

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

○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

概要

生物・生体試料の観察ができる大気圧走査型電子顕微鏡装置では、試料室が大気開放されており、試料は窒化シリコン薄膜上に設置される。即ち、窒化シリコン薄膜が大気と真空を分離し、電子を透過させる役割を演じている。そこで、この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。生物・生体試料の模擬サンプルとして、シリコングリースに分散させた金微粒子を用いた。窒化シリコン膜厚が 30 nm、電子加速電圧が 30 kV において、反射電子像を観察することにより、形状や粒径が観測できることを示した。しかしながら、現状の幾つかの問題点もわかり、更なる改良が必要であることを示した。

1. はじめに

近年、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おり、外部より試薬の滴下や蒸発を行うことが可能であり、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できる。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比較的長時間の工程を要するが、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。しかしながら、新規にこの装置を購入することは容易ではない。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(SiN)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 に導入して液体中サンプルを観察することを試みる。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を行うことが目的である。

2. サンプルカプセルの作製

作製するサンプルカプセルの真空封じに用いる SiN 膜は、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。今回は、シリコンフレームの厚さが 0.2 mm、大きさは 5 mm×5 mm、

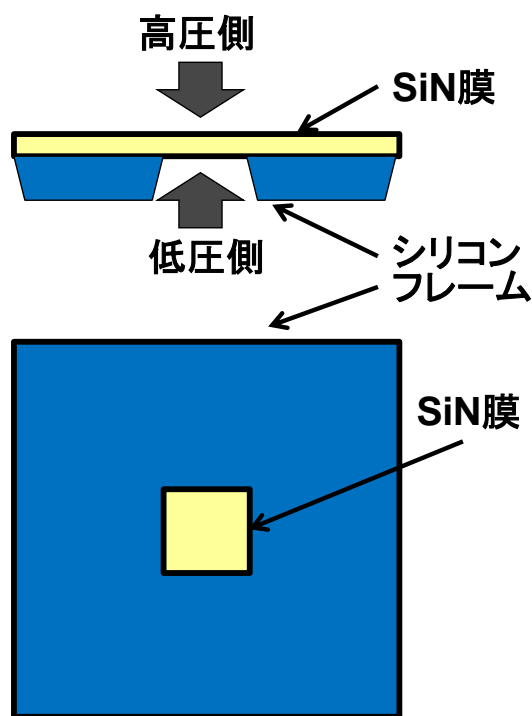


図 1. SiN 膜の概略

SiN 膜の枠サイズが、0.5, 1, 2 mm 角、SiN 膜の厚さが 30, 100, 200, 500, 1000 nm のものを用いた。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。

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、シリコンフレームが収まるようにガイドが設けられたサンプルホルダーである。図 2 (b)に示したようにサンプルを SiN 膜側の膜面上に滴下した。サンプルには、生物・生体試料の模擬としてシリコングリースに分散させた金微粒子を用いた。金微粒子の平均粒径サイズは 3-5 μm で、球形の形状をしているものを使用した。次に、図 2 (c)に示すようにシリコン基板を裏返して、そのまま図 2 (a)のサンプルホルダーのガイド内に挿入した。シリコン基板の挿入後の様子を図 2 (d)に示している。そして、シリコンフレームの外周に沿って真空シール (バリアン製のトールシール) で接着させて、サンプルカプセルを完成させた。図 2 (e)は、カプセル内の膜面に付着したサンプル (金微粒子) の様子を撮影したデジタルカメラ像である。

