

新機能走査電子顕微鏡の開発

— 大気圧と高分解能走査電子顕微鏡とそれらを用いた応用 —

2014年7月

須賀 三雄

(千葉大学審査学位論文)

新機能走査電子顕微鏡の開発

— 大気圧と高分解能走査電子顕微鏡とそれらを用いた応用 —

2014年7月

須賀 三雄

目次

1. 緒言	1
1.1 はじめに	1
1.2 大気圧 SEM	4
1.2.1 大気圧 SEM の位置づけ	4
1.2.2 Correlative microscopy	4
1.2.3 大気圧 SEM	5
1.3 高分解能 SEM	6
1.4 特性 X 線を用いた組成分析	7
2. 原理	9
2.1 走査電子顕微鏡	9
2.2 2 次電子(SE)と反射電子(BSE)	13
2.2.1 レンジとモンテカルロ法	13
2.2.2 2 次電子(SE)と反射電子(BSE)	16
2.3 大気圧 SEM	19
2.3.1 原理	19
2.4 高分解能 SEM	22
2.4.1 低加速 SEM の必要性	22
2.4.3 低加速 SEM の実現方法	24
2.5 特性 X 線を用いた組成分析	33
2.5.1 原理	33
3. 大気圧 SEM	38
3.1 大気圧 SEM の構成	38
3.1.1 SiN 薄膜	38
3.1.2 薄膜ディッシュ	39
3.1.3 大気圧 SEM の構成	39
3.1.4 光学顕微鏡	40
3.1.5 シールドドア	40
3.2 大気圧 SEM の基本機能とバイオ分野への応用	41
3.2.1 バイオ分野における大気圧 SEM の位置づけ	41
3.2.2 実験方法	43
3.2.3 結果および考察	46
3.3 材料系試料の動的観察等	63

3.3.1 材料系分野における大気圧 SEM の位置づけ	63
3.3.2 実験	63
3.3.3 結果および考察	66
3.4 免疫染色試料の correlative microscopy	79
3.4.1 本研究の背景と目的	79
3.4.2 実験方法	80
3.4.3 結果および考察	82
3.4.4 本節の結論	99
3.5 マイコプラズマの観察と検査の可能性	100
3.5.1 本研究の背景と目的	100
3.5.2 実験方法	102
3.5.3 結果および考察	103
3.5.4 本節の結論	109
3.6 たんぱく質微結晶の液中観察	110
3.6.1 本研究の背景と目的	110
3.6.2 実験方法	111
3.6.3 結果および考察	114
3.6.4 本節の結論	123
3.7 本章の総合的な議論	123
4. 高分解能 SEM	124
4.1 本章の背景と目的	124
4.2 ヨークシェル材	125
4.3 メソポーラス LTA	127
4.4 IRMOF	127
4.5 メソポーラスシリカ結晶(SBA-15)	128
4.6 螺旋状の TiO ₂	130
4.7 本章の総合的な議論	131
5. 特性 X 線を用いた組成分析	132
5.1 デバイスの組成検査技術	132
5.1.1 本研究の背景と目的	132
5.1.2 原理	133
5.1.3 実験方法	134
5.1.4 結果および考察	135
5.1.5 まとめ	140
5.2 超電導 X 線検出器	142
5.2.1 本研究の背景と目的	142

5.2.2 実験方法.....	142
5.2.3 結果および考察.....	143
5.2.4 まとめ.....	146
5.3 SDD を用いたナノ材料評価.....	147
5.3.1 本研究の背景と目的.....	147
5.3.2 SDD の特徴.....	147
5.3.3 結果および考察.....	149
5.4 本章の総合的な議論.....	150
6. まとめ.....	151
6.1 本研究のまとめ.....	151
6.2 今後の課題.....	152
6.3 今後の展望.....	153
謝辞.....	154
参考文献.....	156

1. 緒言

1.1 はじめに

電子線の波長は、可視光の波長が 400 – 800 nm 程度であるのに対し、エネルギーが 10 keV の際に 12.4 pm、100 eV の際でも 124 pm であり、可視光よりも 3 桁以上短い。このため、電子顕微鏡(電顕、electron microscope)を用いることにより、通常の光学顕微鏡(光顕、optical microscope)では観察できない光の波長よりもはるかに小さなものを直接観察できる。これにより、例えばウイルスが発見されて、その対策が可能となったため医学が大きく進歩した。また、電顕の高性能化により原子カラム列を直視できるようになり、材料研究も大きく進歩した。さらに、産業的にも、半導体の寸法を測定するための測長 SEM をはじめとして、研究開発から製品の品質確認まで電顕はなくてはならないものとなっている。近年超解像光学顕微鏡(super resolution optical microscope)が開発され、光の波長限界以下の小さなものを特殊な光顕で観察できるようになってきた。しかしながら、超解像光顕は、主な観察対象は蛍光体であるため適用範囲が限定されている。また、原子間力顕微鏡(AFM)などの走査型プローブ顕微鏡(SPM)も光の波長より小さなものを観察するために用いられるが、観察スピードや観察対象に様々な制限がある。このため、電子顕微鏡は、光の波長よりも小さな物を観察するために最も広く用いられるツールとなっている。

電顕は、薄膜試料を透過した電子を信号に用いる透過電子顕微鏡(TEM: transmission electron microscope)とバルク試料に収束した電子線を照射しそこから発生する様々な信号を検出する走査電子顕微鏡(SEM: scanning electron microscope)の2種類に大きく分類される。この中で SEM は、試料を薄膜化する必要がないこと、および、取り扱いが比較的簡単であることから、基礎研究から産業分野での製品モニタリングまで広く用いられている。また、形態を観察するだけでなく、特性X線の検出などにより元素分析にも広く用いられている。

このように広く用いられている SEM には、様々な課題がある。主なものは以下と考えている。

(1) 形態観察

(1)-1 液体、気体中でのその場観察

- 通常の電子顕微鏡では試料を真空中に配置する必要があるため、液体、気体中でのその場観察(静的、動的)することは困難である。このような試料の観察が求められている。

(1)-2 高空間分解能の観察

- より高い空間分解能での観察が求められている。特に、試料の表面近傍を選択的に観察することが求められている。

- 複数の材料からなる試料について、それぞれの材料がどのような形態であるかを観察することが求められている。
- ダメージを受けやすい試料や絶縁体の観察も必要である。これらの試料では、ダメージやチャージの低減が求められる。

(2) SEM 像と対応させた局所分析

- 試料に電子線を照射した際に発生する特性X線は、試料を構成する元素に固有のエネルギーを有するため元素分析に用いられる。より多くのX線を検出することにより、含有率の低い元素の検出が求められている。また、SEM 像に対応したより局所的な分析が求められている。
- 広く用いられている半導体検出器で特性X線を検出する場合、エネルギー分解能が不十分であるため、ピークのオーバーラップが生じることがある。エネルギー分解能が高い検出器を開発することにより、ピークのオーバーラップを低減することが求められている。
- 電子デバイスなど複雑な構造を有する製品について、開発過程における最適化、生産時におけるモニタリング、および、故障解析などのために、製品構造のまま元素分析することが求められている。特に、迅速・簡単に分析できることが求められている。

(3) 結晶性の評価—観察条件の最適化と基礎的な理解

- 反射電子を検出することにより、試料の結晶欠陥などを観察できることが報告されている。これらの観察条件を最適化すること、および、その理論的な解釈が求められている。

(4) 観察や分析の効率の向上

- 専門家でなくても使えるように、観察や分析の単純化が求められている。また、より多くの試料を効率的に観察するため、試料交換を含めた測定の高速度化が求められている。
- SEM で取得した画像を元に、検査や診断などに寄与できる技術の開発。例えば、形態に基づきバクテリアやウイルスの分類をすることなどが求められている。
- 電子顕微鏡と他の顕微鏡(例えば光顕)を組み合わせることにより、グーグルアースのように広い範囲から光の波長では観察できない微細な領域までを統一的に観察できる。また、蛍光ラベルと光顕により目的部位を特定した上で、関連部位を電顕で高分解能観察することができる。このような複数の顕微鏡を組み合わせる手法は相関顕微法(Correlative Microscopy)として発展しつつあるが、これの効率化が求められている。

これらの中で、筆者は以下のテーマについて研究を行った。

第一は、大気圧 SEM に関するものである。上記したように、通常の電顕では液体や気体

中の試料を観察することは困難であった。この問題を解決するために、Abrams と McBain は TEM 用に電子線を透過する 2 枚の薄膜を用いることにより、液体や気体中の試料の観察を試みた (Abrams and McBain, 1944)。本研究では Abrams と McBain の電子線透過薄膜を発展させて、大気に開放された試料室を有し、液体や気体中の試料を観察するための大気圧 SEM を開発した。これにより材料分野では、これまで不可能であった SEM による通常の電解液中の電気化学反応、あるいは、蒸発現象などを含む液体や気体中の試料の動的な現象を *in situ* で動的に観察することに世界で初めて成功した。また、バイオ分野では、新規に様々な細胞を培養できる試料ホルダー (薄膜ディッシュ) を開発し、これにより、従来 1 日以上 の時間が必要であった電顕観察を、最速 20 分程度の簡単な前処理で迅速かつ簡単に液体中で観察できるようにした。大幅な観察の高速化により、バイオ分野の研究開発の効率を飛躍的に高めるとともに、基礎研究だけでなく、ガンの術中検査や細菌検査への適用も検討を開始した。また、光顕と組み合わせた複合装置の開発により、一台の装置で上記の相関顕微法も実現し、観察の効率を飛躍的に高めた。

第二は、最新の高分解能 SEM を用いたナノ材料観察に関するものである。近年高分解能 SEM の性能は急速に向上したが、ナノ材料は以下の理由によりその性能を評価するのに最適な材料である。ナノ材料の性能は、その表面の構造に強く依存する。しかしながら、ナノ材料の多くは電子線照射によりチャージするとともにダメージを受けるために、従来の SEM では観察が容易でなかった。電子線のランディングエネルギーを下げることによりチャージやダメージを低減できるが、この場合従来の SEM では十分に電子ビームを絞ることができなかつたためである。これに対し、近年高分解能 SEM の性能は急速に向上し、特に、電場と磁場の両方を組み合わせた対物レンズ、および、対物レンズを通して電子線を検出する TTL (Through the lens) 検出システムの発展により、低ランディングエネルギーでの空間分解能と信号選択能力が飛躍的に高まった。本論文では、低ランディングエネルギーにおける SEM の性能をどのように向上させたかをまとめるとともに、これを用いてメソポーラスシリカ、メタルオーガニックフレームワーク (IRMOF)、ヨークシェル材などの様々なナノ材料の表面構造を観察できるようになったことを記載する。

第三は、特性 X 線に関連した研究についてである。試料に電子線を照射すると、試料から様々な信号が放出されるが、そのひとつが特性 X 線である。上記したように、特性 X 線のエネルギーは元素に固有であるため、その検出により組成を分析できる。本論文では、特性 X 線に関連した 3 つの研究について記載する。

これらの研究開発は、SEM に関する物理的な考察に基づいて行ってきた。すなわち、SEM には、「試料に照射する電子線の集束」、「試料に照射した電子線の試料内部での振る舞いと信号の生成」、および、「生成された信号の (選択的な) 検出」の 3 つの課題がある。これらは全ての SEM の研究開発に共通であり、これらを深く考察することにより本研究開発を行ってきた。以下、それぞれについて説明する。

1.2 大気圧 SEM

1.2.1 大気圧 SEM の位置づけ

上記したように、通常の電顕では試料を真空中に配置する必要がある。このため、生物試料については、一般的には手間や 1 日程度の時間がかかる脱水・乾燥などの試料前処理が必要であり、また、これらの処理によりアーティファクトが入る可能性がある。また、液体中や気体中における物理・化学的な現象を動的に観察することは困難であった

これらの課題を解決するために、様々なアプローチがなされてきた。最初のアプローチは、1.1 節にも記載したように、電顕が発明されて間もない 1944 年に Abrams と McBain によりなされた (Abrams and McBain, 1944)。彼らは、カプセルに電子線を透過する 2 枚の薄膜を配置し、その間に液体に入った試料を配置し TEM で観察した。その後、様々な研究者がこの手法を発展させた (Fukushima et al., 1985) (Butler and Hale, 1981)。近年は、Micro-Electro-Mechanical Systems (MEMS) 技術の発展により、アモルファス窒化シリコンより成る丈夫な薄膜を形成すること、および、2 枚の薄膜間の距離を μm 以下に小さくすることができるようになった。これにより TEM では、原子分解能が得られるようになるとともに (Creemer et al., 2008)、液体中の試料を容易に観察できるようになった (de Jonge and Ross, 2011)。これらは、環境セルと呼ばれている。

薄膜を用いる手法は、SEM にも適用された (Green and Kino, 1991) (Thiberge et al., 2004b)。真空側から薄膜を通して大気圧側の試料に電子線を照射し、試料からの反射電子 (BSE) を薄膜を介して真空側に配置した BSE 検出器で検出する。これにより、大気中、あるいは、液体中の試料を観察できるようになった (Thiberge et al., 2004b)。

しかしながら、薄膜を用いる従来の方法では、両側あるいは片側に薄膜を配置したカプセルを用いるため、基本的に試料スペースはほぼ閉鎖空間であった。このため、観察の最中に試料に薬液を加えるなど外部から試料にアクセスすることは限定されているとともに、蒸発など試料の体積が急に変わる現象を観察することは困難であった。また、これらのカプセル内部の体積は通常 15 μl 程度であり、内部で培養できる細胞は限定されていた。また、カプセルは電顕の中に配置されるために、次に述べる Correlative Microscopy をひとつの装置で行うことは通常困難であった。

1.2.2 Correlative microscopy

ライフサイエンスの分野を中心として、光顕と電顕で同じ位置を観察し、これらの情報を複合的に解析する Correlative Microscopy (特に Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM)) が注目を集めている (Müller-Reichert and Verkade, 2012)。蛍光ラベルをつけたタンパク質等を蛍光顕微鏡で観察した後、試料の同じ場所を電顕で高分解能観察する。これにより、グーグルアースのように広い範囲から光の波長では観察できない微細な領域までを統一的に観察できる。また、蛍光ラベルにより、目的とするタンパク質等

を特定した上で、関連する部位を高分解能で電顕観察することが可能である。ここで、蛍光ラベルはタンパク質などの位置を特定するために蛍光顕微鏡用に用いられるものであり、遺伝的に細胞に導入される蛍光タンパク質、および、抗原抗体反応と呼ばれる特定のタンパク質に結合する抗体を用いるものの2種類がある。いずれについても、特定のタンパク質の位置を蛍光で調べるために用いられる。

しかしながら、これまでの方法では、電顕観察のために試料を真空中に配置する必要があった。このため、時間や手間のかかる試料前処理が必須であり、**Correlative Microscopy**を用いる研究者は限定されていた。

1.2.3 大気圧 SEM

これらの課題を解決するため、大気に開放された試料室を持つ「大気圧 SEM (Atmospheric SEM)」、および、大気圧 SEM と光顕(蛍光顕微鏡)を組み合わせた **Correlative Microscope** 「光顕・大気圧 SEM 複合システム」を開発し、様々な試料の観察に応用した (Nishiyama et al., 2010) (Suga et al., 2011) (Murai et al., 2011b) (Maruyama et al., 2012a) (Maruyama et al., 2012b) (Murai et al., 2013b) (Sato et al., 2012) (Murai et al., 2013a) (Nishiyama et al., 2014)。大気圧 SEM では、従来の研究と同様に、電子線を透過する薄膜を用いて大気圧下の試料を観察する。ただし、上記薄膜がとりはずし可能な直径 **35 mm** のペトリディッシュ(薄膜ディッシュ)の底に配置されるとともに、試料室は大気に開放されている。ペトリディッシュは細胞を培養するための容器であり、別名「シャーレ」とも呼ばれる。これにより、1気圧下の試料の観察だけでなく、観察の途中で試料に試薬を滴下するなど外部から試料を操作しながら試料を動的に観察すること、および、蒸発現象などの試料の体積が急速に変化する現象の観察を実現した。また、従来のカプセルでは電子線を上から照射するのに対し、大気圧 SEM では電子線を下側から試料に照射することにより、液体の中に沈む試料の観察も実現した。さらに、MEMS 技術により電極を作りこんだ電気化学薄膜ディッシュやヒーターを組み込んだ温度制御ディッシュなどの特殊なディッシュを開発した。これにより、電解液中の電気化学反応、あるいは、ハンダの融解や凝固など大気圧下における試料の温度変化などの SEM 観察を世界で初めて実現した。

一方、材料分野だけでなくバイオ分野では、とりはずし可能な薄膜ディッシュを採用し最大 **3 ml** の培養液を入れられるようにすることで、CO₂ インキュベーターの中に入れて薄膜上で様々な細胞の安定培養を実現するとともに、これらの細胞を「簡単かつ迅速」に液体に入れたままで電顕観察できるようにした。また、従来バイオ試料を電顕で観察するためには、脱水・乾燥などの1日程度の時間とスキルが必要な試料前処理が必要であったが、これらの手間なしに、最速 **20 分**程度の薄膜ディッシュ内の薬液を入れ替えるだけの「簡単かつ迅速」な前処理だけで電顕観察できるようにした。さらに、光顕・大気圧 SEM 複合システムでは、薄膜ディッシュの上に大気圧 SEM と反対側に光顕(蛍光顕微鏡)を配置しており、薄膜ディッシュ上の試料の同じ位置を光顕と大気圧 SEM で簡単に観察できるようにし

