

# SEM 用特殊試料ホルダーを用いた TEM 像の観察と実証・応用

高井 章治，永田 陽子，日影 達夫，西村 真弓，荒井 重勇  
工学系技術支援室 分析・物質技術系

## はじめに

本研修の背景として、分析・物質技術系では平成 20 年度より将来を見据えて担当機器はもちろんのことあらゆる分析機器の分析操作を学び、分析や測定に対応出来る技術職員を目指すことを目的として、各種分析機器のトレーニングを行って来たことが挙げられる。現在も各担当の枠を越えて情報交換・分析指導の継続に努めている。時期を同じくして、写真-1 に示すような「SEM（走査型電子顕微鏡）用特殊試料ホルダー」（以後特殊ホルダーと記す）の情報に出会った。

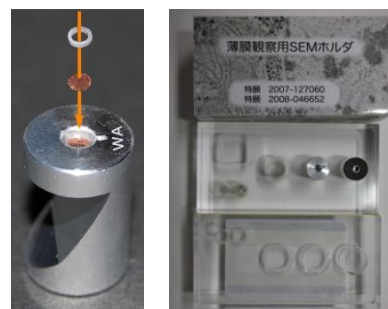


写真-1

平成 19 年実験・実習技術研究会（徳島大学）では、聴講に **特殊試料ホルダー，特許出願** よりその存在を知った。本特殊試料ホルダーは、ほぼ完成されたもので特許出願中のものであり、浜松医科大学の技術職員村中祥悟氏らの開発によるものである。

しかしこの時点では、特殊試料ホルダーの実用性に対して、以下のような理由で深く関心を示さなかった。

- ① 特殊試料ホルダー専用の SEM でないと使えないのではないかな？
  - ② 自作は無理であろうし、入手も難しいだろう？
  - ③ 汎用的な実用性は、どうか？
  - ④ 本当に原理の違う SEM で TEM（透過型電子顕微鏡）像相当の画像が得られるのか？
- などと、積極的に知ろうとしない疑心状態であった。

しかし、平成 20 年度総合技術研究会（京都大学）で、再度聴講の機会を得、その時には、前回と違い、以下の理由で深く関心を持つことになった。

- ① 特許出願中で、市販される見込みであること
- ② どの種の SEM 装置にも対応できる汎用タイプであること
- ③ 材料・寸法など細かな情報も入り自作の可能性もありそうであること
- ④ 本系でも高分子材料等の観察依頼があり、「SEM で薄膜観察が出来る可能性」が現実化したこと

その後は、「どうしても触れてみたい」と、平成 21 年 11 月に浜松医大を訪ね、村中氏のご協力の下、技術交流会で有益な情報とともに実用性の確証を得ることになった。

平成 21 年度、本特殊試料ホルダーを本技術系で入手する運びとなり、つづいて今年度は EDX 用（写真-2）も入手した。



写真-2：  
EDX 用試料ホルダー

本研修では、特殊試料ホルダーを用いて、SEM 装置の取扱いの向上とともにその取扱や観察条件を習得し、実用性を実証するとともに付

随する薄片試料作りも習得できることを目的とした。

## 1. 特殊試料ホルダー使用時の簡単な原理

TEMは、観察対象試料に電子を当てて、透かして観察することになるため、対象試料をできるだけ薄く(厚さ100nm以下)切ったり、電子を透過するフィルムの上に薄く塗りつけたりして観察する。対象試料の構造や構成成分の違いにより、透過電子線の量が異なり、場所により透過してきた電子の密度の違いから、これが顕微鏡像となる。それに対して、SEMは電子線照射により試料表面から二次電子が放出されこれを検出器が捉え像に変換する。

本研修の特殊試料ホルダーを使った場合は、図-1のように薄膜試料を透過した電子が二次電子発生面で二次電子に変換され検出器によっていわば走査透過二次電子像として像を得ることになる。