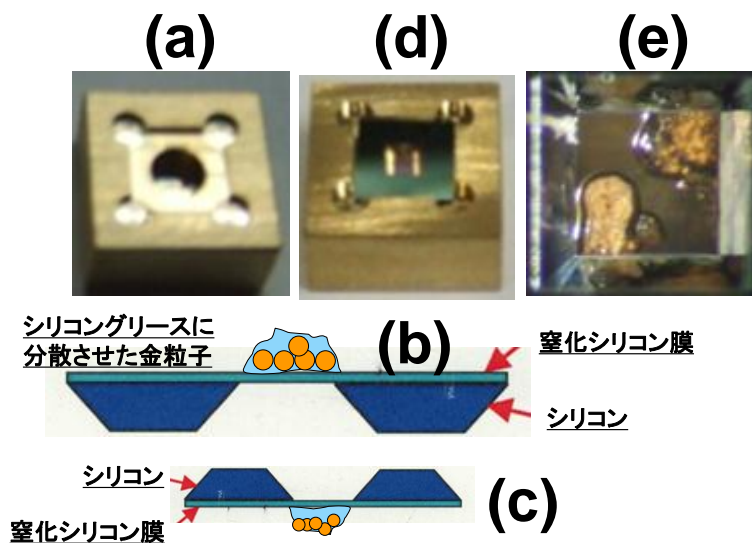


図 2. サンプルカプセルの作製手順

3. SiN 膜の電子透過特性

最初に、膜厚 30 nm の SiN 膜を用いた場合の加速電圧依存性を調べた。サンプルには、図 3 に示すように、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、更にもう一枚の SiN 膜を被せて観察を行った。この時、膜を金微粒子に押し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が比較できる結果となった。加速電圧が 1

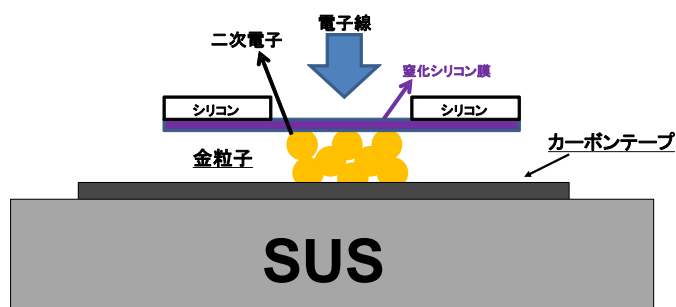
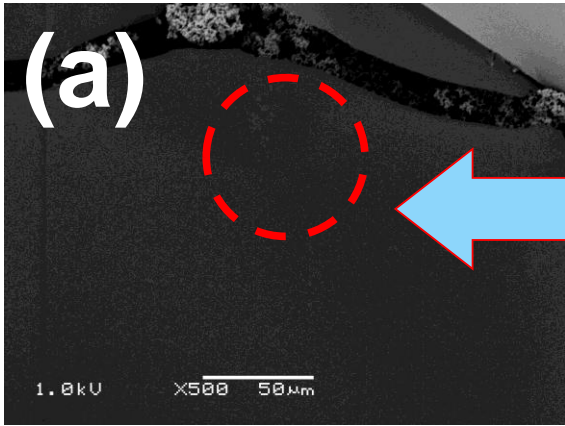


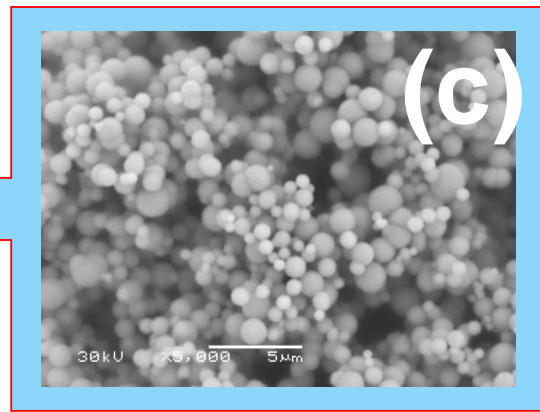
図 3. SiN 膜の電子透過特性観察用サンプル

kV の SEM 像 (図 4 (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、加速電圧を増加させるとともに鮮明な像となり、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できた (図 4 (b))。また、倍率を、5000 倍に上げることにより、図 4 (c)からわかるように、粒子の形状や粒子サイズを鮮明に観察することができた。加えて、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。また、図 5 (a)-(c)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。図 5 (a)は、膜厚 30 nm の SiN 内では加速電圧 1 kV の入射電子が膜を通過しないことを現している。図 4(a)の SEM 像の結果と同じである。また、図 5(b)に示したように、加速電圧を