た。すなわち、一台の装置で、簡単に **Correlative Microscopy** を実現できるようにした。これによりバイオ系試料では、蛍光ラベルによる免疫染色を行った上で光顕により観察位置を特定し、その後大気圧 SEM で目的部位を高い空間分解能で観察することを簡単にできるようにした。また、上部にある光顕を用いたライブセル観察によりタイミングを選んで試料を固定し、その後大気圧 SEM で観察を行うことにより、時間的に変化する現象をタイミングを選んで簡単に高分解能観察できるようにした。これらにより、バイオ分野の研究開発効率を大幅に向上させることができた。また、ガンの術中検査への適用も検討を開始した。

本論文では、2.3 節で、大気圧 SEM の詳細を説明する。3 章で、大気圧 SEM、および、これを用いた **correlative microscope** 光顕・大気圧 SEM 複合システムの開発、および、これらを各種の観察に応用した結果について報告する。また、医療用検査技術への応用など、今後の可能性についても議論する。

1.3 高分解能 SEM

1.1 節に記載したように、近年高分解能 SEM の性能は、電場と磁場の両方を組み合わせた対物レンズ、および、対物レンズを通して電子線を検出する TTL (Through the lens) 検出システムの発展により、低ランディングエネルギーでの空間分解能と信号選択能力が飛躍的に高まった。このような高分解能 SEM の性能を評価するためにナノ材料は最適な試料である。

ナノ材料は、ナノサイズの構造を有する材料のことである。単一の元素や化合物で構成される場合、および、複数の元素や化合物で構成される場合がある。いずれにおいても、ナノサイズの構造を有することにより、様々な機能を持つことが大きな特徴である。たとえば、代表的なナノ材料のひとつであるメソポーラスシリカは、主成分が SiO_2 であるがそこには多数の細孔(pore)がある。このような細孔を有する材料は、ポーラス材料 (**porous material**) と呼ばれ、ガスを吸着するための表面積が大きいために例えば燃料電池に用いる水素タンクのガス吸蔵材として期待されている。また、孔のサイズを制御することにより、混合物から特定の化合物などを抽出するための分離にも適用できると期待されている。さらには、特定サイズの孔に特有の化学反応を促進すること、あるいは、孔の中に特定の化合物を導入することにより触媒としても期待されている。ナノ材料には、ポーラス材料以外にも様々なものがある。例えば、ヨークシェル材と呼ばれる一群は、殻(シェル)となる中空の構造を有し、かつ、殻の表面に様々な元素や化合物を配置することができる。例えば、殻に触媒となるナノ粒子を配置することにより、効率の高い触媒を形成できると期待されている。

しかしながら、これらの機能が良好に発現されるためには、ナノ構造を最適化する必要がある。最適化のためにはナノ構造を調べる必要があるが、その方法として、X線・電子

線回折、透過電子顕微法、および、原子間力顕微法などが複合的に用いられてきた(Liu et al., 2013)。これらは、いずれもナノから原子サイズの空間分解能を有するために、ナノ材料を観察するための強力なツールである。しかしながら、回折法では局所領域の情報を得ることが容易でない。また、透過電子顕微法では、試料の電子線透過方向の情報が積算されるため、表面近傍の構造を選択的に観察することは容易でない。原子間力顕微法では、表面近傍の構造を選択的に観察できるという特徴があるが、表面の凹凸が激しい材料への適用は限定される。また、原子間力顕微法での探針は有限の大きさであるため、ナノサイズの構造を観察するには制限がある。ナノ材料の機能は、特に表面近傍の構造に依存することが多く、例えばポーラス材料の機能は細孔が試料の外部に接続されているかに大きく依存する。このため、表面近傍の構造を観察することが必須である。また、表面近傍の凹凸が激しい場合も多い。

従来用いられてきた評価法の欠点を補うため、および、近年急速に空間分解能が向上してきたため、ナノ材料の評価に SEM を用いることが多くなってきた(Stevens et al., 2009)(Asahina et al., 2011)。特に、低ランディングエネルギーでの SEM 観察技術が近年急速に進歩し、観察時のチャージやダメージを低減できるようになるとともに、表面極近傍の観察ができるようになってきた。

本論文では、2.1 節と 2.2 節で SEM の基本的な原理を説明するとともに、2.4 節で近年の低ランディングエネルギーでの SEM の進歩についてまとめる(Suga et al., 2014)。また、4 章で代表的なナノ材料である、ヨークシェル材、メソポーラス LTA、IRMOF、メソポーラスシリカ結晶(SBA-15)、および、螺旋状の TiO_2 の評価にどのように SEM が使えるのか検討した結果を記載する(Suga et al., 2014)。電場と磁場を複合した対物レンズ、電界放射型電子源、エネルギーフィルタがついた TTL 検出システムの採用により、これらの材料の表面構造の観察ができるようになった。

1.4 特性 X 線を用いた組成分析

試料に電子線を照射すると、試料からは二次電子(SE)や BSE だけでなく、X 線が放出される。この X 線は連続 X 線と特性 X 線から成るが、特性 X 線のエネルギー(波長)は試料を構成する元素に固有であるため、これを用いて元素分析を行うことができる(Reed et al.)(Goldstein et al., 2003)。

本論文では、特性 X 線検出を利用した研究、および、特性 X 線を検出するための検出素子の改良に関する研究結果を記載する。2.5 節で、特性 X 線を用いた検出の原理とともに、検出できる深さがどのように決まっているか、X 線検出のスピードやエネルギー分解能がどのように決まっているか、近年の X 線検出デバイスの進歩などについて記載する。また、超電導体を用いることによる、抜本的な X 線検出素子のエネルギー分解能向上の可能性について記載する。

5章では、具体的な研究結果について記載する。5.1節では、特性X線分析を利用した迅速な強誘電体デバイスの評価方法についての応用研究について記載する(Suga et al., 2000)。測定時間の最適化と複数のランディングエネルギーでの測定を組み合わせることにより、デバイス作製途中の強誘電体薄膜の組成を精度 $\pm 1\%$ に向上させることに成功し、インライン検査や故障解析に適用できるようになった。

5.2節では、通常特性X線分析には半導体のpn接合を用いたデバイスが用いられるが、超電導接合を用いることにより特性X線のエネルギー分解能が大きく向上することが報告されている。しかしながら、接合のリーク電流が大きいことが、大きな障害となっていた。本研究では、素子のリーク電流を低減する方法について検討した結果を記載する(Suga and Kominami, 1995)。酸素プラズマ処理によりリーク電流の低減に成功し、これにより超電導体を特性X線検出器に適用できるようになると期待される。5.3節では、近年発展してきたシリコンドリフト検出器(SDD)を、ナノ材料の評価に適用した結果を記載する(Suga et al., 2014)。SDDは大面積の素子を形成することが可能であり、微弱なX線信号を検出できるため、ナノ材料の組成分析が可能となった。

2. 原理

2.1 走査電子顕微鏡

SEMは、収束した電子線を試料に照射し、試料から発生する信号を画像化することにより、試料の情報を得る装置である(Goldstein et al., 2003) (Reimer, 1998)。1章にも記載したように、ドブロイ波長が光の波長よりもはるかに短いために、電子線は光よりもはるかに小さい直径に絞り込むことができる。このため、SEMでは光学顕微鏡よりもはるかに高い空間分解能が得られることが特徴である。

試料に電子線を照射すると様々な信号が放出されるが(図 2.1.1)、SEMでは信号として二次電子(SE)と反射電子(BSE)が良く用いられる。SEとBSEについては、2.2節で詳細に説明する。また、特性X線、カソードルミネッセンス、オージェ電子なども放出されるが、これらは試料を構成する元素に特徴的なエネルギーを有するために元素分析に用いられる。特性X線については、2.5節でさらに説明する。

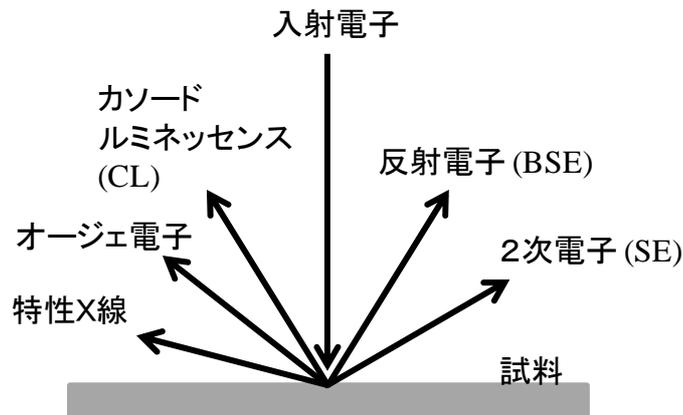


図 2.1.1 試料に電子線を照射した際に、試料から発生する様々な信号

SEMの動作原理を図 2.1.2 に示す。電子源から放出された電子線を陽極で加速した後、電子レンズで微小径に収束させた電子線を試料上に2次元走査する。これにより、試料から発生するSEやBSE等の信号を走査位置の関数として画像化することにより拡大像を得る。

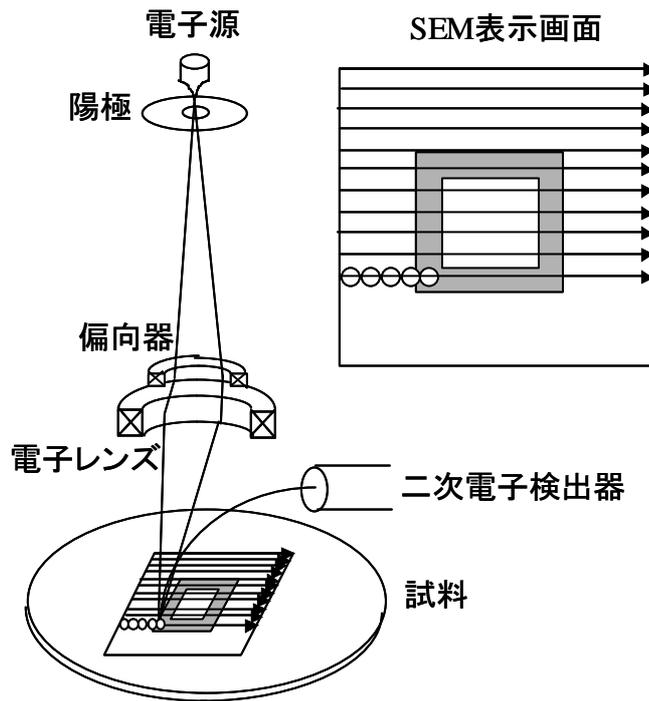


図 2.1.2 走査型電子顕微鏡の動作原理

図 2.1.3 に、SEM の構成を示す。電子光学系を主体とする本体、および、電気・制御系から構成される。本体は、電子銃、電子レンズ、偏向・非点収差補正器から構成された電子光学系、試料室、および、これらを真空に維持するための排気系から構成される。制御系は、電子線を発生させる電子銃用の高圧安定化電源、レンズ電源、プローブを走査・偏向する偏向制御回路、SE や BSE 等の試料からの信号を検出・処理する信号検出増幅回路、および、排気制御系から構成されている。

電子銃から放出された電子線を、コンデンサーレンズで収束する。コンデンサーレンズは、観察する SE 像などの明るさを調整するためのビーム電流制御、および、電子源の縮小率を調整するためのレンズである。対物レンズで試料に電子線を収束させるために適切な位置に電子線のクロスオーバーを結像させるとともに、レンズ強度の調整によって電子源の縮小率を調整し、実効的なソースサイズとビーム電流を制御するのに利用されている。

次に、対物レンズを用いて電子線を収束する。対物レンズは主にコイルと磁性材料で構成されるが、ポールピース(磁性材料)により磁場を集中させることにより電子線を集束する(図 2.1.4)。この収束した電子線を試料に照射する。この際に、偏向器を用いて試料上の電子線の移動や走査を行う。

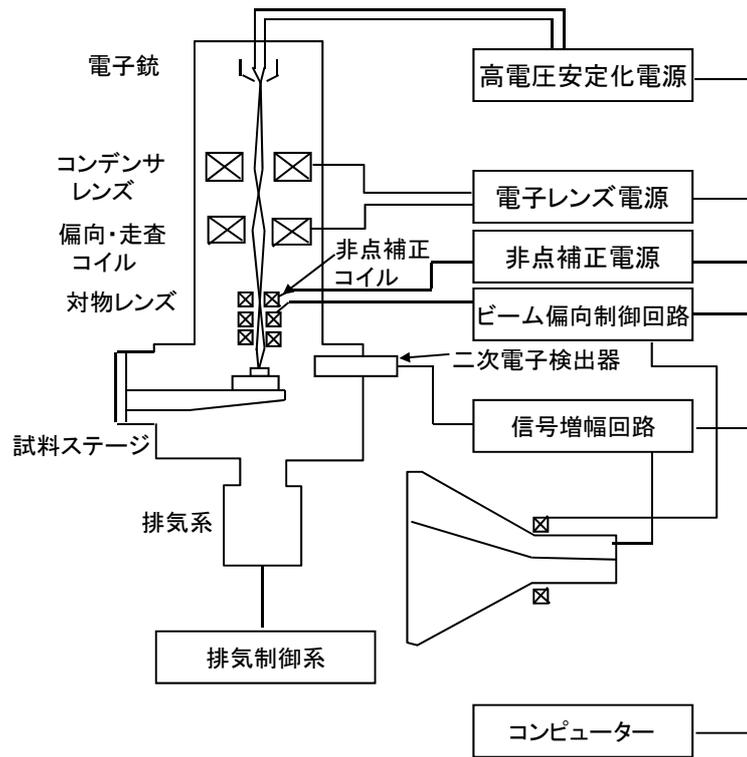


図 2.1.3 SEM の構成

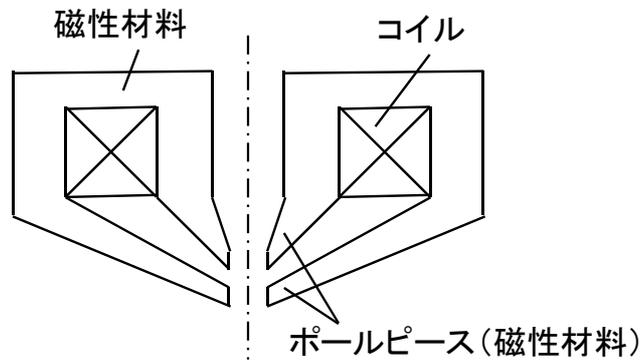


図 2.1.4 対物レンズの構成。

また、非点収差を補正するために、非点収差補正器(stigmator)を用いる。非点収差は、電子レンズの軸非対称な収束特性などに起因する収差であり、電子線をスポット的な形状からずらす。図 2.1.5 に、非点収差補正器の構成と制御回路の例を示す。非点収差補正器には、通常光軸に垂直な面内に配置した八極子構造のコイルが利用される。八極子は、四極

で構成されたコイルと、それと 45° ずらして配置したもう一組の四極コイルで構成される。2組の電流源からの電流を制御回路で調整することにより、ある方向に歪んだプローブ形状を円形に戻すことができる。

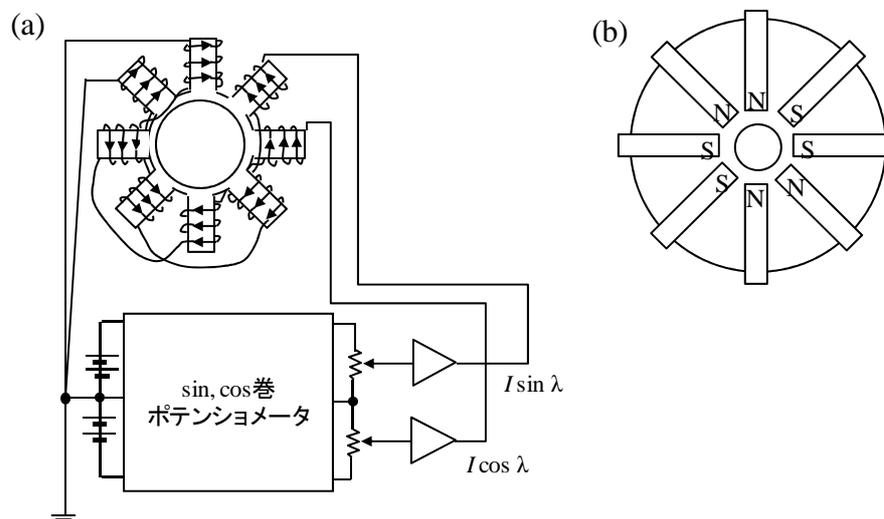


図 2.1.5 非点収差補正器、(a) 8 極子の構成と制御回路の例、(b) 非点収差補正器により形成される磁極。4 セットの対向する磁極により電子ビームの形状を円形に補正する。

試料より放出された SE は、SE 検出器で検出される。図 2.1.6 に、SE 検出器の例を示す。試料から放出された SE は、正の電圧を印加したグリッドで収集された後、正の高電圧を印加したシンチレータに衝突して捕獲され光に変換される。ライトガイドを通り光電子増倍管に導かれた光は、光の強度に対応した光電子に変換された後、多段のダイノードで電子増倍されて SE 信号として利用できるようになる。この SE 信号を陰極管(CRT)のグリッドに印加することにより、SE による SEM 像が得られる。このようにシンチレータと光電子増倍管を組み合わせた検出器は、Everhart と Thonley により開発されたため ET 検出器と呼ばれる(Everhart and Thornley, 1960)。