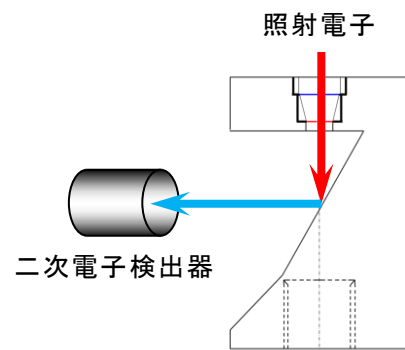


図-1：特殊試料ホルダー使用の走査透過二次電子像の原理

## 2. 研修準備と観察条件

- 2-1. SEM用特殊試料ホルダーは、高解像度用の特殊試料ホルダー(写真-1)とEDX用(写真-2)の2種類を使用した。条件設定の検討では、主に高解像度用の試料ホルダーを用いた。
- 2-2. 使用SEM装置は、日本電子6060型(写真-3)、日立SEMEDX-TypeH形(写真-4)、日立S-800型(写真-5)の3機種を使用した。TEM(透過型電子顕微鏡)像との比較では、TEM装置として日立H-800(200kV)を使用した。



写真-3：日本電子6060型

写真-4：日立SEMEDX-TypeH形

写真-5：日立S-800型

- 2-3. 観察試料は、SEM分解能評価用標準試料(10~100nmSn粒子)とTEM用カーボングレーティング(X:1000,Y:2000/mm)、生物系試料(マウスの小腸、心筋等)、カーボンナノチューブ(40nmφ)等を用いた。

- 2-4. 観察条件として、以下の項目の検討を行った。

- ① グリッド試料観察操作範囲：SEMステージの傾斜・回転・XY方向移動で検討した。
- ② 加速電圧：15kV~30kVの範囲で検討した。
- ③ 作動距離(WD)5~20mmの範囲で検討した。
- ④ 電子プローブ径(スポットサイズ：照射電流が追従)20~50SPSの範囲で検討した。
- ⑤ 各SEM装置での比較：標準試料による分解能評価と生物系試料での画質の比較を行った。
- ⑥ TEM像との比較：日本電子6060型で得られた画像データと比較を行った。
- ⑦ EDX分析の試行：SEM仕様での対試料ステージの位置は、EDX用WD30mmで、日立

SEMEDX-TypeH 形, 日立 S-800 型の両機種で試行的にデータをとったが, EDX 分析のための条件の検討は今回行っていない。

### 3. 研修成果

#### ① グリッド試料観察操作範囲

図-2 に示すように, SEM ステージの傾斜・回転・XY 方向移動を使って観察視野を検証した結果, 図に示すようにグリッド試料のほぼ全域を観察できることが判った。図-2 の左図の状態の時は, 若干明るさが不足するが, 調整によりカバーすることが出来き, 観察条件に大きな影響を及ぼすものではなかった。

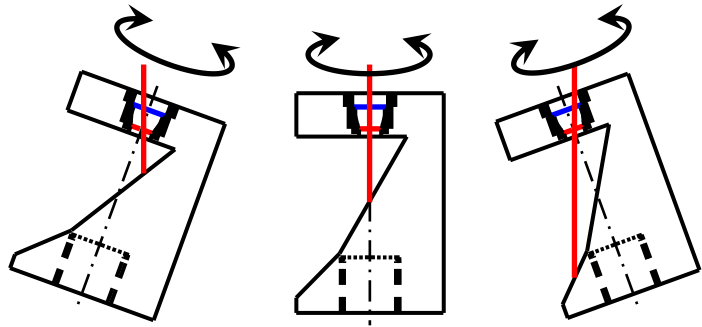


図-2 : SEM 試料ステージの移動による試料ホルダー

#### ② 加速電圧

15kV~30kV の間で検討したが, この範囲では通常の SEM 観察でみられるほどの大きな違いは, 確認できなかった。一般的な影響とされるのと同様に加速電圧が大きい場合は, 試料へのダメージはやはり大きかった。

#### ③ 作動距離

作動距離は 5~20 で検討したが, 20mm 程度で加速電圧が低いと観察像が捉え難い。10mm~5mm で, 加速電圧 20 kV~30kV の間では, ほとんど違いはなく, 影響は少なかった。

