiN 膜を透したサンプルの観察と試料カプセルの作製」「SiN 膜の試料カプセルを用いたサンプルの観察」がグリーンモビリティ連携研究センターにおいて行われた。本報告では、実習結果を中心に SEM 講習の受講内容を報告する。

1 講習の目的

講習では、まず講義によって SEM の概要、原理を学び、次に実際に SEM を用いて試料を観察しながら、SEM の基本的な操作や試料の準備等の作業を身につける。

また、生体試料やそれを模した液体中試料を用いて、前処理不要の簡易な試料作製方法・観察を体験する。

通常、生物・生体系試料を SEM で観察するには、高真空中で試料がダメージを受けないようにするため、固定(グルタルアルデヒド溶液やオスミウム溶液を用いる)、脱水、乾燥、コーティング等の前処理が必要となる。前処理と試料作製には多くの時間を必要とするが、今回の実習では、工学系技術支援室において試作された、SiN 膜カプセルを用いた試料の観察方法を試し、乾燥等の前処理なしに生物・生体系試料を SEM で観察する手法を体験する。生物・生体系試料を前処理なしでそのままの状態を観察することが可能になれば、試料の作製時間を大幅に短縮することができる。また、熟練が必要な脱水・乾燥等の工程が不要になることで、再現性良く試料観察を行うことができると期待される。

2 走査電子顕微鏡(SEM)での観察について

まず、走査電子顕微鏡(SEM : Scanning Electron Microscope)の原理と、今回使用する大気圧走査電子顕微鏡用の市販の窒化シリコン(SiN)膜の概要、SiN 膜を使用したサンプルカプセル作製について講義を受けた。

2.1 SEM 観察の原理

SEM は、光源に可視光に比べて波長の短い電子を用いることで、光学顕微鏡では観察不可能な微細な表面構造の観察を可能としている装置である。電子銃で発生させた電子を磁界レンズにより細く絞り、試料表面を走査(Scan)することで画像を得ている。(図 1. 左)

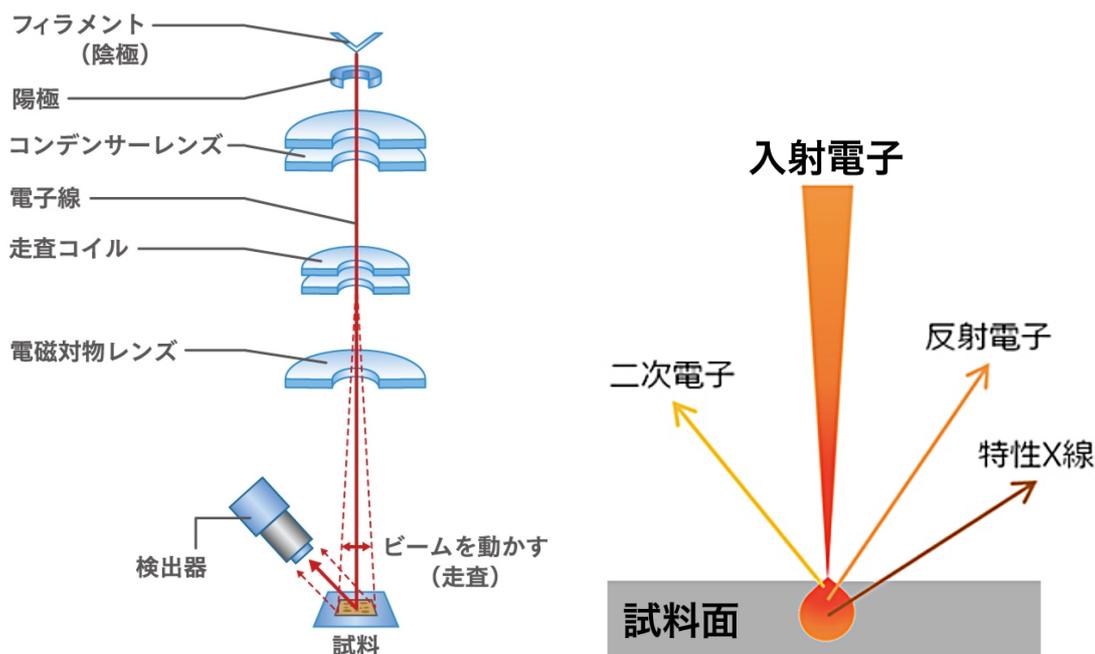


図 1. SEM のしくみ(左)と試料から得られる信号(右)