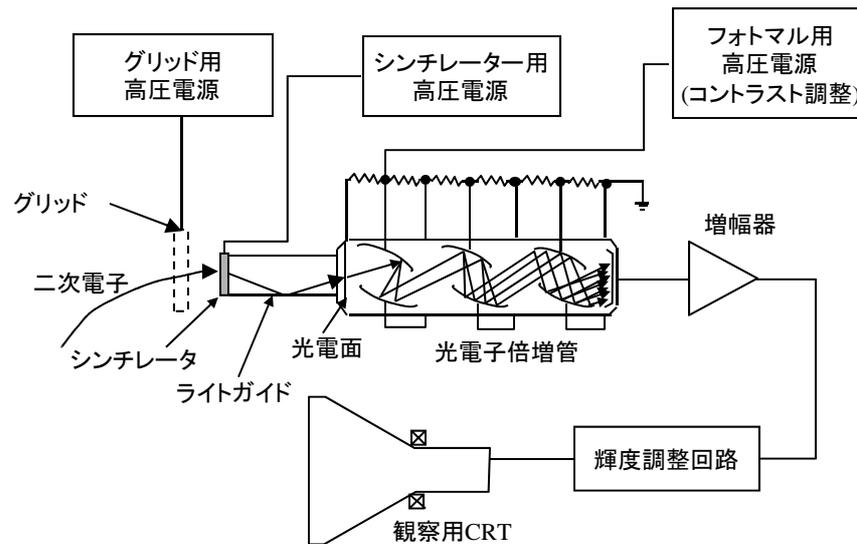


図 2.1.6 ET 型 SE 検出器の構成例

2.2 2次電子(SE)と反射電子(BSE)

2.2.1 レンジとモンテカルロ法

試料に電子線を照射すると、試料内部の弾性および非弾性散乱により、電子は試料内部で方向を変えると共にエネルギーを失う。これにより、照射電子は試料内部で Kanaya-Okayama レンジ R と呼ばれる程度に広がる(図 2.2.1)。 Kanaya-Okayama レンジ R (nm)は次式で与えられる(Kanaya and Okayama, 1972) (Reimer, 1998)。

$$R(\text{nm}) \approx \frac{27.6 \cdot A \cdot (\text{g} \cdot \text{mole}^{-1}) \cdot E_0 \cdot (\text{KeV})^{1.67}}{\rho (\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}) \cdot Z^{0.889}} \quad \dots \text{式 2.2.1}$$

ここで、 A は質量数、 E_0 は照射電子のエネルギー (keV)、 ρ は密度 (g/cm^3)、 Z は原子番号である。レンジは、ランディングエネルギーが大きい場合に大きく、かつ、試料が軽元素から構成される場合に大きい。

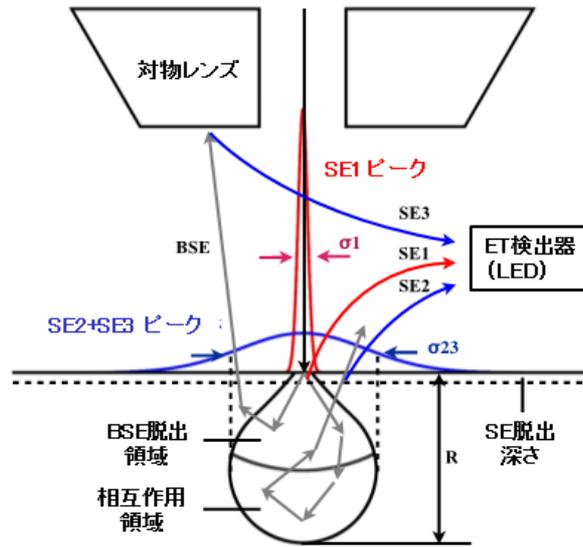


図 2.2.1 照射電子の試料内部での広がり と SE と BSE の発生領域

試料内部における照射電子の広がりやエネルギーは、モンテカルロ法を用いることにより、より詳細に調べることができる(Murata et al., 1971) (Shimizu and Ze-Jun, 1992) (Joy and Luo, 1989) (Goldstein et al., 2003) (Drouin et al., 1997) (Drouin et al., 2007)。電子は波であるため、試料内部における照射電子の振る舞いを正確に記述するためには波として取り扱う必要がある。しかしながら、波としての取り扱いが簡単ではないため、モンテカルロ法では試料がアモルファスであること、および、電子が粒子であることを仮定した近似計算を行う。様々なモンテカルロ計算方法があるが、ここでは代表的なモデルを説明する。

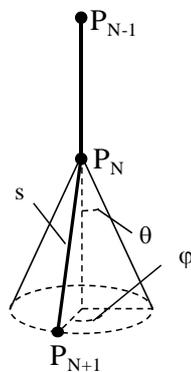


図 2.2.2 モンカルロ法における電子の角度変化

試料に入射した電子(粒子)は、弾性散乱により方向が変化し、非弾性散乱によりエネルギーを失うと仮定する。電子(粒子)は、試料内部で直線的な飛行と方向変化を繰り返すと仮定する(図 2.2.2)。直線的な飛行距離 s は、平均自由行程 μ と乱数により規定される。また、角度変化は、電子の進行方向に対し、2つの角度 φ と θ により与えられる(図 2.2.2)。これらの変数は、弾性散乱断面積 σ_{el} により計算される。弾性散乱断面積には、簡単に解析的な解が得られることから、スクリーンされたラザフォード散乱モデル (screened Rutherford model) が用いられることが多い(式 2.2.2)。

$$\frac{d\sigma_{el}}{d\Omega} = |f(\theta)|^2 = \frac{e^4 Z^2}{4(4\pi\epsilon_0)^2 m^2 v^4} \cdot \frac{1}{[\sin^2(\theta/2) + \sin^2(\theta_0/2)]^2} \quad \dots \text{式 2.2.2}$$

ここで、

$$\sin(\theta_0/2) \simeq \theta_0/2 = \lambda/4\pi R \quad \dots \text{式 2.2.3}$$

$$R = a_H Z^{-1/3} \quad \dots \text{式 2.2.4}$$

$$a_H = h^2 \epsilon_0 / \pi m_0 e^2 \quad \dots \text{式 2.2.5}$$

である。ただし、 σ_{el} は弾性散乱断面積 ($m^2/atom$)、 e は電子の素電荷 ($1.60 \times 10^{-19} C$)、 Z は原子番号、 ϵ_0 は真空中の誘電率 ($8.85 \times 10^{-12} C^2 s^2 / N$)、 m は電子の静止質量 (Kg)、 v は電子の速度 (m/s)、 a_H はボーア半径 ($5.69 \times 10^{-11} m$)、 λ は電子の波長 (m) である。また、式 2.2.2 の θ_0 に関係した項はスクリーニングの寄与であり、式 2.2.3 で定義される。弾性散乱の平均自由行程 $\mu(m)$ は

$$\mu = \frac{A}{N_A \rho \sigma_{el}} \quad \dots \text{式 2.2.6}$$

で与えられ、直線飛行距離 $s(m)$ はここから乱数 RND_1 を用いて、

$$s = -\mu \log_e(RND_1) \quad \dots \text{式 2.2.7}$$

と計算される。また、2つの角度 φ と θ は2つの乱数 RND_2 と RND_3 を用いて

$$\theta = \cos^{-1} \left[1 - \frac{2\alpha RND_2}{(1 + \alpha - RND_2)} \right] \quad \dots \text{式 2.2.8}$$

$$\varphi = 2\pi RND_3 \quad \dots \text{式 2.2.9}$$

と計算される。ただし、 α は

$$\alpha = 3.4 \frac{Z^{2/3}}{E} \quad \dots \text{式 2.2.10}$$

である。また、直線飛行の間に連続的にエネルギーを失うと仮定することが多いが (continuous slowing down model)、単位長さあたりのエネルギー損失量 dE/dx は

$$\frac{dE}{dx} = \frac{2\pi e^4 N_A Z}{(4\pi\epsilon_0)^2 A E} \ln \left[\frac{1.166(E+kJ)}{J} \right] \quad \dots \text{式 2.2.11}$$

で与えられる (Joy and Luo, 1989)。ただし、 J (eV) は

$$J = \left[9.76Z + \frac{58.5}{Z^{0.19}} \right] \quad (Z \text{ が } 13 \text{ 以上の場合}) \quad \dots \text{式 2.2.12 (a)}$$

$$J = 11.5Z \quad (Z \text{ が } 12 \text{ 以下の場合}) \quad \dots \text{式 2.2.12 (b)}$$

であり、 k はカーボンに対する 0.77 と金に対する 0.85 の間の値である。

角度変化と直線的な飛行を繰り返すことにより、試料内部での電子線の広がり方を計算できる。ランディングエネルギーが 15 keV の場合の炭素、シリコン、金に対するモンテカルロ計算結果を図 2.2.3 に示す。ただし、シミュレーションには CASINO を用いた (Drouin et al., 1997) (Drouin et al., 2007)。試料の原子番号が大きくなるとともに、試料内部におけるレンジが小さくなることわかる。

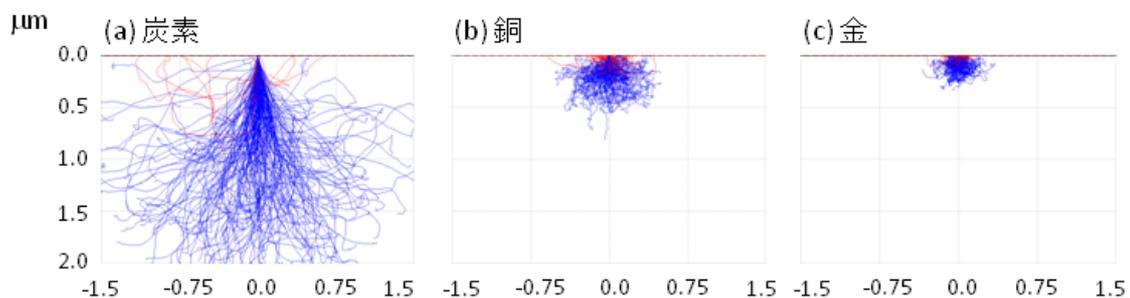


図 2.2.3 モンテカルロシミュレーションで計算した各試料中の電子線の広がり。(a) 炭素、(b) 銅、(c) 金。原子番号が大きくなるとともに、広がり方は小さくなる。

2.2.2 2次電子(SE)と反射電子(BSE)

試料に電子線を照射すると、図 2.2.4 に示すように、試料からは様々なエネルギーの電子

が放出される。これらのうち、エネルギーが 50 eV 以上のものを反射電子(BSE)と呼び、50 eV 以下のものを二次電子(SE)と呼ぶ(Reimer, 1998) (Goldstein et al., 2003)。また、BSE の中で、入射電子と同じエネルギーを持つものを弾性散乱電子と呼ぶ。弾性散乱電子よりも少しエネルギーが低いところにプラズモンロスした電子がある。その他、オージェ電子なども観察される。

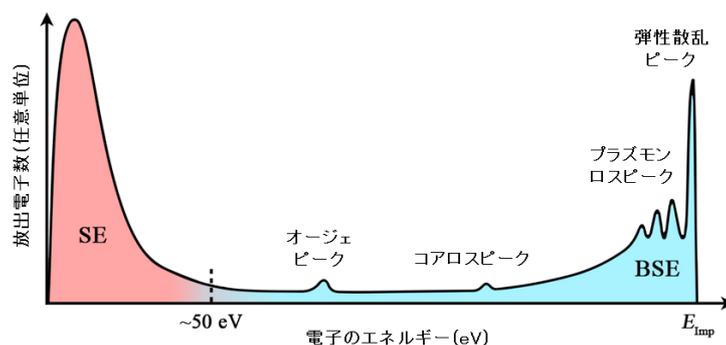


図 2.2.4 信号電子強度のエネルギー依存。歴史的な理由により、50 eV 以下のエネルギーを持つ電子を二次電子(SE)、50 eV 以上のエネルギーを持つ電子を反射電子(BSE)と呼ぶ。照射電子と同じエネルギーを持つ弾性散乱電子によるピークを弾性散乱ピークと呼ぶ。それよりも少しエネルギーが低い領域に、プラズマ散乱によりエネルギーを失ったプラズモンロスピークが観察される。さらに、内殻電子の非弾性散乱によるコアロスピークやオージェ電子によるオージェピークがある。図は(熊谷和博, 2010)より改変。

前項に記載したように、照射電子は試料内部で広がるが、その一部は試料表面より放出される。その中でエネルギーが 50 eV 以上のものが、BSE の主成分である(図 2.2.4)。BSE は、Kanaya-Okayama range R の半分程度の領域から放出されるため(図 2.2.1)、BSE 像の空間分解能はこの程度と考えられてきた。特に、ランディングエネルギーが大きな場合はレンジが大きくなるために、空間分解能が低いと考えられてきた(Joy, 1991)。

また、BSE 信号は、上記したように弾性散乱と強く関連している。式 2.2.2 に記載されているように、弾性散乱断面積は Z^2 に比例するため、BSE の信号強度は Z^2 と強い関係がある。ただし、多重散乱や非弾性散乱の影響も受けるために Z^2 に完全に比例するわけではない。

一方、照射電子は非弾性散乱により試料内部の電子を励起するが、励起された電子の一部は試料表面から放出される(Seiler, 1983)。これらの中でエネルギーが 50 eV 以下のものが、SE の主成分である。SE の平均的な脱出深さは、金属の場合 0.5 - 1.5 nm、絶縁体の場合 10 - 20 nm とされており(Seiler, 1983)、試料の表面近傍で励起された電子のみが試料から放出される。これらの SE 中で、照射電子が試料に照射された直後に、照射点近傍の電子

を励起することにより試料外に放出される SE を SE1 と呼ぶ(図 2.2.1)。また照射電子が試料内部で散乱されて BSE として放出される際に、BSE が試料表面近傍の電子を励起することにより放出される SE を SE2 と呼ぶ(図 2.2.1)。さらに、BSE が対物レンズの下部やチャンパー内部に衝突することにより発生する SE を SE3 と呼ぶ(図 2.2.1)。SE1 は照射点近傍の情報を有するために、高い空間分解能の成分を含む(図 2.2.1 の σ_1)。これに対し、SE2 や SE3 は BSE に起因するために BSE と同程度の空間分解能を有する (図 2.2.1 の σ_{23})。すなわち、加速電圧が高い際には、レンジが大きくなるために、空間分解能が高い成分である SE1 と空間分解能が低い SE2 や SE3 の成分が重畳された情報が得られる (図 2.2.1) (Seiler, 1983) (Joy, 1991)。

典型的な SE 像と BSE 像を図 2.2.5 に示す。軽元素(例えばシリコン)から成るマトリクスに重元素(例えば金)が含まれている場合(図 2.2.5 (b))は、重元素(例えば鉛フリーはんだ)から成るマトリクスに軽元素(例えばポリスチレン)が含まれている場合(図 2.2.5 (d))と比較して、BSE 像のコントラストが高い。後者の場合、ポリスチレンを観察することは困難である(図 2.2.5 (d))。これらは、上記したように BSE の信号強度が Z^2 に関連しているためである。これに対し、SE 像ではいずれも良く観察できる(図 2.2.5 (a)と(c))。

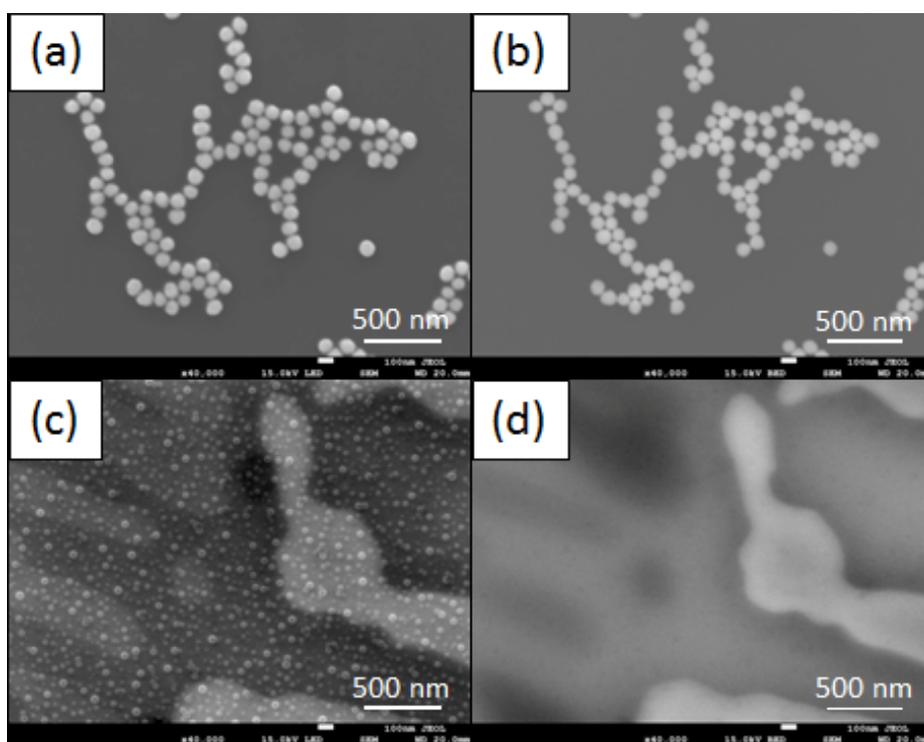


図 2.2.5 SE 像と BSE 像における重元素と軽元素によるコントラスト。シリコン基板(軽元素)上の金(重元素)の(a)SE 像と(b)BSE 像。鉛フリーはんだ(重元素)上のポリスチレン(軽元素)の(c)SE 像と(d)BSE 像。観察条件: 電子線のランディングエネルギー = 15 keV; 基板