#### ④ 電子プローブ径 (スポットサイズ: 照射電流が追従)

低倍率 (×500 以下) で写真-6 に示すようにグリッド上の薄膜試料の存在が確認できなければ, 観察試料像が捉え難い, 本報告ではこの因子が観察条件に大きな影響を与えた。検討結果スポットサイズは, 40~50 前後からが最適であった。

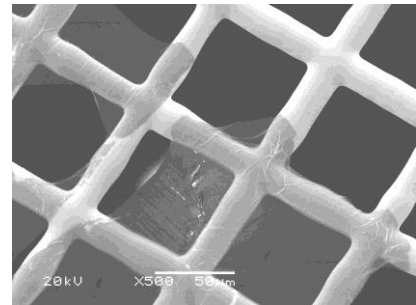


写真-6 : 20kV, WD5, ×500, SS-50

#### ⑤ 各 SEM 装置の分解能の評価と生物系試料像による画質の比較

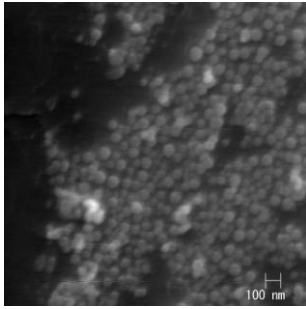
SEM 装置分解能評価をするために標準試料 (10~100nmSn 粒子) で 5 万倍程度の観察をし, 100nm 程度の解像度は確認できた。

強いて見やすさで順位をつけるとすれば, 日立 S-800 型 (写真-7) > 日本電子 6060 型 (写真-8) > 日立 SEMEDX-TypeH 形 (写真-9) となった。生物系試料 (写真-10, 11, 12) でも○枠内の細胞の線状模様を比較すると前述の評価と同様の結果が得られた。写真-13, 14 は日本電子 6060 型にてカーボングレーティング (X:1000,Y:2000/mm) とカーボンナノチューブ (40nm φ) を観察したもので, 数十 nm の確認が可能となった。

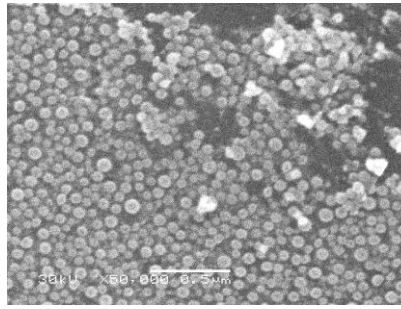
#### ⑥ TEM 像との比較

写真-15・16 は, 生物系以外の試料で, 80nm φ の Latex 球の TEM 像と比較したもので

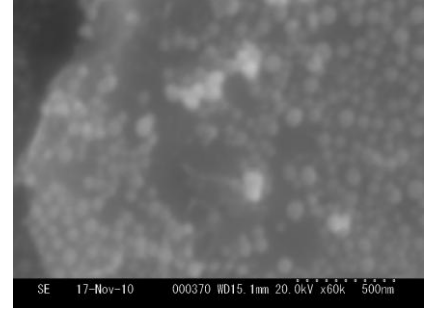
ある。写真-17・18は、マウスの小腸の TEM 画像と比較したものである。両者とも TEM 像の解像度には劣るものの実用性では、十分な結果を示すことができた。



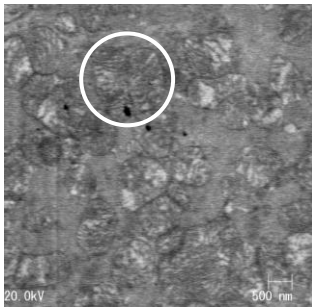
30kV, WD : 20, × 50000  
写真-7 : 日立 S-800



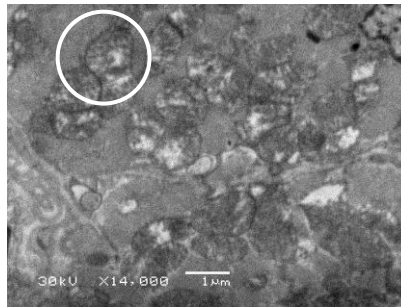
20kV, WD : 15, × 50000  
写真-8 : 日本電子-6060