試料上の電子線が照射された部分からは、二次電子、反射電子、特性 X 線、光など種々の信号が、試料の形態、試料物質の密度、あるいは試料に含まれる元素に応じて放出される。(図 1. 右)

SEM では通常、二次電子を検出して画像を作り観察している(SE : Secondary Electron 像)。電子銃から照射された電子線が試料中の別の電子を叩き出したのが二次電子である。二次電子は電子プローブが試料表面に入射する際の角度によって発生強度が変わるため、試料表面の微細な凹凸を二次電子の強弱として検出し表すことができる。

これに対し、照射した電子が試料表面で反射されたもの(実際には後方散乱)が反射電子である。反射電子は試料を構成する元素により発生量が異なり、原子番号が大きいほど発生量が多くなる性質を持っているため、試料中の組成分布を確認する手法として良く使われている。反射電子によって得られた画像を反射電子像(BSE : BackScattered Electron 像)という。

また、SEM では通常、電子線の発生源である電子銃(フィラメント)から安定的に電子線を放出させるため、電子線の光路および試料室内部を高真空に保つ必要がある。(図 2. 中央)

2.2 ASEM の原理と SiN 膜カプセルを用いた観察の概要

近年、大気圧下で液体に浸された試料の観察ができる大気圧走査電子顕微鏡装置(ASEM : Atmospheric Scanning Electron Microscope)が、開発・販売されている。この装置は、試料室が大気開放されており(図 2. 左)、生物試料などの水分を含んだサンプルを真空雰囲気下に置く必要がないため、試料の脱水・乾燥等の面倒な前処理を行うことなくそのままの状態を観察が可能である。また、外部より試薬の滴下や蒸発を行うことが可能で、滴下後の反応や蒸発に伴う反応をその場で観察することも可能である。

ASEM を用いれば生物試料の観察がより簡単に行えるが、一方でこのような装置を新規で導入することは容易ではない。そこで、工学系技術支援室において、現有する通常の SEM を用いて、高真空の試料室内に「大気圧のまま液体試料を封じたカプセル」を導入し観察する手法が検討・試行された(高田ら, 2014)。この手法では、カプセルの内部は大気圧に保たれたままであるため(図 2. 右)、通常の SEM で擬似的に ASEM のような前処理の必要ない液体中試料の観察が可能である。カプセルの封入には、ASEM での観察において大気と真空の分離に使用されている SiN 膜を用いる。