バイアス電圧 = 0 kV ; ワーキング長 = 20 mm。

2.3 大気圧 SEM

2.3.1 原理

1章にも記載したように、Abrams と McBain は電子顕微鏡が発明されてまもなく大気中や液中の試料を観察する方法を提案・試作した(Abrams and McBain, 1944)。後に環境セルと呼ばれるようになる彼らの方法を図 2.3.1 に示す。環境セルは、カプセルに電子線を透過する 2 枚の薄膜を配置したものである(Butler and Hale, 1981) (de Jonge and Ross, 2011)。カプセル内部にガスや液体の中に入った試料を配置するとともに、カプセル全体を真空下の TEM 試料室に配置する。2 枚の薄膜は電子線を透過する程度に薄く、かつ、ガスや液体と真空の圧力差に耐える程度に強いことが要求される。Abrams と McBain はこの薄膜をコロジオン膜で形成した(Abrams and McBain, 1944)。電子線は 1 枚目の膜、ガスあるいは液体とその中に入った試料、および、2 枚目の膜を透過する。このようにして、大気圧下のガスや液中の試料を観察できる。TEM 用の環境セルは、その後様々に改良された。1981 年には、Butler と Hale によりかなり詳細なレビューがなされた (Butler and Hale, 1981)。また、近年は、MEMS の技術を利用することにより、アモルファスの窒化シリコン(SiN)薄膜を用いた様々な構造のセルが開発されている(de Jonge and Ross, 2011) (Creemer et al., 2008) (Zheng et al., 2009)。大気圧よりも高い圧力での観察、あるいは、格子像の観察なども実現されている(Creemer et al., 2008) (Alan et al., 2012)。隔膜として、graphene が用いられることもある(Yuk et al., 2012)。

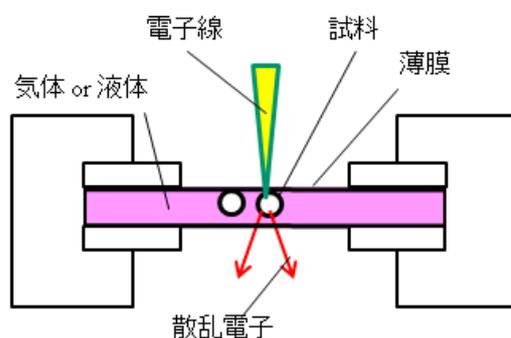


図 2.3.1 TEM 用環境セル

このような電子線透過薄膜を、走査電子顕微鏡に適用する試みもなされてきた。Green と Kino は、SiN 薄膜を配置することにより、大気中の試料を観察できる SEM を開発した

(Green and Kino, 1991)。鏡筒の先端に SiN 薄膜を配置することにより、大気中の試料に集束電子線を照射し、試料から反射した BSE を再度 SiN 薄膜を透過させた上で真空の鏡筒内で検出した。この方法では、大気に解放された大気下の試料を観察できるが、液中の試料などを観察することは困難であった。

Thiberge らはこの手法を改良し、液中試料の観察をできるようにした(Thiberge et al., 2004b) (Thiberge et al., 2004a)。彼らは TEM 用と類似な環境セルを開発したが、薄膜は1枚のみ配置した(図 2.3.2)。真空側から薄膜を介して液中の試料に電子線を照射し、試料より反射した BSE を再度薄膜を通して真空側に配置した検出器で検出する(図 2.3.2)。このようにして、液中試料の観察に成功した。この手法は、2.2.2 項に記載したように、ランディングエネルギーが高い場合、BSE 検出により最大レンジの半分程度の深さまで観察可能である。

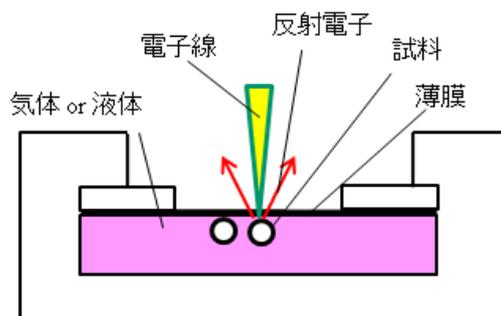


図 2.3.2 SEM で液体中を観察するためのカプセル

これらに対し、筆者らは倒立 SEM の上部に、底部にアモルファスの窒化シリコン(SiN)より成る薄膜を有する直径 35 mm のペトリディッシュ(薄膜ディッシュ)を配置する大気圧 SEM(図 2.3.3)を開発した(Nishiyama et al., 2010)。Green and Kino、および、Thiberge らと同様に、真空側から薄膜を介して試料に電子線を照射し、試料より反射した BSE を真空側に配置した円環状の BSE 検出器で検出する。これにより、液体中の試料を大気に開放された試料室内で観察できるようになった。電子線が下側から試料に照射される点も大きな特徴である。また、薄膜ディッシュの上部には光頭が電頭と同軸上に配置され、かつ、試料は2つの顕微鏡の間に配置した X-Y ステージで移動できるため、試料の常に同じ部位を光頭と電頭で観察できる。

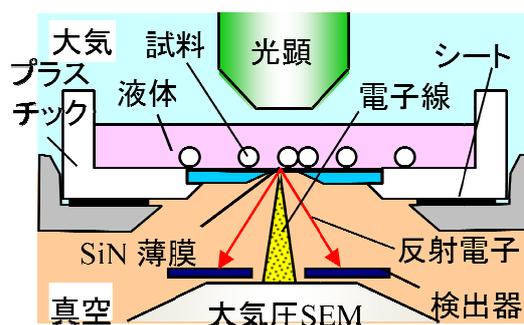


図 2.3.3 大気圧 SEM の観察原理

本開発により、バイオ系・材料系試料のそれぞれに対して、主に以下のメリットがある。バイオ系では、近年電顕と光顕で同一部位を観察する **Correlative Microscopy** が多用されている。例えば、光顕と免疫染色を用いて特定のタンパク質が局在する部位を特定した上で、電顕で対応する部位を高分解能観察するのに用いられている。大気圧 SEM を用いることにより **Correlative Microscopy** を簡単に実現できる。また、試料が常に溶液中に配置されているため、抗原性を保つことが容易であり、電顕用の免疫染色を実施しやすい(バイオ試料では、タンパク質の位置を調べるために、抗原抗体反応が用いられる。抗原と抗体は、カギとカギ穴のような関係で、特定の組み合わせの場合に付着する。タンパク質は抗原であるが、ターゲットのタンパク質に対する抗体に蛍光体などのラベルをつけておくことにより、ターゲットタンパク質の位置を特定できる。しかしながら、脱水や乾燥などの電顕観察用前処理により、抗原が劣化し、抗原抗体反応が起こりにくくなる。大気圧 SEM 観察では、試料を常に湿潤環境に保持できるために、このような抗原性の劣化を抑制できる (Maruyama et al., 2012a))。さらに、薄膜ディッシュは取り外し可能なため、CO₂ 培養室内で細胞を培養できる。従来のカプセルでは、培養液の量が 15 μ l と限定されていたため、細胞によっては安定な培養が困難であった。これに対して、最大 3 ml の培養液を入れられるために蒸発の影響を小さくすることが可能であり、バイオ系の試料に対しては安定な細胞培養が可能である。

材料系では、倒立 SEM を用いたために、液体中に沈む試料の観察ができるようになった。BSE を検出するために、基本的には Z が大きく密度が高い試料の観察が得意であるが、このような試料は液体に沈むものが多く、従来の電子線を上方から照射する方法では観察できないものが多かった。特に、このような試料の物理的・化学的な動きを動的に観察できることが大きな特徴である。また、試料室が大気に解放されていることから、蒸発などの体積が急速に変わる現象も観察できる。観察中に、外部から試薬などを滴下することも可能である。さらに、電極を形成したディッシュやヒーターを組み込んだディッシュなどの特殊ディッシュを開発することにより、電気化学反応や試料の温度変化なども観察できる (Suga et al., 2011)。上部の光顕と大気圧 SEM で、逐次あるいは同時に大気圧下の試料を

観察できることも、様々な現象の解明に役立つと思われる。

なお、通常の SEM では 2 次電子を用いて試料の表面を観察するため、立体的な画像が得られることが多い。これに対し、大気圧 SEM では反射電子を用いて観察するために、材料の原子番号に依存したコントラストが得られる(2.2.2 項)。このため、高角のダークフィールド STEM 像に近い画像が得られる。

2.4 高分解能 SEM

2.4.1 低加速 SEM の必要性

2.1 節に記載したように、照射された電子線は試料内部で広がるため、細く集束された電子線を試料に照射しても空間分解能が高い画像が得られるとは限らない。BSE 像では、照射点から大きく離れた所(大体式 2.2.1 で与えられる R の 1/2 程度、図 2.2.1)の領域からの信号を検出するため高い空間分解能は得られない(Reimer, 1998) (Joy, 1991)。また、SE も SE1, SE2, および SE3 の和であり、SE2 と SE3 は BSE に起因しているため、空間分解能が高い成分に空間分解能が低い成分を重畳した信号となる(Seiler, 1983)。Joy らは、ランディングエネルギーが高い時、例えば 20 keV の際の SE 像の空間分布依存性を図 2.4.1 (a) のように模式的に示した(Joy, 1991)。

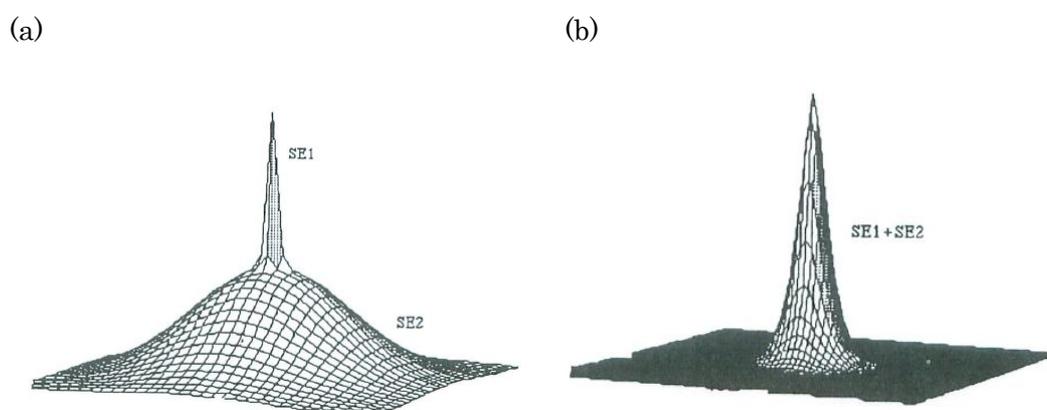


図 2.4.1 SE の発生領域のランディングエネルギー依存。(a) ランディングエネルギー = 20 keV。(b) ランディングエネルギー = 2 keV。図は許可を得た上で転載: ref (Joy 1991), copyright 1991 Wiley。

ところで、BSE の発生領域は、レンジを小さくすることにより小さくできる。図 2.4.2 に、様々なランディングエネルギーの照射電子が試料内部で広がる様子を示す。ランディングエネルギーが低くなるとともに、試料内部での広がり小さくなり、これに伴い BSE

信号が発生する領域が小さくなるのがわかる。

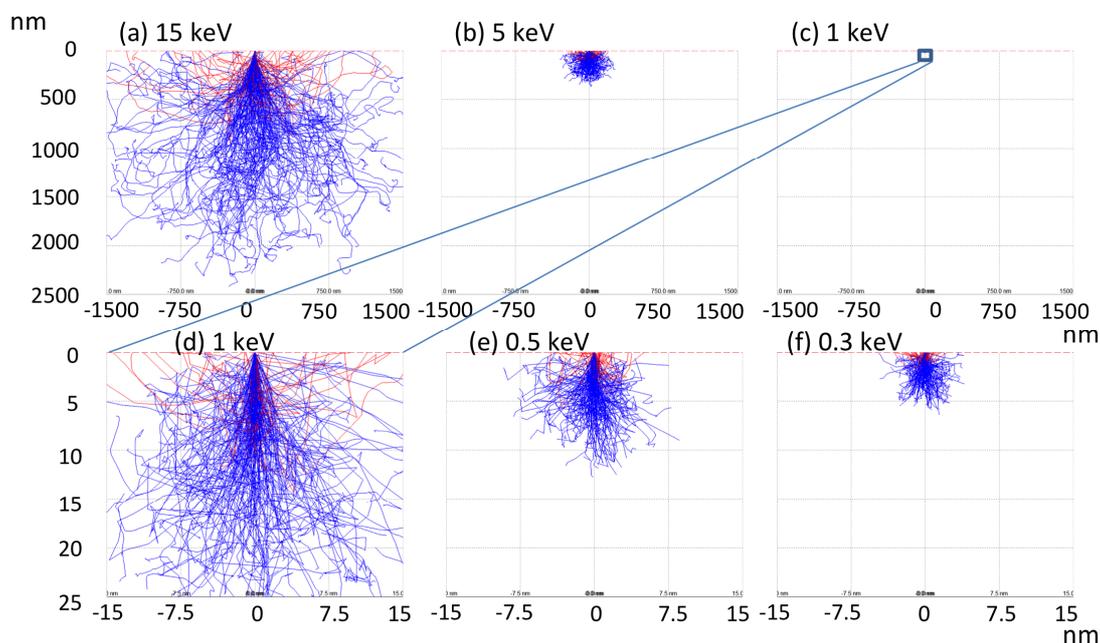


図 2.4.2 モンテカルロシミュレーション (refs)で計算したバルクのシリコンと相互作用する電子の軌跡。赤で記載した電子は BSE である。典型的なモンテカルロシミュレーションでは、照射電子は粒子として取り扱われる。

低ランディングエネルギーでは、試料内部における照射電子の広がりや SE の脱出深さ程度になると考えられている。このため、BSE 像の空間分解能は、SE1 像の空間分解能と同程度になると予測される。また、SE2 の成分も高い空間分解能となるため、高コントラストの SE 像が得られると期待される(図 2.4.1(b))。このため、SEM では低ランディングエネルギーの方が表面の情報が得やすく、エネルギーを高くするとより深い部分からの情報が重畳される(Joy, 1991) (Joy and Joy, 1996) (Reimer, 1998)。

2.4.2 チャージング低減

図 2.4.3 に、電子放出率のランディングエネルギー依存性を示す(Reimer, 1998)。電子放出率 (σ)は、入射電子数に対する放出電子数の割合であり、SE の放出率(δ) と BSE の放出率(η)の和である。電子の放出率が 1 より小さい場合に、試料は負に帯電し画像は歪む。電子の放出率はランディングエネルギーが小さくなるとともに増加し低エネルギーの時にはしばしば 1 以上となるが、非常に小さなエネルギーでは再び減少する(図 2.4.3)。 通常のモ

デルからは電子の放出率 σ が1の時にはチャージングは起こらないと予測されるが、現実には単純なモデルから予測されるよりも複雑である(Cazaux, 1999) (Ying and Thong, 1994) (Melchinger and Hofmann, 1995) (Renoud et al., 2002)。いずれにせよ、ランディングエネルギーを下げることにより、多くの場合チャージングを少なくすることができる。なお、スキャン方法の工夫によっても、チャージングを低減できる。例えば、各点への照射時間を減らすとともに複数回スキャンを行い、かつ、各点からの信号を積算することによりチャージの影響を低減できる。これは、照射された電子が絶縁体にとどまることにより帯電が生じるが、電子がドリフトや拡散で移動することにより帯電が緩和するためである。照射時間を帯電の緩和時間よりも短くすることにより、帯電を抑制できると考えられている。

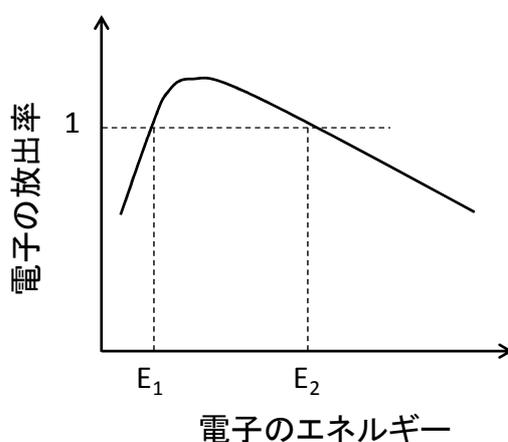


図 2.4.3 電子放出率のランディングエネルギー依存

2.4.3 低加速 SEM の実現方法

上記したように、ランディングエネルギーを低くすることにより、信号の発生領域を小さくできるので、空間分解能を高くできると期待される。また、帯電を減らせる。しかしながら、ランディングエネルギーを小さくすると、試料に照射する電子線を細く集束することが大変になる(Reimer, 1998) (Joy and Joy, 1996)。この節では、電子線のプローブ径が各種のパラメーターにどのように依存するかを説明するとともに、低ランディングエネルギーで電子線を細く絞るための方法を説明する。また、電子線を細く集束するためには、後述するように、試料とレンズを近接させる必要がある。この場合、試料チャンバー内部に配置した古典的な ET 検出器(図 2.1.6)で電子を検出することが難しくなる。これを解決するために、TTL 検出器と呼ばれる対物レンズを通った信号電子を電子カラム内で検出する方式について説明する。さらに、TTL 検出器にエネルギーフィルタを付加することにより、SE 信号と BSE 信号を同時に分離して検出する方法についても説明する。

2.4.3.1 プローブ径

電子線直径の理論的な計算結果は、SEM で実験的に決定された空間分解能に関係している(Sato, 2008)。高分解能 SEM 観察には、試料表面における最小の電子線径(プローブ径)が必要である。照射電子のプローブ径は、次のように最小錯乱円で見積もられる(Reimer, 1998)。

$$d = \sqrt{d_0^2 + d_d^2 + d_s^2 + d_c^2} \quad \dots \text{式 2.4.1}$$

ただし、 d_0 , d_d , d_s と d_c は、それぞれソース径、回折、球面収差、および、色収差からの寄与であり、次のように表される。

$$d_0 = \frac{2}{\pi\alpha} \sqrt{\frac{I_P}{\beta}} \quad \dots \text{式 2.4.2}$$

$$d_d = \frac{0.6 \cdot \lambda}{\alpha} \quad \dots \text{式 2.4.3}$$

$$d_s = 0.5 \cdot C_s \alpha^3 \quad \dots \text{式 2.4.4}$$

$$d_c = C_c \frac{\Delta E}{E} \alpha \quad \dots \text{式 2.4.5}$$

ここで、 I_P は照射電子の電流、 β は電子源の輝度、 α は照射電子の試料位置における開き角、 λ は試料位置における照射電子の波長、 C_s は球面収差係数、 C_c は色収差係数、 ΔE は電子源のエネルギー幅、および、 E は試料位置における照射電子のエネルギーである。