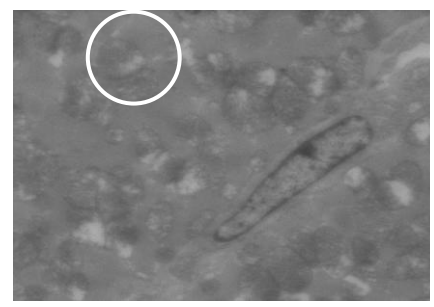
20kV, WD : 15, × 60000  
写真-9 : 日立 SEMEDX-TypeH



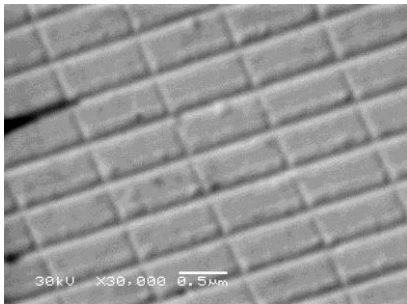
20kV, WD : 5, × 15000, 絞り 2  
写真-10 : 日立 S-800



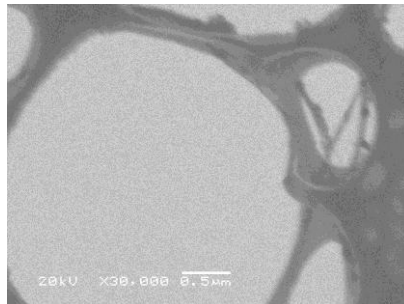
30kV, WD : 5, × 14000, SS50  
写真-11 : 日本電子-6060



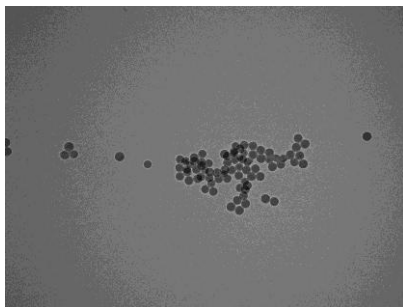
25kV, WD : 5, × 10000, 絞り 2  
写真-12 : 日立 SEMEDX-TypeH



30kV, WD : 5, × 30000, SS50  
写真-13 : 日本電子-6060  
カーボングレーティング



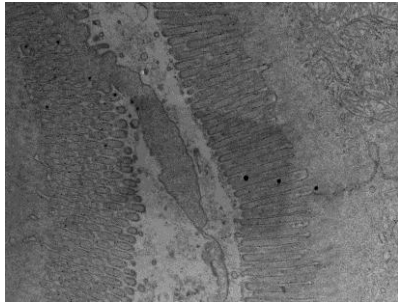
20kV, WD : 20, × 30000, SS25  
写真-14 : 日本電子-6060  
カーボンナノチューブ 40nm 程度



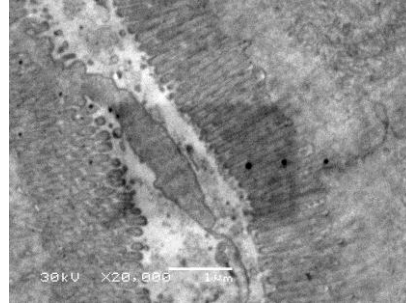
TEM-200kV, × 20000  
写真-15 : 日立 H-800



SEM-30kV, WD : 5, × 20000, SS50  
写真-16 : 日本電子-6060



TEM-200kV, ×20000  
写真-17：日立 H-800



SEM-30kV, WD: 5, ×20000, SS50  
写真-18：日本電子-6060

⑦ EDX 分析の試行

本報告では、生物系試料について SEM 装置における WD 等の条件でそのまま EDX の分析を試行している。最適条件を検討したものではない。特殊試料ホルダーの C, Al, Cu の影響がまちまちであったことから窺える。今回の結果は、染色液中（酢酸ウランと鉛染色の二重染色）の Pb は存在が認められた（図-3, 図-4）が、U については、確定しがたい。Al の影響については、現在では、改良ホルダーが市販されている。