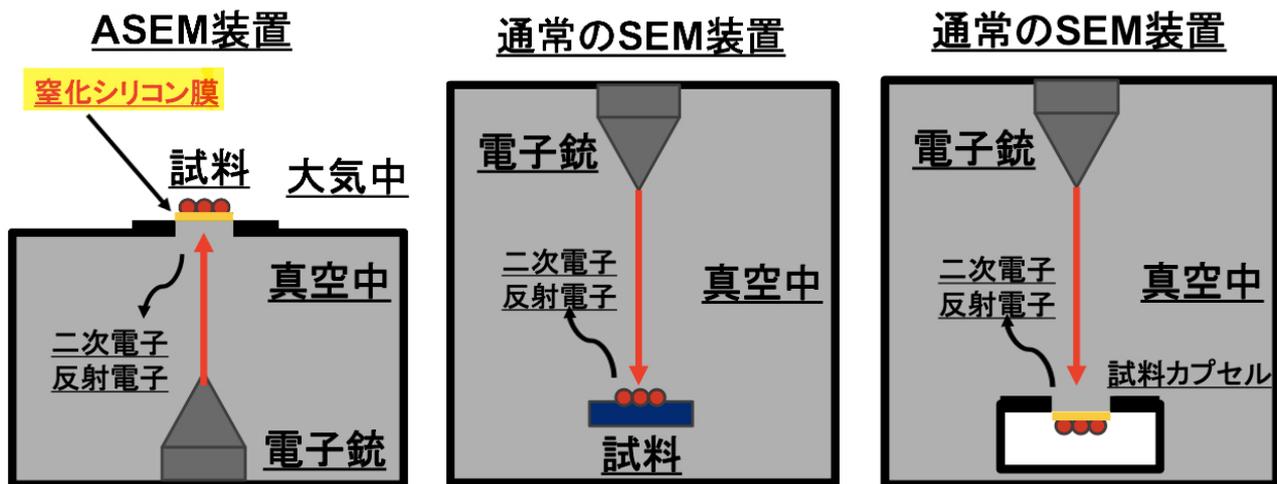


図 2. ASEM 模式図(左), 通常の SEM 模式図(中央), 通常の SEM に試料カプセルを導入した模式図(右)

講習に用いた SiN 膜とサンプルカプセルは、真空中に置かれても壊れないような圧力設計になっている(図 3.)。今回使用した SiN 膜は 100nm の厚みで枠サイズが 0.5mm のものを選んだ。膜側が高圧側になるようにして、膜の耐圧が 1 気圧以上になるような膜厚と枠サイズの組み合わせで SiN 膜の選定をするとよい。

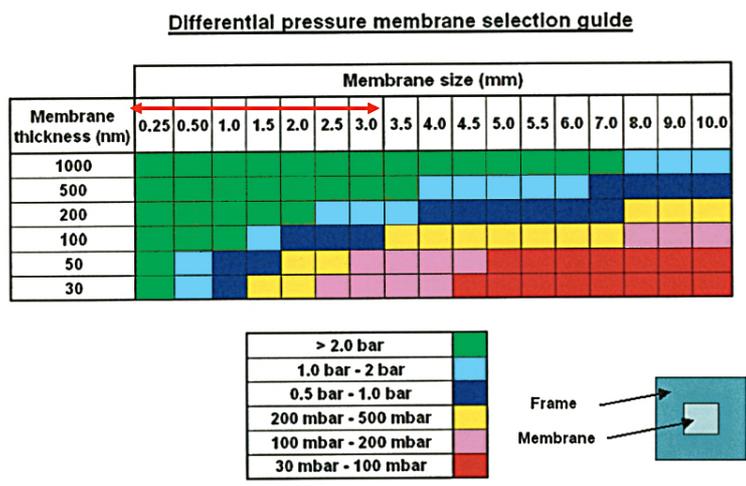


図 3. 膜厚と観察領域の選定

3 試料準備

まずは前処理をしないでサンプルステージに生物試料や材料試料をのせ、その上に SiN 膜を置き透過して試料が問題なく観察できることを確認しながら SEM 操作の基本を学ぶ。

次に実際に SiN 膜を用いたカプセル内部に生物試料(もしくは生物試料を模擬した液体試料)を封じ、このカプセルを SEM に導入し観察することで、通常の SEM で ASEM を使用したときのような特別な前処理なしの液体試料観察が可能であることを体験する。

3.1 SiN 膜の電子透過性の確認

真鍮のサンプルステージ(直径 10mm, 高さ 5mm)にカーボンテープで試料を貼付けて固定し、その上に SiN 膜をかぶせる。試料にはタンポポ(生物試料)や金粒子(材料試料)を用いた。SiN 膜は Silson 社製(ウィンドウサイズ 0.5mm×0.5mm、膜厚 100nm、フレームサイズ 5.0mm×5.0mm)のものを使用した。

3.2 カプセルを用いた試料観察

合金製のサンプルホルダーに試料を入れ、SiN 膜により蓋をする。試料にはタンポポや、生物試料の模擬として、金コロイド溶液、シリコングリース(TORAY)に分散させた金粒子などを用いた。試料は膜越しに観察しやすいよう、なるべく膜表面に張り付けるようにして封入する。SiN 膜のフレームとサンプルホルダーは真空シール材により接着しカプセルとする。真空シール材にはトールシール(VARIAN)、SiN 膜は上記の電子透過性の確認に用いたものと同じものを使う。トールシールが硬化するまで丸一日乾燥させる。

