

汎用走査型電子顕微鏡装置を利用した液体中サンプルのその場観測

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
工学系技術支援室 分析・物質技術系

はじめに

ここ数年、分析・物質技術系では、SEM・TEMを中心とした電子顕微鏡観察・測定技術について系研修を行ってきた。本年度も、これまでの経験を活かし、継続してSEMに関連した題材を選択した。近年、生物・生体関連の研究が多く分野で研究されており、溶液中における反応プロセスに注目した研究は数多く見られる。そして、大気圧下の液体に浸された試料の観察ができる大気圧走査型電子顕微鏡装置(ASEM)が既に開発・販売されている。¹⁻³⁾ この装置では、試料室が大気開放されているために、外部より試薬の滴下や蒸発を行うことができるので、滴下後の反応や蒸発に伴う反応をその場的に観察することが可能である。一般的に、生物・生体試料では、試料の脱水・乾燥等の前処理に熟練を有する長時間の工程が必要であるが、液体中サンプルをそのまま観察することが可能となれば、このような前処理時間を大幅に短縮することができる。これまでに、溶液を蒸発させて、後に残るサンプルの分析は行ってきたが、液体中サンプルのその場観察は、近い将来に必要とされることが予想される。しかしながら、新規にこの装置を購入することは困難である。そこで、実際にASEMの大気と真空の分離に用いられている窒化シリコン膜を用いてサンプルカプセルを作製し、現有する汎用のSEMにおいて液体中サンプルを観察する。このような取り組みは幾つかの機関で試行錯誤的に行われているが、我々にとっては未知の経験であり、観察の可能性・ノウハウについて独自に検討することが本研修の目的である。本研修は業務の幅を広げ、観察技術の向上に繋がると考えられる。

1. 試料観察の準備

1.1 SiN膜

研修は、平成25年5月1日～平成25年11月29日の間で実施された。最初は、どのように研修を進めるかについて検討した。まず、作製するサンプルカプセルの真空封じに用いるSiN膜の選定から始めた。これは、電子は透過するが分子は通さない特性を有している膜である。シリコンフレーム上にSiN膜が成膜され、その後、ミリサイズの正方形に膜だけを残してシリコンがエッチングされたものであり、Silson社より多様なタイプが製造・販売されている。本研修では、シリコンフレームの厚さが0.2mm、大きさは5mm×5mm、SiN膜の枠サイズが、0.5、1、2mm角、SiN膜の膜厚が30、100、200、500、1000nmのものを用い

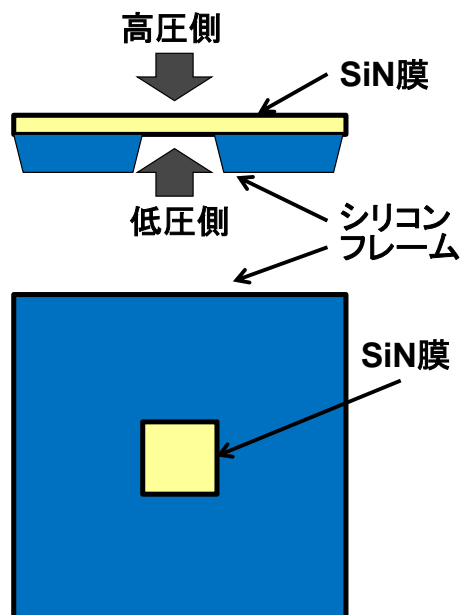


図1. SiN膜の概略

た。⁴⁾ (図1参照) 特に、機械的な強度の観点から使用に際して膜側を高圧側にする仕様となっていた。また、膜の耐圧が1気圧以上となるような枠サイズと膜厚の組合せから SiN 膜を選定した。

1.2 サンプルホルダーおよび真空シール

SiN 膜を用いたサンプルカプセルを
図2のような手順で作製した。図2(a)
はドリルで深さ 1mm のくぼみが作られ
た銅基板を示している。最初に、図2(b)
に示したように、枠内の SiN 膜面上にサ
ンプル(水に粒径サイズが 3-5 μm の
金粒子を分散させたもの)を滴下した後、
図2(c)のように裏返して、図2(a)のくぼ
みの位置とサンプルが一致するように
調整しながら銅基板とシリコン板を合
わせた。そして、両者の接触面を真空用
シール(バリアン製のトルシール)で
接着させて、サンプルカプセルを完成さ
せた(図2(d))。この作製工程の中で、
サンプルをくぼみに合わせる事が極
めて難しいことがわかった。そこで、シ
リコン基板をはめ込むガイドを有する
基板ホルダーを作製し、容易に位置合
わせが出来るように改良した(図3(a))。