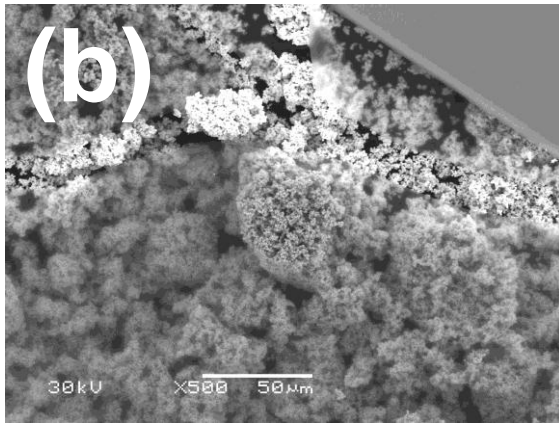
V=1kV × 500



V=30 kV × 5000



V=30kV × 500



V=30 kV × 650

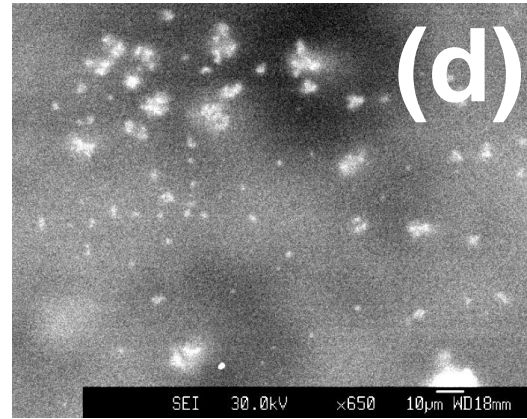


図4. SiN膜の電子透過特性 (SiN膜厚: (a)-(c):30 nm, (d):1000 nm)

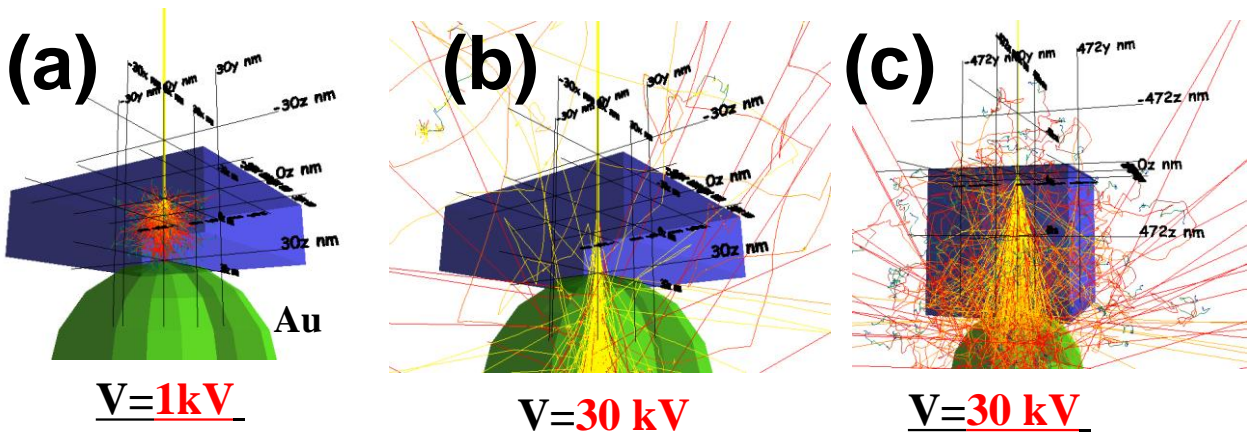


図5. SiN膜中の電子軌道の計算結果 (SiN膜厚(a)-(b):30 nm, (c):1000 nm)

30 kV 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 4(b)-(c)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 4(d)に示した。この際の電子軌道の計算結果を図 5(c)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。この電子軌道の広がりが 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。

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 6(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) を比較してそれぞれ示している。この場合、反射電子像は、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。