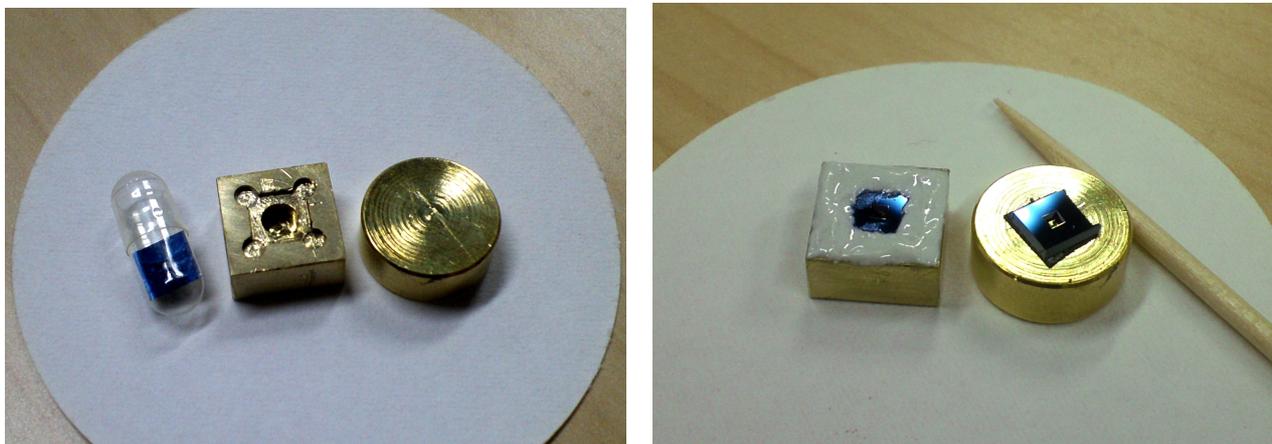


図 4. 使用した SiN 膜・サンプルカプセル・サンプルステージ(左上)、
完成したサンプルカプセルとステージ(右上)
生物試料として用いたタンポポ(右下)



4 観察結果

試料の観察には、工学系技術支援室・グリーンモビリティ研究連携センター内で保有する株式会社日立ハイテクノロジーズの走査電子顕微鏡 S-4800(FE-SEM)(図 5.)を使用した。



図 5. 使用した走査電子顕微鏡(S-4800 日立ハイテクノロジーズ)

4.1 SiN 膜の電子透過性の確認

真空雰囲気下でSiN膜を通して金粒子試料を観察したところ、加速電圧30kVでは鮮明な像が観察された(図6. 左)。金粒子の凝集している様子がはっきりと見え、粒子ひとつひとつの形状も判別でき、膜の存在を感じさせない画像である。