低エネルギーの電子で小さなスポット径を得るためには、まず β がランディング電圧に比例することに注意する必要がある。このため、低ランディング電圧では、式 2.4.2 よりスポット径が大きくなることがわかる。そこで、 β が大きな電子源が必要となる。 β が十分に大きくなると、 d_0 の項は d_d の項と比較して無視できる程度に小さくなる。次に、 λ が E に反比例することに注意を払う必要がある。このため、低ランディングエネルギーでスポット径を小さくするためには、式 2.4.3 より α を大きくする必要がある。 α の増加により、式 2.4.4, 2.4.5 からスポット径が大きくなることがわかるが、これを防ぐためには、 C_s , C_c , ΔE を小さくする必要があることがわかる。さらに、式 2.4.5 より低ランディングエネルギーでは E が小さくなるために、スポット径が大きくなることがわかる。これを防ぐためには、 C_c , ΔE を小さくする必要があることがわかる。

以上をまとめると、低ランディングエネルギーでスポット径を小さくするためには、

電子源として輝度 B が高く、かつ、エネルギー幅 ΔE が狭いものが必要
対物レンズとして球面収差係数 C_s と色収差係数 C_c の小さなものが必要

であることがわかる。前者には、電界放射型電子源が必要であり、後の2つを低減するためには対物レンズの改良が必要である。以下、それぞれについて説明する。

なお、式 2.4.1 はビーム径をラフに見積もるには良い方法であるが、より詳細な見積もりには、波動光学的な計算(Sato and Orloff, 1991)、あるいは、それに対する解析的な近似方法(Barth and Kruit, 1996)が必要である。

2.4.3.2 電子源

いくつかの電子源が SEM に用いられているが、最初に実用化されたのは熱電子源である。熱電子源は、熱励起された電子が先鋭化された金属(ティップ)の先端から真空中に放出されることで動作する。他の電子源と比較して輝度が低くエネルギー幅が広い(表 2.4.1)のために低ランディングエネルギーでの SEM 観察に最適ではないが、現在でもコストパフォーマンスの高い装置の電子源として活用されている(Bell and Erdman, 2012) (Goldstein et al., 2003)。

これに対し、Crewe らは電子顕微鏡向けにコールド電界放出型電子源(cold field emitter (CFE))を開発した(Crewe et al., 1968)。そこでは、ティップの先端に強い電界を印加することで、量子力学的なトンネル効果により電子が電子源表面から放出される。輝度が高く、かつ、エネルギー幅が狭いために、低ランディングエネルギーでの電子源に適している。しかしながら、観察の最中に電子源表面に様々な分子が吸着することにより、電子線にノイズが重畳し、かつ、時間とともに電子線強度が低下するという課題がある。

その後、ショットキー電子源が開発された(Swanson and Crouser, 1969) (Swanson and Schwind, 2008)。ショットキー電子源は、熱電界放出電子源(thermal field emitter (TFE))とも呼ばれる。両者は、正確には動作原理が異なるために、区別されるべきものである。すなわち、ショットキー電子源は、基本的には熱電子源と同様に熱励起された電子がバリアを超えて真空中に放出されることで動作するが、この際にティップの先端に強い電界をかけてバリアの高さを低減することにより、熱電子源と比較して輝度やエネルギー幅を大幅に改善できる(表 2.4.1)。TFE は、基本的には CFE と同じ原理で動作するが、加熱することによりティップ表面への吸着の課題を少なくしている。このように両者の原理は異なるが、両者は区別されないことも多い(Bell and Erdman, 2012)。同一のハードウェアで実現できる場合が多いこと、および、ショットキーで放出される成分と電界放出される成分が混ざっている場合も多いと思われる。

CFE, TFE, ショットキー電子源はまとめて FE 電子源と呼ばれ、また、これを搭載した SEM はまとめて FE-SEM と呼ばれており高性能 SEM の代名詞になっている。低ランディングエネルギーでの SEM の性能向上には、FE 電子源の実用化が重用な役割を果たした。

表 2.4.1 各種電子源の性能比較(Goldstein et al., 2003)

電子源	輝度 (A/cm ² sr)	エネルギー幅 ΔE (eV)	ビーム径 (nm)
熱電子	10 ⁵ - 10 ⁶	1 - 3	5,000 - 100,000
ショットキー	10 ⁸	0.3 - 1	15 - 30
冷陰極	10 ⁸	0.3	< 5

2.4.3.3 電磁場重畳レンズ

低ランディングエネルギーで C_s と C_c を低減するためには、電場と磁場を組み合わせた複合レンズの開発が重用であった。

(1) 複合電子レンズ

対物レンズの収差係数は、高いランディングエネルギーでは、静電レンズよりも磁場レンズの方が小さい。しかしながら、電界放出電子源の導入と低加速 SEM の必要性により、静電レンズに対する興味が高くなった(Zach, 1990) (Mullerova and Lenc, 1992)。静電レンズの最大電界は放電により制限され、また、磁場レンズの最大磁界はポールピースの飽和により制限される。これらにより、対物レンズの短焦点化は制限され、電場あるいは磁場単独での球面・色収差の低減は限定的であった。

Pease は、磁場レンズと静電場を組み合わせることにより、低ランディングエネルギーにおける SEM の球面収差と色収差を低減できることを理論的・実験的に示した(Pease, 1967)。図 2.4.4 に、彼が用いた装置の概略構成を示す。通常の磁場レンズを有する SEM の試料(基板)に、負の高電圧を印加できるようにしたことが大きな特徴である。試料はアパーチャーに対して負にバイアスされているため強い電場の中に浸漬されており、これによりレンズ効果が得られる。その結果、試料に向かう電子の集束力が高まり、電場や磁場単独のレンズと比較してより短焦点を実現できるために収差係数を小さくできる。また、この構成のメリットとして、カラムの内部での電子線エネルギーがランディングエネルギーより大幅に高いためにカラム外部からの外乱を受けにくい。彼はこの組み合わせにより、ランディングエネルギーを 10 eV まで低減させることにも成功した(Pease, 1967)。いわゆる、超低加速 SEM の草分けということができよう。

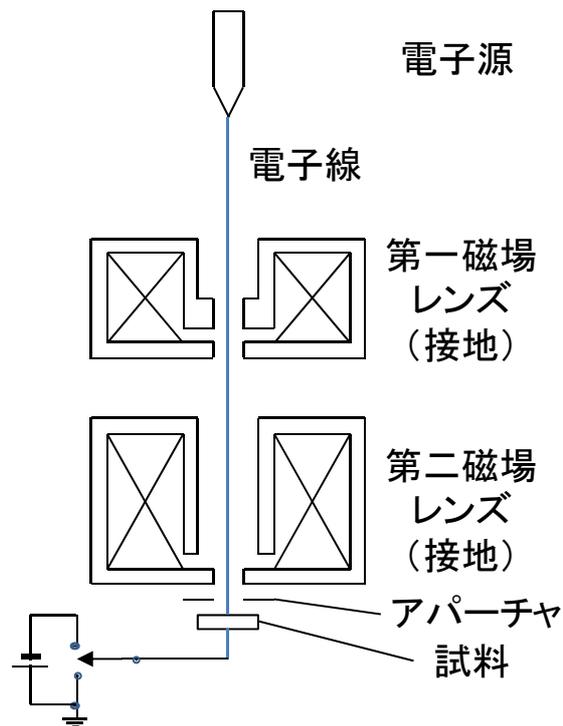


図 2.4.4 Pease が実現した電場と磁場の両方を用いた装置の概念図。試料(基板)に負の高電圧を印加することにより、磁場レンズと試料の間に電場を形成できる。Ref (Pease 1967)。

Yau らは、その目的は電子線リソグラフィ開発であったが、電場と磁場の組み合わせによるプローブ径低減についてさらに検討した(Yau et al., 1981)。彼らは、2つの方式を検討した(図 2.4.5)。いずれの場合においても、Pease の場合と同様に、電場と磁場を組み合わせた構成であるため短焦点を実現可能であり収差係数を小さくできた。(Yau et al., 1981)。Yau らは、図 2.4.5 の(a)の方式で、着地エネルギーが 1 keV の際に $C_s = 4.1$ mm, $C_c = 1.0$ mm, 400 eV の際に $C_s = 1.5$ mm, $C_c = 0.4$ mm, 100 eV の際に $C_s = 0.4$ mm, $C_c = 0.1$ mm と計算した。また、実験的には着地エネルギーが 400 eV の際に $C_s = 1.4$ mm, $C_c = 0.4$ mm を実現した。また、図 2.4.5 の(b)の方式で、着地エネルギーが 1 keV の際に $C_s = 0.79$ mm, $C_c = 0.66$ mm, 100 eV の際に $C_s = 0.10$ mm, $C_c = 0.08$ mm と計算した。実験的には、着地エネルギーが 1 keV の際に、 $C_s = 0.82$ mm, $C_c = 0.3$ mm を実現した。図 2.4.5 において、(b)の方式の方が(a)の方式よりも C_s , C_c が小さいのは、(b)では試料が磁場に浸漬されているため磁場による電子線集束の効果が高いためである。また、電場を用いたレンズでは、ランディングエネルギーが小さいほうが C_s , C_c の値が小さくなる。これは、ランディングエネルギーが小さい方が、静電レンズの効果が強くなるためである。

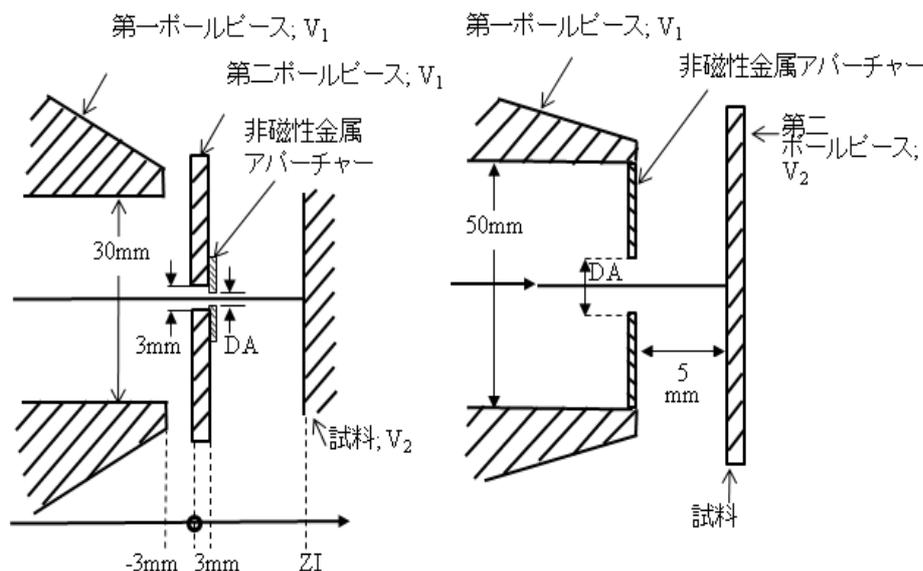


図 2.4.5 Yau らが実現した電場と磁場の両方を用いた2つの対物レンズ。(a) 磁場が第一と第二のポールピースの間に形成され、かつ、第二のポールピースとターゲット(試料)の間に電圧が印加される。試料は電場の中に浸漬(immersed)されるが、磁場の中には入らない。磁場と電場の関係は、Pease らと類似である。(b) 磁場と電場が第一と第二のポールピース間に加えられており、ターゲット(試料)は第二のポールピースの上に配置されている。試料は、電場と磁場の両方の中に浸漬されている。図は許可を得た上で修正の上転載: ref (Yau et al, 1981), copyright 1981 Elsevier。

これらを基本として、様々な複合レンズが実現された。Frosien らは、基板にバイアス電圧を印加するかわりに、カラムの内部、あるいは、対物レンズ近傍のみを正にバイアスする方法を用いた(Frosien and Plies, 1987) (Frosien et al., 1989)。また、対物レンズの下部磁極を試料と同電位にし、かつ、カラム内部を正にバイアスすることにより、電場と磁場の複合レンズで傾斜観察を可能とした。

Ose らは、カラム内部を対物レンズ内部で正にバイアスし、かつ、基板を負にバイアスすることにより、半導体の寸法測定用の SEM の空間分解能を向上した(Ose et al., 1999)。Yonezawa らは、試料、下部磁極、カラム内の電圧を自在に制御できる対物レンズを開発した(Yonezawa et al., 2002)。電界を最大にした際に、 $C_c = 0.6 \text{ mm}$ となることが報告された。Mullerova らは、電場を使ったレンズの review を行った(Mullerova and Lenc, 1992)。これには、電場と磁場を組み合わせたレンズが含まれている。

電場と磁場を用いた対物レンズにおいて、究極的に C_s と C_c を低減する方法についても検討がなされてきた。Hordon らは、電場と磁場を複合したレンズを用いた際に、どのような構成とするのが最も空間分解能が高くなるかを検討した(Hordon et al., 1993)。Hordon

らは本検討の際に、球面収差の影響を考慮していなかった。この試みは、Khursheed によりさらに高度化された(Khursheed, 2002)。彼は、球面収差も電子ビーム径に大きく影響することを示した。また、電場と磁場を重畳させることにより、ランディングエネルギーが 1 keV の際に、 $C_s = 50.4 \mu\text{m}$, $C_c = 58.3 \mu\text{m}$ を実現できると計算した。ただし、最大電界として 10 kV/mm を仮定しており、現実にはこの電界強度では放電の可能性があるために簡単ではない。

(2) 試料バイアス印加

Pease らが用いた基板への負バイアス印加(これはまた試料バイアス印加とも呼ばれる)は、磁場レンズと試料の間に電場を形成する効果的な方法である。ここでは、その効果を示す。ランディングエネルギーを 500 eV に保った上で、カーボン上にスパッターした金ナノ粒子を用いて測定した SEM 像の空間分解能の試料バイアス依存性を図 2.4.6 に示す。SEM 像の空間分解能は、基板バイアスを 0 から -5 kV にすることにより大幅に改善される。

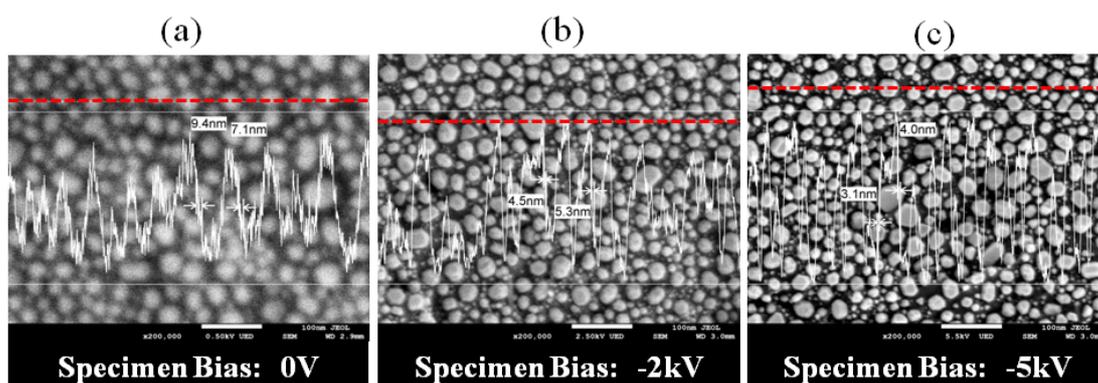


図 2.4.6 SEM 像の基板バイアス電圧依存性。(a) 基板バイアス電圧 = 0 V、(b) 基板バイアス電圧 = -2 kV、(c) 基板バイアス電圧 = -5 kV。赤線は、ラインプロファイルを取得した位置である。基板バイアスの絶対値を大きくすると、空間分解能が向上する。観察条件：GBSH 付の JSM-7800F；ランディングエネルギー = 500 eV。図は許可を得た上で転載: ref (Suga et al., 2014), copyright 2014 Elsevier.