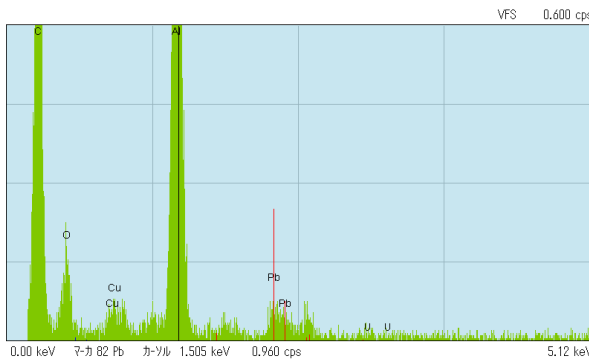


図-3：日立 SEMEDX-TypeH, 20kV-WD15-×3000

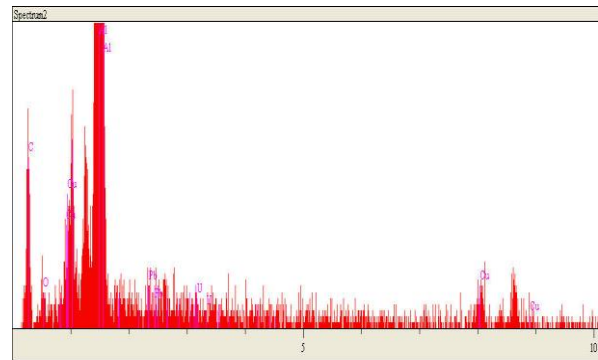
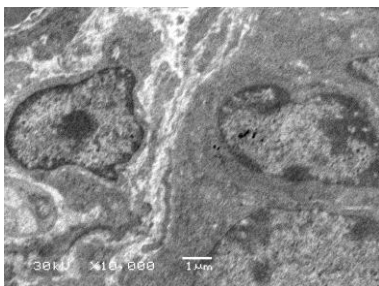
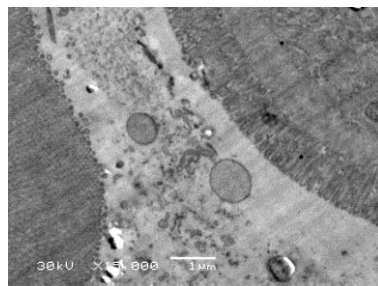


図-4：日立 S-800, 20kV-WD30-×3000

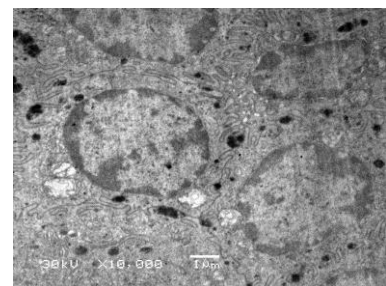
⑧ 名古屋大学技術職員研修および本研修において、研修生が作成した超薄切片試料と日本電子 6060 型 SEM で特殊試料ホルダーを用いて、マウスの小腸を観察したときの走査透過二次電子像を示す。多くの研修生に技術上の成果が得られた。