一方、同じ試料でも加速電圧を10kVに下げると、奥にある粒子はぼやけて見えなくなり、画像は鮮明さを欠く(図6. 右)。

加速電圧を上げることで膜越しでも電子が到達し、十分観察が可能であることが分かる。観察はいずれもSE像により行った。

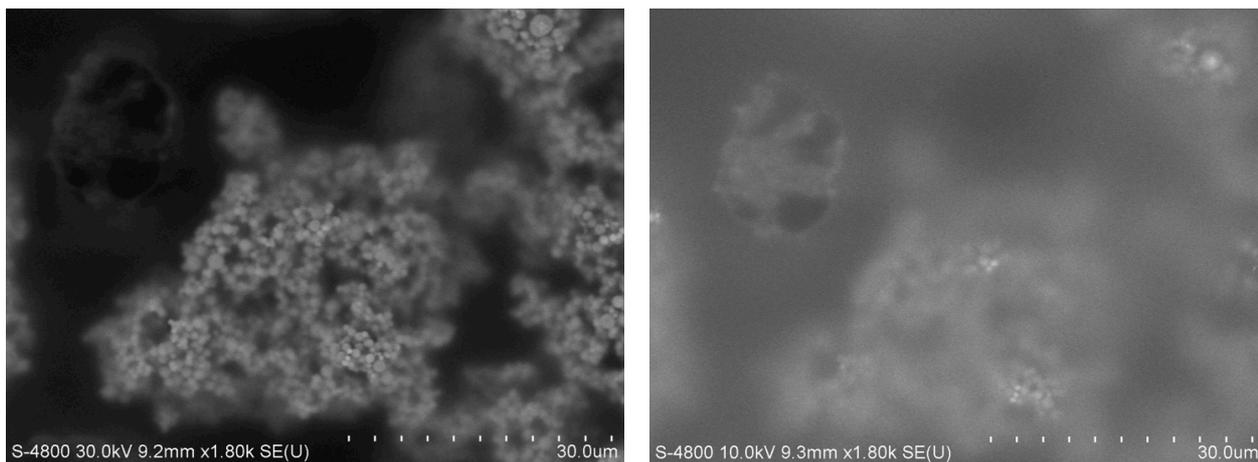


図 6. SiN 膜を通しての金粒子の観察 加速電圧 30kV(左)、10kV(右)

次に、タンポポの雌しべの上に SiN 膜をのせ、加速電圧を変えて SE 像で観察した写真を示す。サンプルカプセルに入れていないので真空引きされて試料の収縮が見られる。また、コーティングを行っていないため、電子ビームによりチャージして白く見えているところがある。特に高電圧にした際に強くチャージした(図7. 左)。ある程度加速電圧を上げないと電子が膜を透過しないため像が観察できないが、生物試料の場合は電圧を上げすぎるとチャージすることが解った。高倍率でも同様の状況であった。

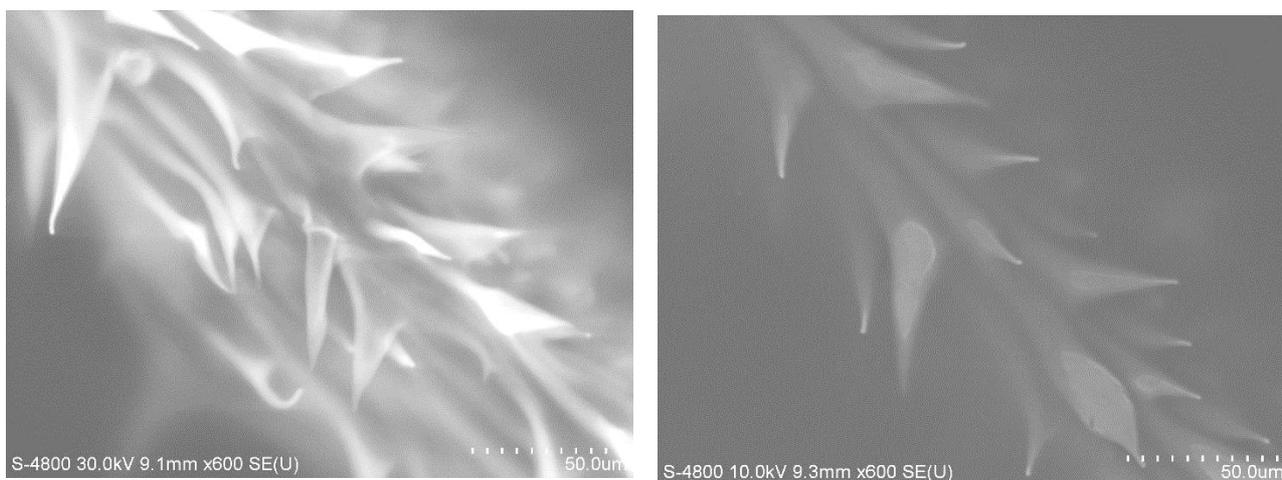


図 7. SiN 膜を通してのタンポポの観察 加速電圧 30kV(左)、10kV(右)