図3(b)には、そのガイドにシリコン板を
のせたところを示している。このよう
にして作製したサンプルを観察してみ
ると、ほとんど何も観察することが出来
なかった。重力の影響で水に分散させ
た金粒子が、図2(c)に描いたように、
膜面から離れてしまい、二次電子が検
出器まで移動する過程で、エネルギー
損失が増えるのが原因ではないかと推測
される。そこで、今回の研修では、水
よりも粘度が高いシリコングリースに
分散させた金粒子を生物・生体試料の
模擬サンプルとして用いた。図3(c)は、
カプセル内の膜面に付着したサンプルの
様子を撮影したデジタルカメラ像であ
る。研修では、参加者全員がサンプル
カプセルを作製して、そのノウハウを
習得した。またサンプルがどのように
観察できるのかを体験した。加えて、
カプセルを用いる前段階として、膜の
電子透過特性を調べるために、図4に
示したように、金属基板上に

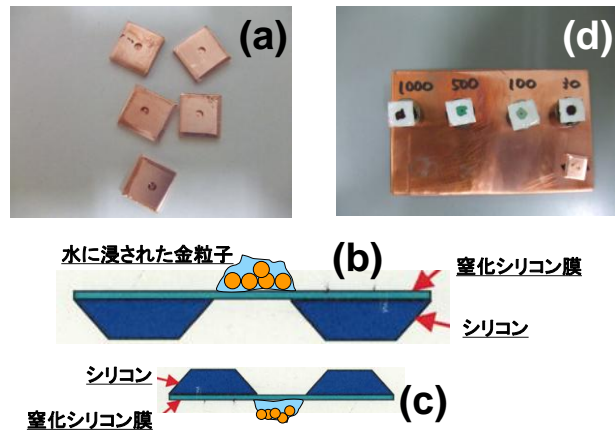


図2. サンプルカプセルの作製手順

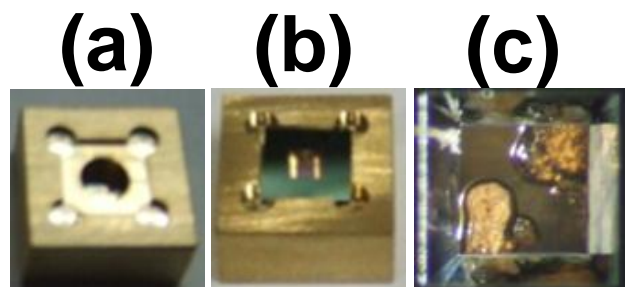


図3. 改良されたサンプルホルダー

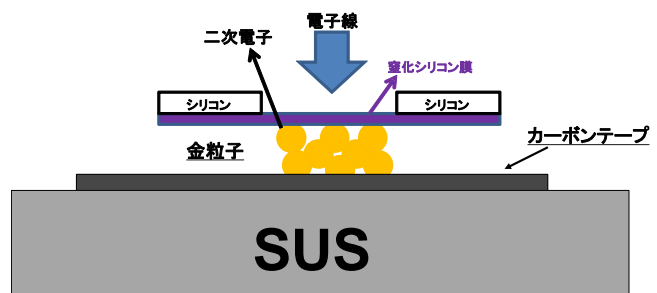


図4. 膜の透過特性用サンプル構成

金属基板上に

カーボン両面テープを貼り、その上に金粒子を分散させて、更にその上から SiN 膜を被せて観察を行った。

2. 試料観察

参加者全員が、SiN 膜の電子透過特性を調べた後、サンプルカプセルを作製して、サンプルの SEM 観察を行った。これらの工程を、8月28日（水）、8月30日（金）、9月2日（月）、9月5日（木）の4日間に分けて実施した。