(3) 検出系に対する効果

複合電子レンズは、照射電子のビーム径を小さくするだけでなく、試料から放出された電子の検出効率を上げるためにも有効である。以下、検出系について説明する。

2.4.3.4 TTL 検出器

(1) 電子検出に与えるワーキングティスタンスの影響

試料から放出される SE の検出器として、2.1 節に記載した ET 検出器である(図 2.1.6) (Everhart and Thornley, 1960)が歴史的に最も良く用いられてきた。ET 検出器は、2つの意味で使われてきた。ひとつは 2.1 節で説明したシンチレータとフォトマルを組み合わせた検出素子としてであり(Everhart and Thornley, 1960)、もうひとつはこの素子を電子カラムの外側に配置した検出器のことである(Goldstein et al., 2003)。本論文では、この後両者を区別するために、前者を ET 検出モジュール、後者を下部 ET 検出器(Lower ET-detectors, LEDs)と呼ぶ。

LED は、上記したように一般的に SE 検出器として知られている。しかしながら、図 2.2.1 に記載したように、LED は SE1, SE2, SE3 の全てを検出し、かつ、BSE も検出するため、条件によっては BSE 成分を強く検出することに注意が必要である(Goldstein et al., 2003)。ワーキング長(ワーキング長は対物レンズと試料の距離)を短くすると、SE1 と SE2 の検出量は、SE3 の検出量と比較して相対的に低下する。条件によっては BSE に起因する SE2 と SE3 の合計が全信号の 89%に及ぶとの報告もあり(Goldstein et al., 2003)、高分解能画像の取得には適さない。

図 2.4.7 に、ワーキング長が長い場合の画像と短い場合の画像をそれぞれ示す。試料は、図 2.2.5 にて BSE 画像と SE 画像を比較したのと同じである。ワーキング長が短い場合、重い元素から成る鉛フリーハンダの上に配置された軽い元素から成るポリスチレンはほとんど見えない。この結果、および、SE2 と SE3 が BSE に起因していることから、ワーキング長が短い場合 LED は実質的には BSE 検出器的な特徴を持つことがわかる。ワーキング長を短くすると軽元素を観測しにくくなることを、佐藤らも報告している(Sato et al., 2007)。

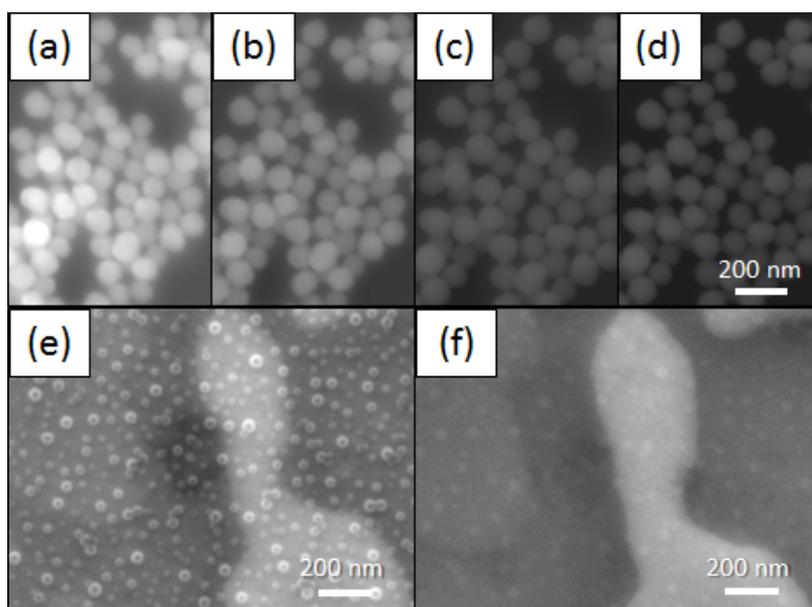


図 2.4.7 LED 検出器を用いた SEM 像コントラストのワーキング長(WD)依存性。(a-d) シリコン基板上的金粒子。左から右に、WD = 20, 10, 5, 3 mm。装置のコントラストとブライトネスの値は一定とした。(e, f) 鉛フリーハンダ上のポリスチレン粒子。装置のコントラストとブライトネスの値は最適値に調整した。(e) WD = 20 mm。(f) WD = 5 mm。画像は、BSE 像に近い。観察条件：JSM-7800F。ランディングエネルギー = 15 keV。図は許可を得た上で転載: ref (Suga et al., 2014), copyright 2014 Elsevier。

LED で SE1 と SE2 を主に検出するためには、ワーキング長を長くする必要がある。しかしながら、この場合は対物レンズを長焦点で使うため、ビーム径が大きくなり空間分解能が劣化する。これを解決する手法としてカラムの内部に検出器を配置し、信号電子を対物レンズを通して検出する方法があり、電子光学軸上で取り扱うので原理的にエネルギー弁別などの新しい展開を組み合わせやすい。これは、スルーザレンズ(through the lens (TTL))検出器と呼ばれる (Asahina et al., 2011; Reimer, 1998)。

(2) TTL 検出器

TTL 検出器を用いることにより 3 mm 以下のワーキング長でも効率的に電子を検出することが可能であり、これにより高分解能観察を実現できる。近年の高級な商用 SEM は、TTL 検出システムを搭載しているものが多い(Bell and Erdman, 2012)。

基板に負のバイアスを印加することにより、ランディングエネルギーを小さくするだけでなく、BSE(特に比較的低エネルギーの低い BSE)は加速されてカラムの中に引き込まれるので、信号電子の検出効率を高くすることができる。SE も同時に加速されてカラム内部に引き込まれ、エネルギーフィルタのついた TTL 検出システムにより、BSE とは別の TTL 検出器で検出できるだろう。

(3) フィルター付きの TTL 検出システム

エネルギーフィルタを備えた典型的な TTL 検出システムの例として、JEOL の JSM-7800F (あるいは JSM-7100 TTL)を図 2.4.8 に示す。エネルギーフィルタを備えた TTL システムには、電子線カラムの外に下部電子線検出器(LED)、および、電子線カラムの内部に 2 つの TTL 検出器として上部電子検出器(upper electron detector (UED))と上部 SE 検出器(upper secondary electron detector (USD))が配置されている。UED と USD の間にはバイアス電圧を印加できるグリッドが配置されており、負の電圧を印加することにより、UED に対してはハイパス・フィルターとして作用し、かつ、USD に対しては低エネルギー電子が反射されるためローパスフィルターとして作用する。従ってこの場合、UED は主に BSE を検出し、USD は主に SE を検出する。すなわち、BSE と SE を同時、かつ、選択的に検出できる。一方、グリッドに対して正の電圧を印加することにより、UED は SE

と BSE の混合信号検出器として動作する。

基板バイアスを印加することにより、BSE は上方に加速されるためその検出効率が向上する(図 2.4.8 (b))。なお、本検出システムには対物レンズと試料の間に、出し入れ可能な反射電子検出器である BED (BSE detector)も配置できる(図 2.4.8 (a))。

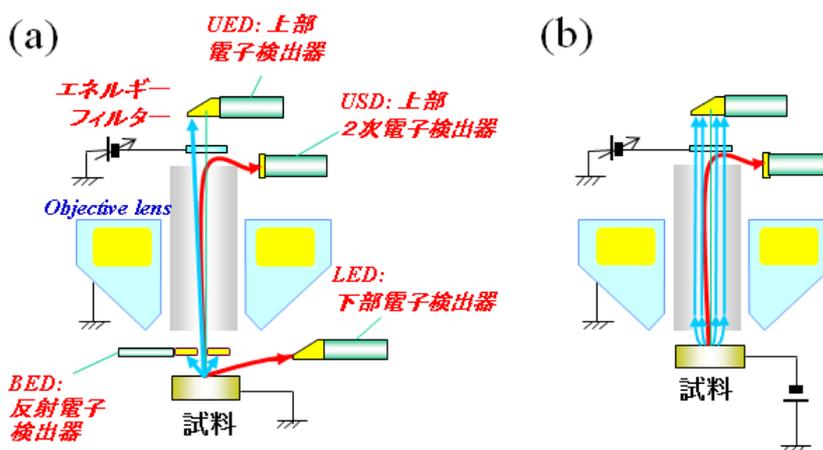


図 2.4.8 JSM-7100F TTL と JSM-7800F について、検出システムの模式図と典型的な SE と BSE 軌道。(a) 基板バイアスなし。(b) 基板バイアス印加。SE と BSE は、エネルギーフィルタを用いて分離して検出できる。図は許可を得た上で修正して転載: ref (Suga et al., 2014), copyright 2014 Elsevier.

エネルギーフィルタを備えた TTL 検出システムは、歴史的には LSI テスターに用いられ
ており、LSI(大規模集積回路)の電位を測定するために効果的である(Nakamae et al., 1985)
(Todokoro et al., 1985) (Frosien and Plies, 1987)。

2.5 特性 X 線を用いた組成分析

2.5.1 原理

図 2.5.1 に、試料に電子線を照射した際の原子内部の様子を示す(日本分光学会編, 1989)
(Reed et al.)。試料に電子線を照射することにより、原子内部の内殻電子がはじきとばされ
て空席となる(イオン化)。しかしながら、直ちに空席となった内殻準位に外側の軌道の電子
が落ちる(遷移)。この際に、軌道エネルギーの差に相当する X 線を放出する。これが、特性
X 線である。特性 X 線のエネルギーは元素に固有である。図 2.5.1 には、Cu の K 殻の電子
がはじきとばされて、L 殻の電子が K 殻に落ち込む様子を示した。

電子線を照射した際に電子が弾き飛ばされる確率(イオン化率)は、各元素位置における電

子のエネルギーに依存するが、その依存性は各元素に固有である。また、イオン化された元素が遷移により X 線を発生する確率(発光効率)は、各元素に固有である。このため、検出される X 線の強度は、試料に含まれる元素の割合、すなわち、組成に依存する。これを用いて、元素の組成分析を行う事ができる。

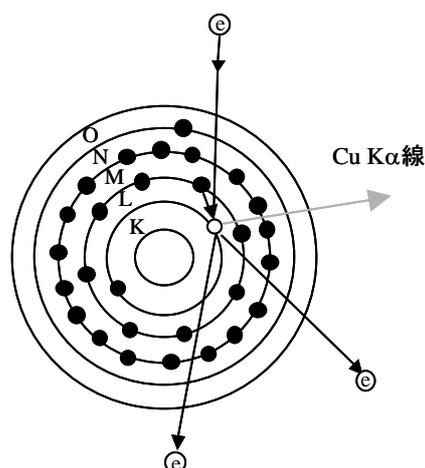


図 2.5.1 電子線照射によるイオン化、および、遷移による特性 X 線放出

照射電子は、電子光学系を用いることにより 1 nm 以下の直径に収束することも可能である。しかしながら、試料内部で電子線が散乱されるために、照射電子線は試料内部で広がる(図 2.2.1, 図 2.2.3, 図 2.4.2)。このため、組成分析の空間分解能は nm オーダーとはならない。ただし、試料を薄膜化することにより、散乱による照射電子の広がりを低減し、空間分解能を高めることもできる。また、低いエネルギーの特性 X 線を放出する元素については、低ランディングエネルギーの電子照射でも励起できるので、試料内部におけるビーム広がりを抑制可能であり空間分解能を向上できる。

特性 X 線を検出するためには、主にエネルギー分散型 X 線分光(EDS: Energy Dispersive X-ray Spectrometry)と波長分散型 X 線分光(WDS: Wavelength Dispersive X-ray Spectrometry)の 2 つの方法がある。このうち EDS は、簡単に使えて、X 線検出効率が高く、かつ、測定時間が短いために SEM のアタッチメントとして高い頻度で装着される。

図 2.5.2 に、古典的な EDS 検出素子の構成を示す(日本分光学会編, 1989) (Reimer, 1998)。検出素子は、基本的には半導体の pn 接合であり、500 – 1000 V 程度の逆バイアス電圧を印加して使用する。検出器内部に入射した特性 X 線は、intrinsic 領域に特性 X 線のエネルギーに比例した数の電子-正孔対を励起する。これらは、逆バイアス電界によりドリフトし、検出器を流れる電流となる。この電流を積分した電荷は電子線のエネルギーに比例するた

め、電荷を計測することによりX線のエネルギーを調べられる。

図 2.5.3 に、検出器に流れる電荷を検出するための電気回路のブロックダイアグラムを示す(日本分光学会編, 1989)。検出器には、電荷有感型前置増幅器を接続する。これにより、検出器に流れた電荷に比例した電圧が出力される。次に、波形整形増幅器に信号を入力する。波形整形増幅器は、前置増幅器からの出力波形を整形するとともに信号を増幅する。さらに、信号をアナログ→デジタル変換した後、波高分析器で各エネルギーに対する信号量を得る。さらに、その結果をコンピューターで解析する。

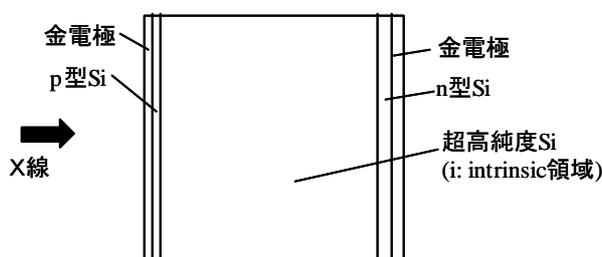


図 2.5.2 エネルギー分散型X線検出器の構造。主に、平行平板型の pin 接合からなる。

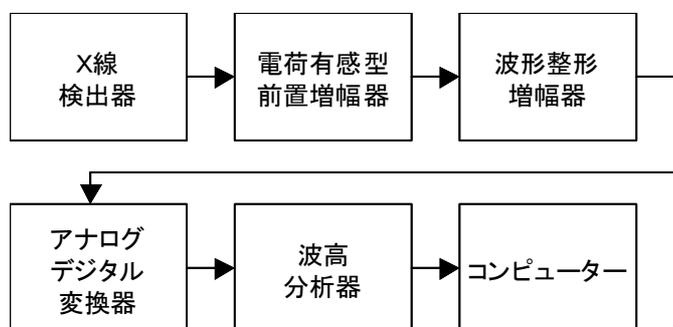


図 2.5.3 検出器に流れる電荷を検出するための電気回路のブロックダイアグラム

ここで、特性X線分析による元素の組成分析精度について考察をする。特性X線の強度から組成を求めるためには、原子のイオン化率、発光効率、試料によるX線の吸収率、および、試料内部における電子線の散乱経路と電子線のエネルギー等が必要である(Reed et al.)。しかしながら、これらの数値を厳密に求めることは容易でない。このため、これらの数値を求めずに、組成が既知の試料について特性X線測定を行い、特性X線の強度比と組成比の関係から組成を求める方法が良く用いられる。本手法をもちいることにより、組成

の評価精度を向上させられる。

しかしながら、検出されるX線フォトン数が少ない場合には、X線の統計ゆらぎのために、組成の評価精度が悪くなる。統計揺らぎは、検出する特性X線の量が統計的にゆらぐことであり、その大きさは検出したX線量の平方根に比例する。統計揺らぎに起因する測定精度は、バックグラウンドからの寄与も含めて、

$$\text{精度} = \frac{3(P + 2B)^{1/2}}{P} \quad \dots \text{式 2.5.1}$$

となる(Egerton, 1996)。ここで、ピークカウント P とバックグラウンドカウント B は、それぞれ、評価に用いる電子線電流 I_p と測定時間 t に比例するため、 $I_p t$ の積を増加させることにより測定精度を向上できる。

一方、検出器のエネルギー分解能が特性X線固有のエネルギー幅よりも十分に大きな場合は、検出器のエネルギー分解能の向上でも精度を上げることができる。通常の半導体検出器のエネルギー分解能は $MnK\alpha$ の位置で 100 eV 以上であるのに対し、固有のエネルギー幅は 10 eV 以下であるため、市販されている通常の EDS を用いる場合はこの条件が満たされる。検出されるバックグラウンドカウント B は、検出器のエネルギー分解能に依存する。特性X線の検出エネルギー幅を検出器のエネルギー分解能 ΔE (半値幅)程度とすると、この領域に含まれるバックグラウンドX線の数 B は、

$$B = \Delta E \cdot b \quad \dots \text{式 2.5.2}$$

である。ただし、 b は単位エネルギーあたりのバックグラウンド量である。このため、検出精度は、

$$\text{精度} = \frac{3(P + 2\Delta E \cdot b)^{1/2}}{P} \quad \dots \text{式 2.5.3}$$

である。ここから、 $P \gg B = 2\Delta E \cdot b$ でなければ、検出器のエネルギー分解能 ΔE を向上させることにより、検出精度を向上できることがわかる。検出器のエネルギー分解能は半値幅(FWHM: Full Width at Half Maximum)で

$$\text{FWHM} = 2.35\sqrt{F\epsilon E + \epsilon^2 ENC_{el}^2} \quad \dots \text{式 2.5.4}$$

となる。ただし、 ENC_{el} は等価雑音電荷(equivalent noise charge due to electronic noise)、

F はファノ因子、 E は信号X線のエネルギー、 ε は一組の電子・ホールペアを励起するための平均エネルギーである。 F と ε は検出器を構成する半導体材料に固有である (Schlosser et al., 2010)。

EDS の検出器には、通常シリコンから成る pn 接合が用いられる。数 keV のエネルギー領域では電子ノイズは無視することが可能であり、そこではエネルギー分解能は材料固有の値である F と ε で決定される。

検出器のエネルギー分解能を向上させる方法としては、検出器に用いる材料のエネルギーギャップを小さくすることが有効である (Kurakado, 1982) (Twerenbold, 1987)。このためには、

- (1) 検出器に用いる半導体のエネルギーギャップを小さくする
- (2) 超電導体を用いた検出器を開発する

が考えられる。本研究では、(2)の第1歩として、超電導体を用いたX線検出器用接合に関する研究を行った(5.4節)。

一方、等価雑音電荷 ENC_{el} は、次のように示される (Schlosser et al., 2010)

$$ENC_{el}^2 = \left(\frac{4kT}{3g_m} C_{tot}^2 A_1 \right) \frac{1}{\tau} + \left[(2\pi a_f C_{tot}^2) A_2 \right] + (qI_L A_3) \tau \quad \dots \text{式 2.5.5}$$

ここで、 C_{tot} は検出器とプリアンプの総合キャパシタンス(total capacitance)、 I_L は検出器のリーク電流、 τ はピーク時間(peaking time)あるいは整形時間(shaping time)と呼ばれプリアンプの後段に位置する波形整形アンプの時定数である。また、 A_1, A_2, A_3 は波形整形のアルゴリズムに依存した1に近い定数、 a_f は1/fノイズを特徴付ける定数である。式2.5.5の第1項は $1/\tau$ に比例し直列ノイズ(series noise)に関連する。第2項は1/fノイズである。第3項は τ に比例し並列ノイズ(pararell noise)に関連する (Schlosser et al., 2010) (Gatti et al., 1990) (Bertuccio et al., 1996) (McCarthy et al., 2009)。

通常のシリコン pn 接合検出器では、 C_{tot} のために τ を 10~100 μ s 程度にする必要があった。これに対し、シリコンドリフト検出器(SDD: Silicon Drift Detector)が開発された。本研究では、SDD をナノ材料評価に応用した例を示す。SDD の特徴については、5.1節にて説明する。