4.2 カプセルを用いた試料観察

SiN 膜の電子透過性検証の結果をふまえ、加速電圧 30kV 以上で生物試料の観察を行った。

図 8. にサンプルカプセル中にタンポポ花卉を入れた試料、図 9. に金コロイド溶液を入れた試料の SE 像(左)と BSE(右)をそれぞれ示す。乾燥などの前処理を行っていないが、カプセル中の花卉は収縮して潰れたりせず、観察できる程度の原型を保っているように見える。サンプルカプセルの観察では、SiN 膜に試料を密着させるためにグリースを使用しており、タンポポの花弁にグリースが付いているので花弁の表面なのかグリースなのか判断が難しかった。SiN 膜に試料がしっかり付いていないと像を観察することができないことが解った。

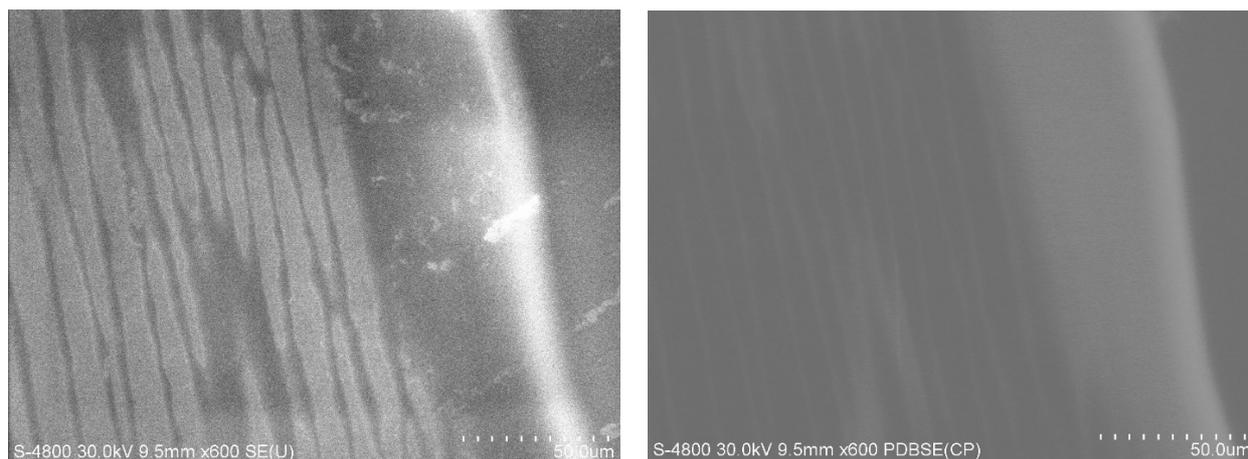


図 8. サンプルカプセル中のタンポポ花卉の SE 像(左)と BSE 像(右)