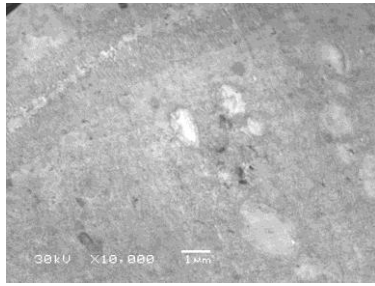
30kV-WD5-×10000-SS50



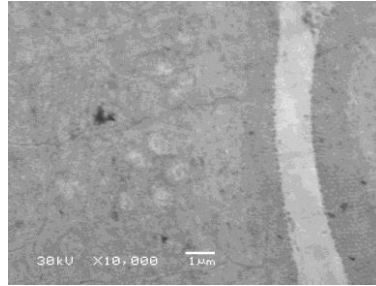
30kV-WD5-×15000-SS50



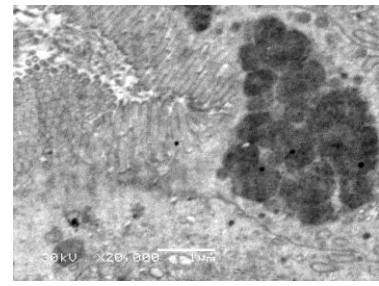
30kV-WD5-×10000-SS50



30kV-WD5- × 10000-SS50



30kV-WD5- × 10000-SS50

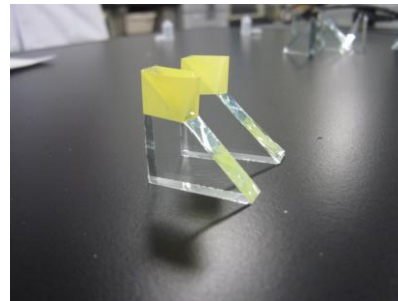


30kV-WD5- × 20000-SS50

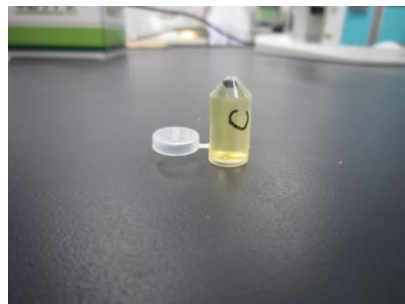
#### 4. 試料作りの紹介

名古屋大学技術職員研修では、ウルトラミクロトームによる生物系超薄切片試料作りも学んだ。下の写真に手順を示す。

##### ① ガラスナイフの作製



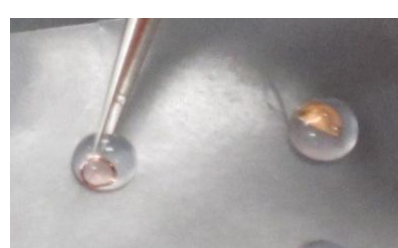
##### ② 試料のトリミング



##### ③ 試料のカット



##### ④ 酢酸ウランと鉛の二重染色



ピンセットで試料グリッドを曲げたりする破損が多く見られた。全体としては、30～60%の確率で試料が得られた。

また、FIB 装置（日立 FB-2100）を使用して高分子材料の試料作りに挑戦したが、今回は失

敗に終わっている。

## 5. まとめ

- ・ 今回の研修で、SEM に対するある程度の知識と操作技術を習得していれば、SEM 用特殊試料ホルダーを使って、TEM 像相当の観察が出来ることが、実証できた。
- ・ 各々に SEM の操作技術の向上も図れた。
- ・ 超薄切片試料作製については、名大技術職員研修でのウルトラミクロトームや技術部講習会での FIB 装置による操作訓練で経験することが出来た。
- ・ 研修目的の一つに生物試料以外の試料についてもその応用を試みたが、FIB による高分子材料 (SiO<sub>2</sub> 分散形) 試料作りの失敗で今後の課題とした。
- ・ 今後は、薄膜試料作りについても技術向上を目指すとともに、特殊試料ホルダーそのものを自作することも課題とした。
- ・ 各研修で多くの技術職員に知ってもらったが、名古屋大学の教員も含め更に多く情報を広めていきたい (ふれてまわる)。

## 6. 謝辞

本研修の報告にあたり、平成 21 年 11 月の情報交換会、本年 8 月の名古屋大学技術職員研修準備において多大なるご協力と丁寧なるご指導をいただきました浜松医科大学の村中祥悟氏はじめ、同様にご協力頂いたスタッフの皆様に心より感謝の意を表します。また、名古屋大学技術職員研修等にて試料提供および超薄切片試料作成にご指導ご協力頂いた名古屋大学全学技術センター医学系技術支援室の藤田芳和氏、水口幾久代氏、三澤伸明氏の方々にも心より感謝の意を表します

## 7. 参考文献

- ・ 村中祥悟：走査電子顕微鏡による透過二次電子像観察のための試料ホルダー開発と試用成績，徳島大学実験・実習技術研究会報告集，231-236，2008.3
- ・ 村中祥悟：走査電子顕微鏡による透過二次電子像観察のための試料ホルダー開発と改良，京都大学総合技術研究会報告集第Ⅱ分冊，30-31，2009.3