3. 大気圧 SEM

本章には、大気圧 SEM の開発とその応用について記載する。最初に、3.1 節で大気圧 SEM の構成を説明する。3.2 節では、開発した大気圧 SEM の基本的な性能、および、バイオ分野への応用について記載する。3.3 節以降では、大気圧 SEM の様々な応用について記載する。3.3 節で、材料系試料の観察、特に、液体や気体中における動的現象のリアルタイム観察を中心に記載する。3.4 節では、バイオ系試料について、光と電子の両方で検出できるラベルを用いてタンパク質などの特定要素の分布を観察する方法を記載する。3.5 節では、大気圧 SEM で液中の試料を迅速に観察ができることを利用したマイコプラズマ肺炎検査の可能性について記載する。3.6 節では、大気圧 SEM を用いたタンパク質の微結晶観察について記載する。3.7 節にて、大気圧 SEM についてまとめる。

3.1 大気圧 SEM の構成

大気圧 SEM の原理については、2.2 節に記載した。ここでは、具体的な構成について記載する(Nishiyama et al., 2010)。

3.1.1 SiN 薄膜

大気圧 SEM では、2.2 節に記載したように、試料を配置した大気側と電子線を伝搬させる真空側を薄膜で隔離する。この薄膜は、電子線が透過する程度に薄く、かつ、1 気圧の圧力差に耐えられる程度に強い必要がある。これら 2 つの要求を同時に満たすために、アモルファスの窒化シリコン(SiN)薄膜を用いた。SiN 薄膜の形成方法を、図 3.1.1 に示す(Hsu, 2008) (Sze, 1998)。両面研磨したシリコン基板の両面に、化学的気相蒸着法(CVD: Chemical Vapor Deposition) (Hwang et al., 1982)により膜厚 10, 30, 100, および 150 nm の SiN 薄膜を堆積した(図 3.1.1 (a))。次に、フォトレジストとアライナーを用いてレジストパターンを形成し(図 3.1.1 (b))、これをマスクとしてドライエッチングにより SiN 膜のパターンを形成した(図 3.1.1 (c))。フォトレジストをアッシャーで除去した後、SiN 薄膜を形成するために、シリコン基板をウェットエッチング法により部分的に取り除いた(図 3.1.1 (d))。SiN 薄膜の大きさは 0.25 x 0.25 mm である。このようにして、SiN 薄膜を有するシリコンチップを形成した。

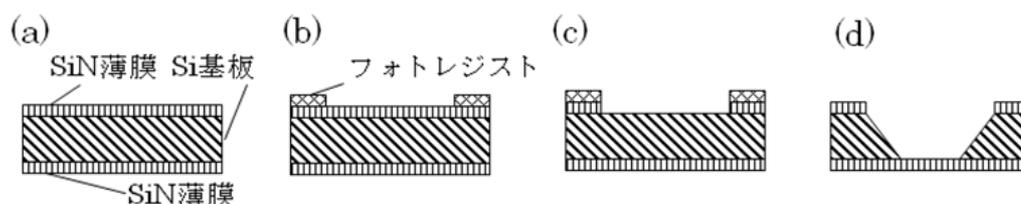


図 3.1.1 SiN 薄膜の形成プロセス。(a) シリコン基板の両面に、CVD で SiN 薄膜を形成する。(b) フォトレジストを塗布後、フォトリソグラフィーによりレジストパターンを形成する。(c) ドライエッチングを用いて、SiN 薄膜を選択的に除去する。(d) レジストを除去後、ウェットエッチングで選択的にシリコンを除去する。

3.1.2 薄膜ディッシュ

上記プロセスで形成した SiN 薄膜付きのシリコンチップ(図 3.1.2 (a))を、中心に穴をあけたポリスチレン製のディッシュの底に接着した(図 3.1.2 (b)) (Nishiyama et al., 2010)。このディッシュを、薄膜ディッシュと呼んでいる。薄膜ディッシュは、直径が 35 mm、高さが 13 mm であり、底部に SiN 薄膜付きのシリコンチップを配置している以外は細胞培養に用いる通常のペトリディッシュと同じである。薄膜ディッシュの下面は、帯電を防止するためシリコンチップを接着する前にアルミニウムでコートした。

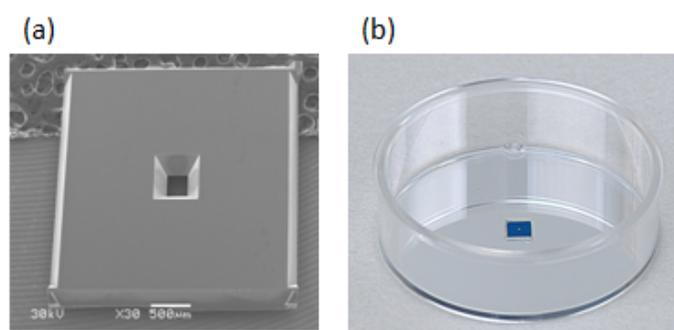


図 3.1.2 薄膜ディッシュ。(a) 図 3.1.1 のプロセスで形成したシリコンチップ。中心に、SiN 薄膜が形成されている。図の上面が、薄膜ディッシュの下面となる。(b) 薄膜ディッシュの外観。直径 35 mm のプラスチックディッシュの中心に、SiN 膜を形成したシリコンチップを接着した。

3.1.3 大気圧 SEM の構成

大気圧 SEM の構成を、図 3.1.3 に示す(Nishiyama et al., 2010)。大気圧 SEM は、上記の薄膜ディッシュを倒立 SEM の上端に配置することで動作する。薄膜ディッシュの上側には光顕が配置されており、試料の同一部位を大気圧 SEM と光顕で観察できる。薄膜ディッシュは O リングを用いて試料ステージにシールされるが、大気圧 SEM と光顕に対してステージが独立に移動する。

倒立 SEM は、熱電子銃を装備した JSM-6490 をベースとした。熱電子銃を採用したのは、取り扱いが容易なためである。JSM-6490 の電子カラムは、ランディングエネルギーが 30

keV で SE を検出した際に 3 nm の空間分解能が得られる。BSE 検出器には、ドーナツ型の pn 接合検出器を用いた。

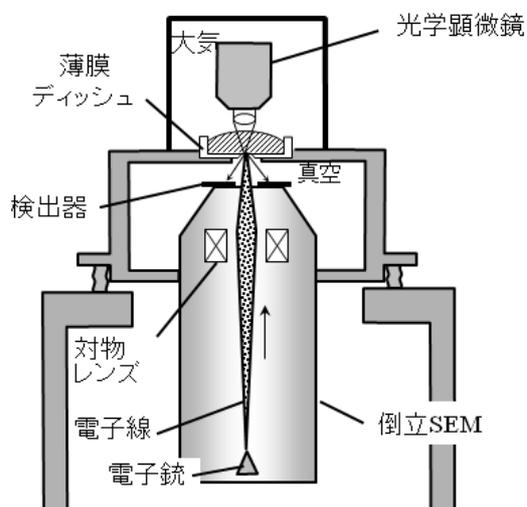


図 3.1.3 大気圧 SEM の構成。図は許可を得た上で修正して転載: ref (Nishiyama et al., 2010), copyright 2010 Elsevier。

3.1.4 光学顕微鏡

光顕には、蛍光顕微鏡(オリンパス BXFM)を配置した(Nishiyama et al., 2010)。本光顕に、ミラーユニットを 6 個装着できるミラー切替器を配置した。ここで、ミラーユニットは、試料に照射する光の波長を選択するためのフィルター、および、試料より発生した光の波長を選択検出するためのフィルターを組み合わせたモジュールである。また、照射光の強度を制御するために絞りも配置した。

光顕の検出器には、カラー CCD カメラ(Retiga 2000R, Qimaging)を用いた。後述するように、試料に電子線を照射すると X 線が発生するため、人間が直接光顕を覗きこむことはできない。

光顕を配置するための台座には、ステージとは別に x-y 方向の移動機構が設置してあり、これにより SEM と光顕の軸が一致するように調整できる。このようにして、光顕と SEM で同じ位置を観察できる。

3.1.5 シールドドア

上記したように、大気下の試料に真空側から電子線を照射することにより、試料からは連続および特性 X 線が放出される。これによる被曝を防ぐために、試料の上部には鉄製のシールドドアを配置した(図 3.1.3)。シールドドアにはセンサーが配置されており、ドアが

開いている際には SEM の電子線を照射できないようにインターロックを設置した。シールドドアは、X線による被曝を防ぐだけでなく、蛍光顕微鏡用の暗室の役割もはたしている。

3.2 大気圧 SEM の基本機能とバイオ分野への応用

本節では、大気圧 SEM の基本的な機能、および、バイオ分野への基本的な応用について記載する。薄膜ディッシュ上で培養した細胞を観察できるか検討した。金粒子による培養細胞のラベルを検討し、これを用いて大気圧 SEM の空間分解能を見積もった。様々なバイオ試料の観察を行い、大気圧 SEM の有効性を検討した(Nishiyama et al., 2010) (Suga et al., 2009)。

3.2.1 バイオ分野における大気圧 SEM の位置づけ

タンパク質複合体や細胞内小器官(organelles)などの細胞内の構造を直接観察することは、生理学的な機能を理解するために不可欠である。様々な顕微鏡法の中で、光顕では大きな細胞内小器官あるいはとても大きなタンパク質複合体を観察できる。密度の低い構造のコントラストを高くするために、ヘマトキシリン、エオシン、40, 6-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole)などを始めとする様々な光顕用の染色方法が開発された(Tanious et al., 1992)。また、蛍光ラベルにより、蛍光顕微鏡で小さなタンパク質の局在を可視化し、その場所を決定することができる。しかしながら、光の波長により、回折で限定される光顕 (diffraction-limited OM)の空間分解能は 200 nm 程度である。

STimulated Emission Depletion (STED) (Donnert et al., 2006; Hell and Wichmann, 1994)、あるいは、Saturated Structured Illumination Microscopy (SSIM) (Gustafsson, 2005)などの超解像光学顕微鏡の空間分解能はこの限界を超える。点拡がり関数(point spread function)を用いて蛍光体からの信号のフィッティングを行う PhotoActivated Localization Microscopy (PALM) (Betzig et al., 2006) や STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) (Rust et al., 2006) も超解像光学顕微鏡であり、観察対象の位置を高い位置精度で特定できる。しかしながらこれらの技術は、蛍光ラベルの観察に限定されて、かつ、空間分解能も細かい細胞内構造や小さな病原菌を見るには不十分である。

高い空間分解能でのハイスループットな観察は、生物学と創薬に大きく貢献すると期待される。電顕は、細胞内の構造を観察するために広く用いられている。それは、ナノメートル以下の観察ができるためであるが、電子線を伝搬させるためには散乱を防ぐために真空が必要である。このため、バイオ試料は真空の中に入れても大丈夫なように前処理する必要がある。ひとつの方法は、試料を凍結し表面を重金属でコートすることであるが、試料内部を観察できないという欠点がある。透過電子顕微鏡用の試料をエポキシに包埋して薄膜に切断(薄切)する方法では、試料は固定・脱水された後にレジンに包埋され、さらに薄切

され、最後に重金属で染色される。これらのステップには脱水やレジン埋め込みなどの疎水性処理が含まれるため、デリケートな細胞の構造にダメージを与える可能性がある。

酢酸ウラン、クエン酸鉛、リンタングステン酸、近年開発された白金ブルー(Inaga et al., 2007) など、染色のための様々な試薬が開発された。しかしながら、これらは光顕用の膨大な量の方法と比較すると、まだまだ限定されている。クライオトモグラフィーは、TEMを用いて 4-5 nm の空間分解能で 3 次元的に未処理な(intact)な状態の細胞内を可視化できる優れた方法である(Leis et al., 2009) (Medalia et al., 2002) 。しかしながら、この方法にしばしば必要なクライオ薄切は、高いスキルと手間がかかるために、創薬などの数多くの試料をスクリーニングする必要がある際には適していない。

X 線と電子線の結晶学により、数オングストロームレベルの空間分解能で、タンパク質の構造だけでなく、その特定の形態(conformation)や複合体の構造も決定できる(Fujiyoshi, 1998) (Henderson, 2004) (McPherson, 1989) 。TEM を用いた単粒子解析はシリコン中での結晶学(in silico crystallization)と位置づけられ(Frank, 1996) (Rosenthal and Henderson, 2003) (Sato et al., 2001) 、通常の結晶学的手法と比較すると空間分解能は劣るが、結晶化が不要である。しかしながら、通常の結晶学的手法では全てタンパク質の精製が必要であり、これにより適用できるタンパク質が限定されるとともにスループットが低い。さらに、通常の結晶学的手法は、多くの場合精製や結晶化が困難なために大きさが 20 nm 以上のタンパク質複合体の解析には適さない。また、光顕にとっては、大きさが 200 nm 以下の空間分解能は容易でない。これまでのところ、20 から 200 nm の間のメゾスコピックな領域を観察することは簡単ではなく、新たな細胞全体を観察できる顕微鏡が求められていた。X 線トモグラフィーは、STED、SSIM、STORM、PALM に匹敵する空間分解能を有するため、この空間分解能ギャップを埋める可能性がある。しかしながら、この手法には線源として通常放射光のビームラインが必要である。

湿潤試料の TEM 観察は、Abrams と McBain によりコロジオンでできた 2 枚の電子線を透過する薄膜の間に液体あるいは気体中の試料を配置することで実現された(Abrams and McBain, 1944) 。後に、薄膜としてカーボンが用いられた(Fukushima et al., 1985)。この「環境セル」の内側を飽和蒸気圧(例えば 100 Pa)あるいは大気圧に保つことができるため、細胞から抽出した成分を湿潤のまま観察できる(Butler and Hale, 1981) (Fullam, 1972) (Parsons, 1986) (Swift and Brown, 1970) 。環境セルを用いて、ポリアミド合成における動的な液体の水素化とポリマー化の反応が観察された(Gai, 2002a) 。同様に、水蒸気中の細胞をまるごと観察することもできた(Daulton et al., 2001) 。走査透過電子顕微鏡(STEM)と環境セルを用いて、金粒子でラベルした上皮成長因子(epidermal growth factors (EGFs))が線維芽細胞の EGF レセプターに結合しているのを観察できた(de Jonge et al., 2009) 。

一方、走査電子顕微鏡(SEM)は、試料の表面を収束した電子線で走査する。SEM を用いた湿潤試料の観察は、2つの方向に向かった。ひとつは環境 SEM であり(Danilatos, 1981)

(Danilatos, 1991) (Robinson, 1975) 、もうひとつは環境セルである(Thiberge et al., 2004b) (Thiberge et al., 2004a) 。環境 SEM では、差動排気とガスを用いた電子線検出技術を用いることにより、1000 Pa 程度の低真空 (1/100 気圧程度)中の試料を観察できる。この方法は、試料が薄い水の層で覆われている際にのみ有効であるが、蒸発のために安定な湿潤環境を保つのは簡単でない。2つめのアプローチは、電子線を透過するポリイミド薄膜でシールした環境セル(カプセル)を用いるものである(Thiberge et al., 2004b) (Thiberge et al., 2004a) 。

しかしながら、カプセルの体積は 15 μl 程度に限られており、さらに、カプセルは基本的には閉鎖空間である。これらの特徴により、外部からの細胞操作や薬の投入は困難である。さらに、ここで用いられた薄膜は通常厚さ 145 nm のポリイミド膜であり、電子線を散乱し空間分解能を劣化させる。近年大変に薄いアモルファス窒化シリコン(SiN)膜 が半導体製造プロセスを用いて形成され、ほぼ電子線を透過することが報告された(Green and Kino, 1991) 。このプロセスを改善することにより、とても薄い厚さ 30 nm の SiN 薄膜を作製することに成功した。この薄膜は、1 気圧の圧力差に耐えるとともに、空間分解能の高い観察に適用できる。この電子線透過薄膜を特殊な培養ディッシュのウインドウに用いることにより、大気に開放された試料室を有する大気圧 SEM を開発した。これにより、細胞を外部から制御することが可能になるとともに、電頭と光頭を同一装置に組み込むことにより同じ領域を両頭顕微鏡で簡単に観察できるようになった。

3.2.2 実験方法

3.2.2.1 空間分解能の SiN 膜厚依存

大気圧 SEM を用いて試料を観察する際の空間分解能がランディング電圧や SiN 膜厚にどのように依存するか調べるために、膜厚が 30, 100, 150 nm の SiN 薄膜を有する薄膜ディッシュを試作した。薄膜ディッシュの SiN 膜上(大気側)に直径が 15 nm の金粒子を配置し、これを大気圧 SEM で観察した際のエッジの明瞭さを比較した。観察する際のランディングエネルギーは、20 keV あるいは 30 keV とした。

3.2.2.2 細胞培養、金ラベル、染色

細胞を薄膜ディッシュの上で培養できるか調べるために、アフリカミドリザルの腎臓の線維芽細胞(fibroblast)である COS7 細胞を、CO₂インキュベーターの中で薄膜ディッシュの SiN 薄膜(膜厚 30 or 100 nm)の上で直接 37°Cで培養した。培養には、10%の仔牛胎児血清(BSA)と 100 $\mu\text{g/ml}$ のカナマイシン(バクテリアの繁殖を防ぐための抗生剤)を加えた修正ダルベッコ培養液(DMEM)を用いた。培養後に、後述する核の特別な染色を除いて、細胞を PBS 中の 1% グルタルアルデヒド (glutaraldehyde)を用いて室温で 10 分間固定した。