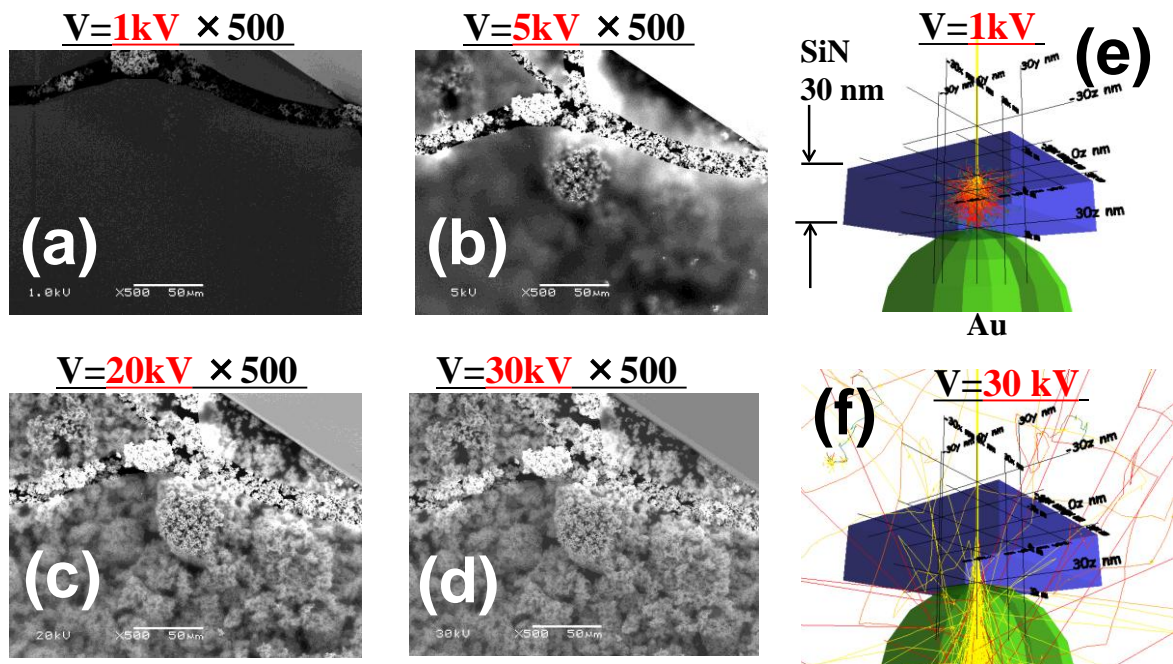


図5. 膜を透して観察した金微粒子と電子の軌跡シミュレーション結果

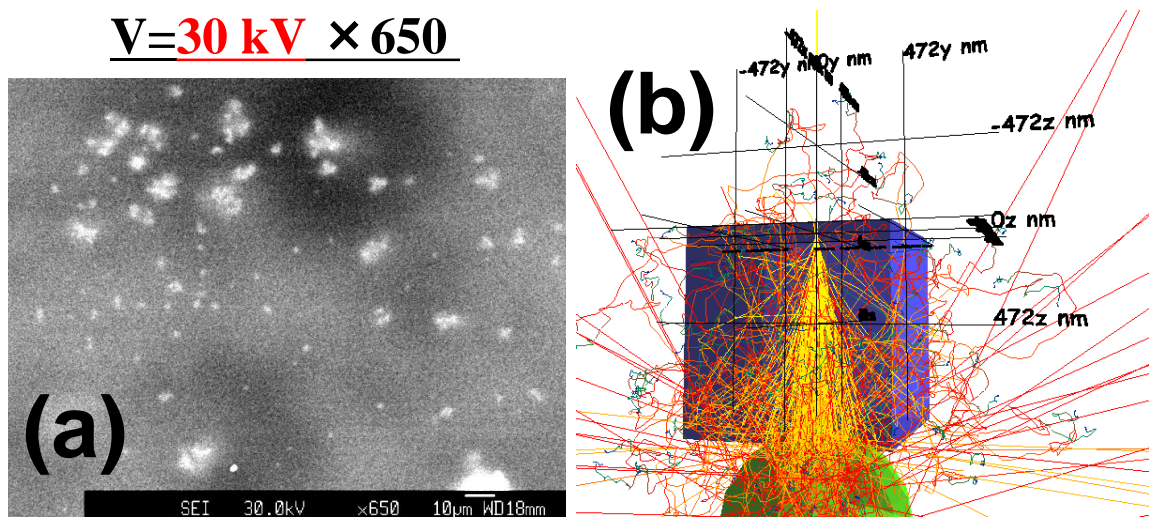


図6. 膜厚 1000 nm の場合の SEM 像および電子軌道の計算結果

膜厚 30 nm の SiN 膜を用いた場合における加速電圧の違いによる膜の電子透過特性を図 5 (a)-(d)に示した。この時、膜を金微粒子に押しえ付け過ぎて膜の一部が破れてしまった。しかしながら、幸いにも、これにより膜の有無による像の違いを比較できる結果となった。加速電圧が 1 kV の SEM 像 (図 5 (a)) を見ると、膜が破れた部分では金粒子を鮮明に確認できるが、膜を透すとほとんど何も見ることができないことがわかる。しかしながら、加速電圧を 5, 20 kV と増加させると次第に鮮明な像となり、加速電圧 30 kV では膜の存在を感じさせない程、鮮明に観察することが可能であった(図 5 (d))。また、電子を検出するエミッション電流を大きくすることによってもより鮮明な SEM 像を得ることができた。加えて、図 5 (e)-(f)では、電子の SiN 膜内での軌跡を、フリーソフト(Casino)によって計算した結果を示している。膜厚 30 nm の SiN 膜内では加速電圧 1 kV の入射電子が膜を通過しないことがわかる。図 5(a)の SEM 像の結果と同じである。