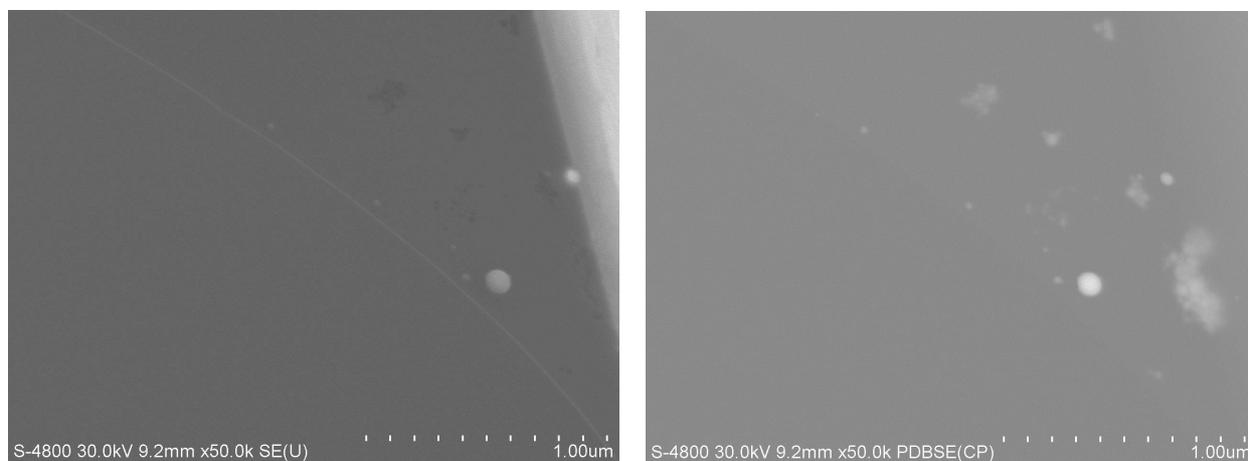


図 9. サンプルカプセル中の金コロイド溶液の SE 像(左)と BSE 像(右)

膜がカプセル内の大気圧で歪んでチャージアップする等の様子が見られたため、BSE 像、compo 像での観察も行った。compo 像は、BSE 像から凹凸情報を打ち消して組成情報のみを得たものである。BSE 像、compo 像はともにエッジコントラストが小さく、チャージアップの影響が少ないなどの利点がある。

BSE 像や compo 像では、組成情報を反映して、原子番号の大きい重い元素ほど明るく見える。今回の観察においても、金粒子が明るく光ったように表示される様子がよくわかった。(図 9. 右)

一方、生物試料などは、金粒子に比べて軽い元素しか含んでおらず、元素組成差も少ないため、組成情報である BSE 像や compo 像を鮮明に得ることは難しい。実習においてもカプセル内にタンポポを入れた試料は compo 画像が不鮮明で(図 8. 右)、組成像観察には向かないことが分かった。

5 まとめ

今回の実習では、SEM の試料の準備から観察まで、一連の操作を実際に体験し、SEM の基礎を身につけることができた。

また、ASEM がなくてもサンプルカプセルを用いる等工夫することによって通常の SEM で大気圧下の生体試料や液体中試料が観察可能であるとわかった。金コロイド溶液の観察など、用途によっては今まで観察出来なかった像を観察できるようになるかもしれない。また、生物系試料、材料系試料とも、加速電圧を上げるほど解像度が上がるのがわかった。材料系の試料の場合は二次電子だけでなく、反射電子を利用することで、より多彩な観察が可能になると考えられる。

今回の実習では、生物試料の観察においては電圧を上げすぎると良好な画像が得られないなどといった問題があり、試料作製に少し工夫が必要な点があった。トールシールの硬化時間やカプセルの素材、SiN 膜の膜厚を薄くする等条件を変えることで、改善が可能かもしれない。実習に参加する人数もたくさんいたので、一人一人の観察時間を取ることが難しかったが、もう少しじっくりと SEM の観察ができるとよかったと思う。

6 謝辞

本稿をまとめるにあたり、資料をご提供して頂きました工学系技術支援室(分析・物質技術係)高田昇治様、走査電子顕微鏡の操作方法をご指導して頂きました工学系技術支援室(分析・物質技術係)高井章治様、その他の研修でお世話になりました担当職員の皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

- [1] 高田昇治, 高井章治, 永田陽子, 日影達夫, 西村真弓, 山本悠太, 林育生, 神野貴昭, 樋口公孝, “汎用走査型電子顕微鏡を用いた液体中試料観察用カプセルの開発と考察”, 第9回名古屋大学技術研修会報告, (2014. 3), 名古屋大学全学技術センター(<http://www.tech.nagoya-u.ac.jp/event/h25/kenshu.html>)
- [2] LS-EDI 生命科学教育用画像集, (<http://csls-db.c.u-tokyo.ac.jp/index.html>)
- [3] 東邦化研株式会社 材料解析部, ”SEM の原理”, (<http://www.tohokaken-cat.jp/analysis.html>)
- [4] 徳永誠, “超高分解能走査型分析電子顕微鏡”, CACS FORUM Vol.1, (2010. 12), p66 - 67
- [5] JEOL, “走査型電子顕微鏡(SEM)”, 日本電子 HP(<http://www.jeol.co.jp/>)
- [6] NAN, “分析豆知識”, ナノサイエンス株式会社(<http://www.nanoscience.co.jp/knowledge/index.html>)