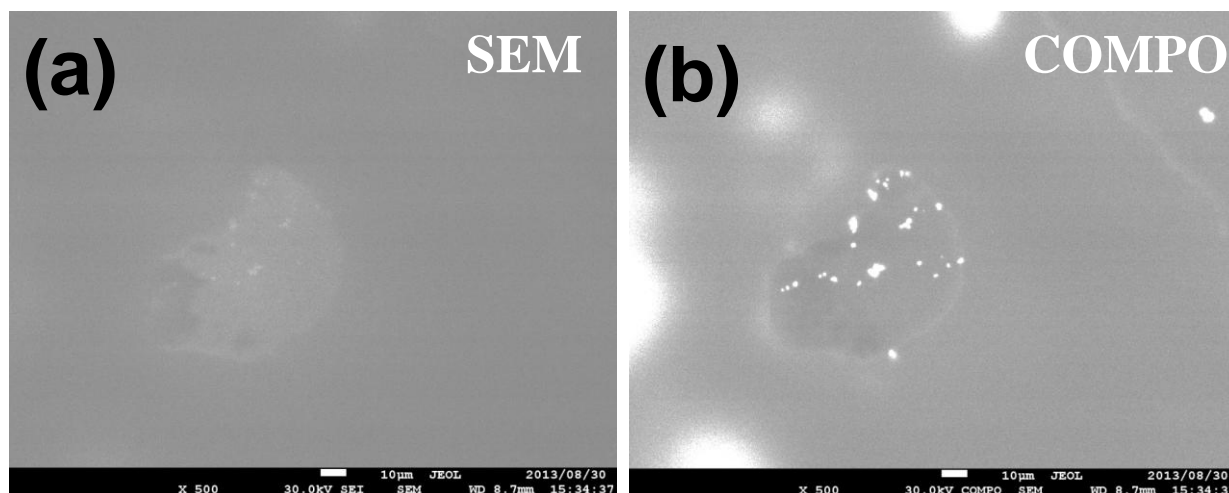


図 6. SiN 膜厚 1000 nm の場合における SEM 像(a)と反射電子像(b)

4. サンプルカプセルを用いた場合の SEM 観察

図 7(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ほど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のかもしれない。これに対して、反射電子は比較的大きなエネルギーを有しているために、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推測される。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。

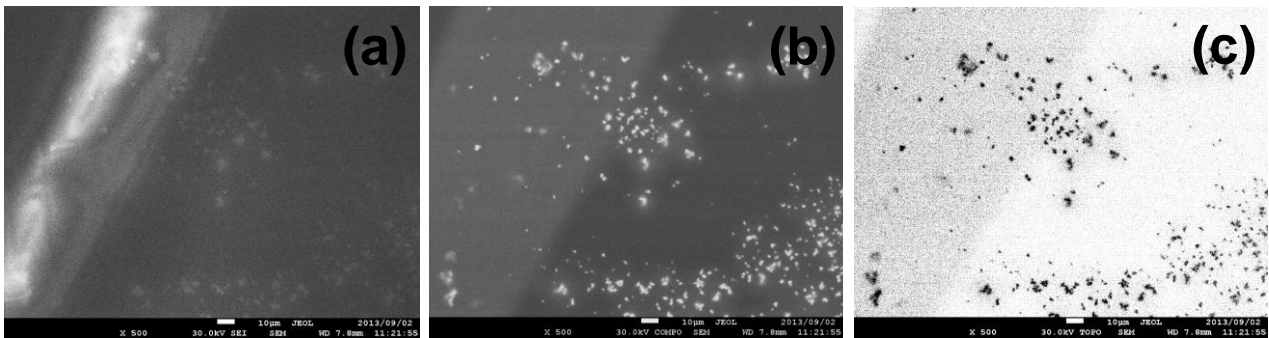


図7. サンプルのSEM像(a)、反射電子像(b)および反射電子凹凸像(c)
(SiN膜厚：1000 nm、加速電圧：30 kV)

5. 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予想される。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、トルシールを用いているが、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/>)