また、加速電圧を 30kV まで増加させると入射電子のほとんどは膜を貫通して金粒子に到達しており、図 5(d)の SEM 像ともよく一致していることがわかる。しかしながら、膜厚が 1000 nm の場合には、加速電圧を 30 kV まで増やしてフォーカスの調整を試みたが、限られた位置 (おそらく粒子が膜面に接している位置) で、粒子が点在している様子だけが観察された。従って、決して容易に観察できるとは言えない状況であった。この様子を図 6 (a)に示した。この際の電子軌道の計算結果を図 6 (b)に示した。金粒子に入射するまでに電子軌道がかなり広がっているのがわかる。この電子軌道の拡がり が SEM 像において鮮明さを欠く原因になっている可能性が考えられる。また、金粒子からの二次電子が、膜中を通過する過程で生じるエネルギー損失も原因の一つとして考えられる。

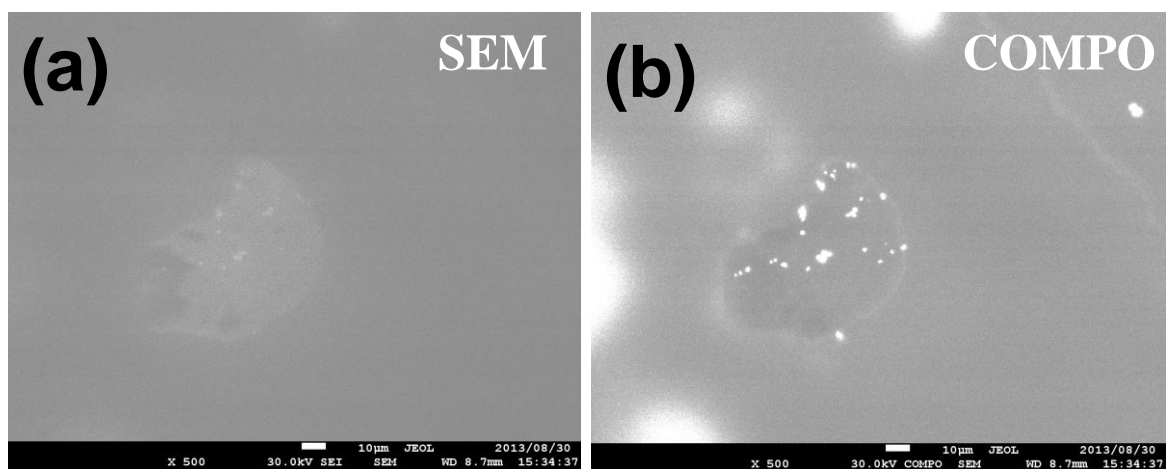


図 7. 膜厚 1000 nm の場合における SEM 像と反射電子像の比較

近年、SEM には SEM 像だけでなく、反射電子像を得ることができる機能がオプションとして備えられている。反射電子は、二次電子と比べて大きな電子エネルギーを有しているのが特徴である。図 7 (a)と(b)は、厚さ 1000 nm の膜を用いた場合において、加速電圧 30 kV で観察された SEM 像と反射電子像 (COMPO) をそれぞれ示している。この場合、反射電子像では、SEM 像とは比較にならないほど鮮明に観察できることがわかった。

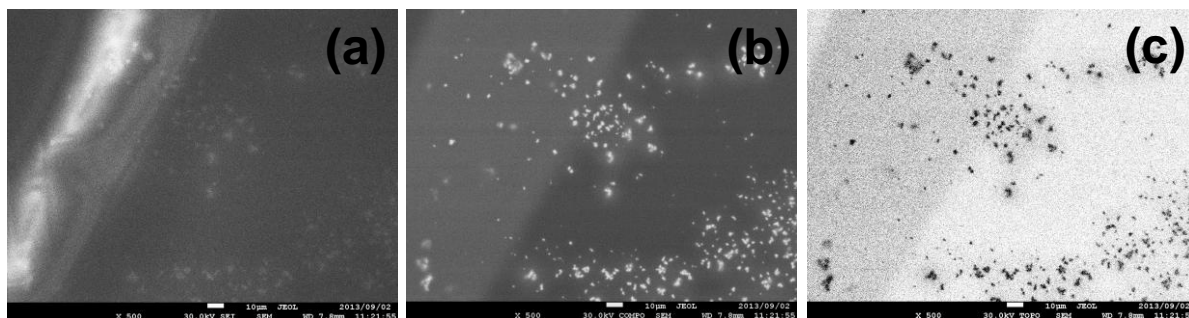


図 8 . SEM 像(a)、反射電子像(b)および反射電子凹凸像(c)の比較
(SiN 膜厚 : 1000 nm、加速電圧 30 kV)

3. サンプルカプセルを用いた場合の SEM 観察

図 8 (a),(b),(c)は、それぞれ SEM 像、反射電子像および反射電子凹凸像を示している。SiN 膜の膜厚は、1000 nm で加速電圧は 30 kV で撮影された。SEM 像は、かすかに粒子をとらえているが、反射電子像と比較すると格段に鮮明さに欠ける。膜厚が 100 nm までの薄い膜の場合についても同様な手順でカプセルを作製して観察を試みたが、SEM 像に関しては、粒子の形状やサイズを明らかに出来る程鮮明な画像を得ることは出来なかった。これは、金粒子から放出される二次電子のエネルギーは一般的に 50 eV 程度と低く、粒子を包んでいる液体 (グリース) や SiN 膜を二次電子が通過する過程で、エネルギーを失っているのが原因であると推測される。これに対して、反射電子は比較的大きなエネルギー有しているために、エネルギー損失が生じても検出器に到達して、結像しているのではないかと思われる。倍率を上げて粒子の形状を確認することができた。更に、反射電子凹凸像では、粒子の存在、形状がより立体的に捉えることができ、より有効な観察手法であると痛感した。

4. まとめと今後の課題

上述したように、膜厚が 30 nm の薄い SiN 膜を用いてサンプルカプセルを作製し、加速電圧 30kV 程度で、反射電子像を観察することにより、サンプルの形状やサイズは十分に把握できると考えられる。しかしながら、2 章でも述べたが、より粘度の低い溶液中の比較的重量が重いサンプルに関しては、サンプルが膜面から離れてしまうために、下から押し上げる機構を設けるなどの工夫が必要である。また、真空封じに関しても問題がある。現状では、トルシール用いているが、乾燥するまでに比較的長い時間を要するため、O-ring 等を用いたより簡便な (時間を短縮できる) 真空封じ方法に改良する必要がある。

参考文献

- 1) 西山英利、他 (2009) 顕微鏡 Vol. 44 : 262-267.
- 2) 須賀三雄、他 (2011) 顕微鏡 Vol. 46 : 137-139.
- 3) E. D. Green and G. S. Kino (1991) J. Vac. Sci. Technol. B 9(3) : 1557-1558
- 4) 試料提供 : コーンズテクノロジー株式会社 (<http://www.cornestech.co.jp/>)