金粒子を用いたラベルの有効性を検証するため、および、実試料でどの程度の空間分解

能が出るか調べるために、直径 15 nm の金粒子を結合した Wheat Germ Agglutinin (WGA, EY laboratories) で COS7 細胞をラベルした。WGA は、細胞表面のグリカンに結合することから、糖鎖の分布を調べるために用いられる。細胞を厚さ 30 nm の SiN 膜上で固定し、ブロッキング液(PBS 中の 2% BSA)で 30 分間培養した。金粒子付きの WGA は、最終的な濃度が A520 の 0.8 倍になるようにした。

細胞の貪食を観察するため、生きた COS7 細胞に量子ドット(Qdot)を加え、光顕でライブセル観察を行った。Qdot は、2 重構造の半導体ナノ粒子のまわりをポリマーで覆ったものであり、蛍光ラベルとして用いられる。粒子の大きさを変えることにより、蛍光の波長を制御できる。Qdot Qtracker 525 粒子 (Invitrogen)の原液を 1/1000 に希釈して COS7 細胞に加え、蛍光顕微鏡を用いて細胞が粒子を貪食する瞬間を観察した。その瞬間に細胞をすぐに固定し、PBS 中の 2% BSA の中に保持し、そして Qdot655 を結合している 5 mM WGA (2% BSA 中)で光顕観察用に 30 分間培養し、グリカンをラベルした。そこで蛍光観察を行った後、細胞を 0.2% Triton X-100 で穿孔し、PBS 中の 1% リンタングステン酸で大気圧 SEM 用に 30 分間染色した。これらの手続きを、顕微鏡のステージからディッシュを動かさずに実施した。

小胞体をラベルするため、COS7 細胞を厚さ 100 nm の SiN 薄膜上で培養し、固定、ブロック、穿孔、そしてラベルを行った。最初のラベルには protein disulfide isomerase antibody(PDI)に特異的に結合する抗 PDI 抗体を用いた。PDI は、小胞体に特異的に発現することが知られている。次に、光顕用に Alexa Fluor 488 を結合した 2 次抗体 (Invitrogen)を用い抗 PDI 抗体をラベルした。大気圧 SEM 用には、さらに PBS で原液を 1/10 に希釈した 0.6%の白金ブルーPt₄(NH₃)₈(C₆H₁₃O₅)₄ (Nisshin EM)で試料を 10 分間染色した。細胞分裂を観察するために、薄膜ディッシュ上に COS7 細胞をまばらに配置し、固定、穿孔、白金ブルーでの染色を行った。

PC12 細胞の培養には、事前に 0.01% のコラーゲン溶液(Koken)で 10 分間処理することにより、表面をコートした薄膜ディッシュ (厚さ 100 nm の SiN 薄膜付)を用いた。PC12 は神経系の細胞であるが、神経細胞などの培養が容易でない細胞については、このようなコーティングが良く行われる。細胞は、5% の FBS と 10% の馬血清を含む RPMI 1640 培養液の中で、5% CO₂ インキュベーターに入れて 37°C で一晩培養した。次に神経成長因子 (Neural growth factor (NGF))を最終的な濃度が 50 ng/ml になるように加えた。3 日後に、細胞を同様に固定と穿孔をした上で、白金ブルーで染色した。大気圧 SEM 観察を行う際のバッファーには、ラジカル消去剤として濃度が 10 mg/ml のアスコルビン酸あるいはグルコースをいつも添加した。

3.2.2.3 観察できる深さ

大気圧 SEM では、SiN 薄膜を介して電子線を試料に照射する。試料に電子線が侵入し反射される過程を図 3.2.1 に模式的に示すが、観察できる深さ d が限定されていることがわか

る。これは、図 2.2.1 の BSE が脱出する領域に対応する。ただし、SiN 薄膜と試料の界面を深さ d の基準位置とした。また、試料の深い位置を観察する場合、試料内部におけるビームの広がりにより分解能が劣化すると予測される。

観察できる深さは図 2.2.1 にも記載したレンジの半分程度と予測されるが、モンテカルロシミュレーションと実験によりこの深さを検討した。また、その際の試料内部におけるビームの広がりを、解析的な式を用いて検討した。

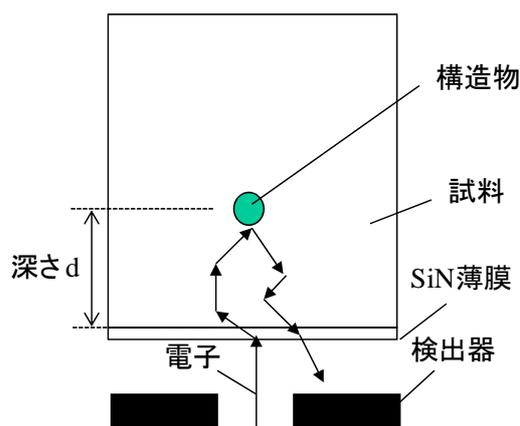


図 3.2.1 大気圧 SEM にて、BSE が放出されるメカニズム。入射した電子は試料内部で複数回散乱されるが、試料内部に電子線の散乱がまわりよりも大きい（あるいは小さい）領域があると反射電子率が変化する。

モンテカルロシミュレーションには CASINO を用いた(Drouin et al., 1997) (Drouin et al., 2007)。計算では、試料として生体試料の最大の構成要素である「水」を仮定した。

また、コンフォーカル顕微鏡と大気圧 SEM で同一部位を観察した。コンフォーカル顕微鏡でオプティカルスライスし、試料内の特定部位が SiN 薄膜からどの深さであるかを調べた。この特定部位を大気圧 SEM で観察できるかを調べることにより、観察できる深さ d を調べた。加速電圧が 10 および 20 keV の場合について、それぞれ調べた。

試料内部での電子線の広がりについては、次の解析的な式で見積もった(Reimer, 1998)。

$$x_{\text{rms}} = 1.05 \times 10^5 \left(\frac{\rho}{A} \right)^{1/2} \frac{Z}{E} t^{3/2} \quad \dots \text{式 3.2.1}$$

この計算でも、試料として「水」を仮定した。

3.2.2.4 培養細胞と組織の核特異的染色

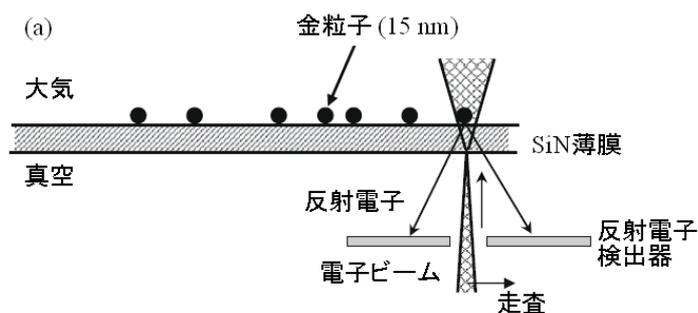
培養した COS7 細胞を、薄膜ディッシュの上で PBS 中の 1% パラホルムアルデヒドを用

いて 10 分間固定した。光顕観察のために、固定した細胞を PBS 中の 0.1% DAPI で 30 分間染色した。大気圧 SEM 観察のために、細胞を穿孔し、さらに白金ブルーで染色した。組織観察のために、手術用のナイフを用いて金魚の脳を約半分に切断した。この脳を PBS 中の 1%パラホルムアルデヒドで固定し、穿孔し、さらに白金ブルーで染色した。このブロックを PBS で洗浄し、切断面を薄膜ディッシュの SiN 薄膜の上に乗せて大気圧 SEM で観察した。

3.2.3 結果および考察

3.2.3.1 空間分解能の SiN 膜厚依存

SiN もポリイミドも完全に電子を透過させるわけでないため、薄膜の膜厚は空間分解能に影響を与える。この関係を、SiN 薄膜上に配置した直径 15 nm の金粒子を用いて解析した(図 3.2.2)。膜厚が 150 nm の場合、それぞれの金粒子は 10 万倍で独立したぼけた輝点として観察された(図 3.2.2 (b))。ただし、ランディングエネルギーは 20 keV であり、ビーム電流は 40 pA である。SiN 薄膜の膜厚が 150 nm から 30 nm に薄くなるに伴い、金粒子のエッジが徐々にクリアになった(図 3.2.2 (b)-(d))。また、信号雑音比(S/N)が改善された。より高いランディングエネルギーである 30 keV では、粒子のシャープさが改善された(図 3.2.2 (e)-(g))。これは、ランディングエネルギーが大きくなると、薄膜による散乱が低減するためと思われる。この結果により、この後の測定では主にランディングエネルギー 30 keV を用いることとした。



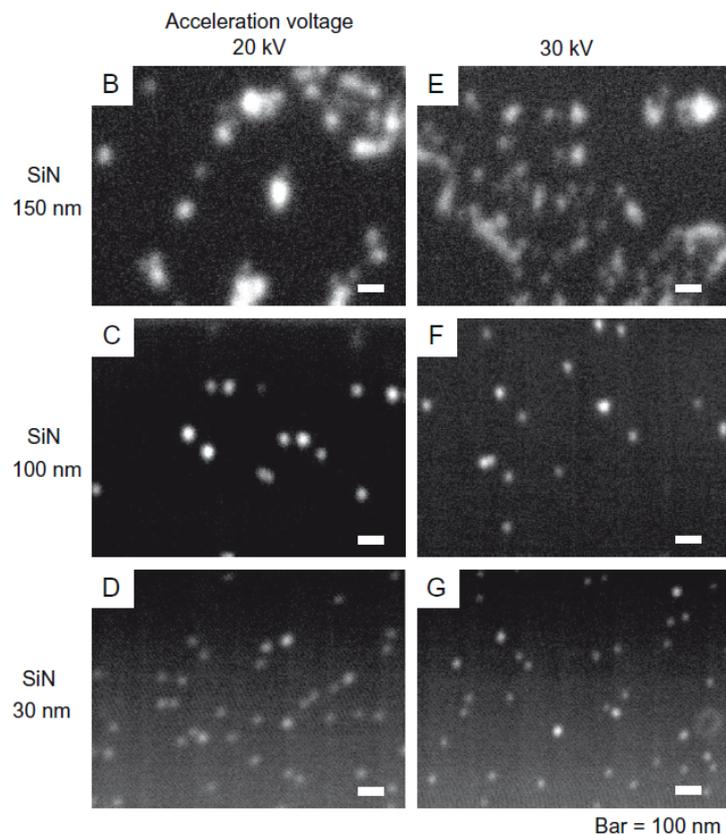


図 3.2.2 様々な厚さの SiN 薄膜を介した金粒子の大気圧 SEM 像。倍率 100,000 倍で観察した。(a) 大気圧 SEM 観察における電子線パスの模式図。(b-d) ランディングエネルギー 20 keV。(e-g) ランディングエネルギー 30 keV。(b, e) SiN 膜厚 150 nm。(c, f) SiN 膜厚 100 nm。(d, g) SiN 膜厚 30 nm。膜厚が薄くなるにつれて、金粒子のシャープさが増加する。ランディングエネルギーが高いほうが、金粒子はシャープである。図は許可を得た上で修正して転載: ref (Nishiyama et al., 2010), copyright 2010 Elsevier.

3.2.3.2 細胞にラベルした金粒子を用いた空間分解能測定

薄膜ディッシュの上で直接培養した細胞をグルタルアルデヒドで固定し、その表面にあるグリカンに金粒子(15nm)が結合した WGA でラベルした(図 3.2.3 (a))。バッファー内の細胞を BSE により低倍率 (5,500 倍)で観察した(図 3.2.3 (b))。金粒子は明るく白い点として観察されており、細胞の外形を強調していた。これらは、細胞全体のいたるところに分布しており、細胞周辺部、特に糸状仮足(filopodia)や膜状仮足(lamellipodia)などの仮足(pseudopods)部分で密度が高い。これらの結果は、グリカンの分布からの予測に一致する。

より高い倍率 20,000 倍では、ビーム電流が 40 pA の場合、それぞれの粒子がボケて見える(図 3.2.3 (c))。細胞の周辺から中心に向けてボケは大きくなり、そして中心付近では観

察できなかった(図 3.2.3 (b))。これは、粒子が COS7 細胞のトップ近傍に付着していることを示唆する。すなわち、細胞質の高さが増加するにつれて、図 3.2.3 (a)に示すように、電子線の散乱も増加し空間分解能が悪くなる。これはまた、WGA-金粒子が COS7 細胞と SiN 基板の間の空間に拡散しないことも示す。倍率 10 万倍の画像において、2つの粒子を分離できる最小距離から、厚さ 30 nm の SiN 薄膜を通しての空間分解能を見積もると 8 nm であった(図 3.2.3 (d), (e))。この方法は、SEM の空間分解能を定義する方法として良く用いられる。

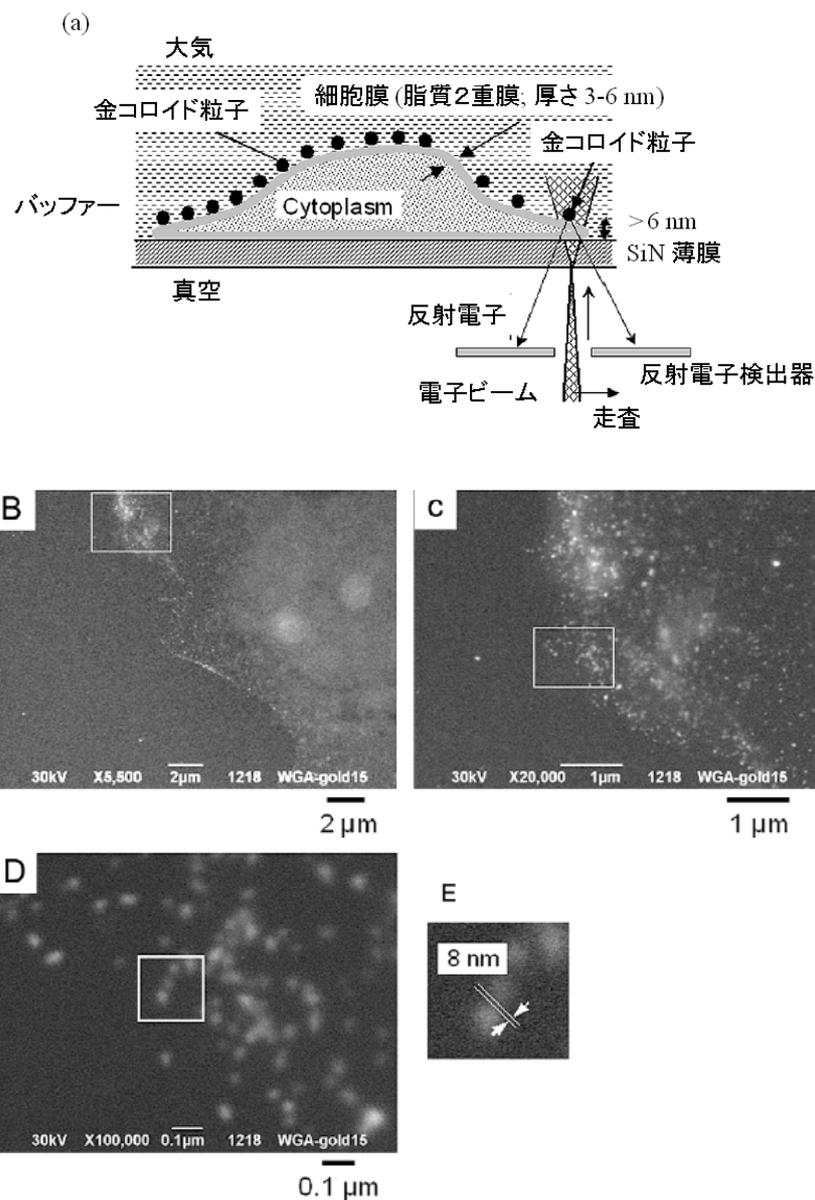


図 3.2.3 金粒子でラベルした COS7 細胞と大気圧 SEM の空間分解能。(a) 電子パスの模式図。金粒子に到達する前に、下側から照射された電子線は、最初に SiN 薄膜で散乱さ

れ、次に細胞により散乱され広がる。広がったビームは、最終的に金粒子により反射され、再度薄膜を通り真空側に配置した BSE 検出器で検出される。(b) 金粒子でラベルした COS7 細胞の大气圧 SEM 像。細胞をグルタールアルデヒドで固定した細胞表面のグリカンに WGA に結合した金粒子(直径 15 nm)でラベルした。これを、厚さ 30 nm の SiN 薄膜を介して倍率 5,500 倍で観察した。(c) (b)の四角部分を倍率 20,000 倍で観察した。(d) (b)の四角部分を倍率 100,000 倍で観察した。(e) (d)の四角部分を拡大した。2 粒子間の間隙から見積もった空間分解能は 8 nm であった。図は許可を得た上で修正して転載: ref (Nishiyama et al., 2010), copyright 2010 Elsevier。

3.2.3.3 古典的な空間分解能予測と実験的な空間分解能の比較

BSE 像における空間分解能は、古典的には Kanaya–Okayama レンジの程度とされてきた(Goldstein et al., 2003)。Kanaya–Okayama レンジは、加速電圧、および、薄膜を含む試料の原子番号と密度に強く依存する(式 2.2.1)。生体は様々な化合物から構成されるが、その最大の成分は水である。その他の化合物も、含まれる元素や密度は水と大きく違わない。そこで、BSE 像における古典的な空間分解能をラフに見積もるために、水に対する Kanaya–Okayama レンジを計算した。その結果、レンジはランディングエネルギーが 20 keV で約 10 μm , 30 keV で約 20 μm であることがわかった。これに対し、図 3.2.3 で金粒子を用いて測定された空間分解能は、この直径から予測されるよりも 3 桁程度高かった。

これは、金粒子が薄膜の近傍にあるため、照射電子線が試料内部で広がる前に散乱され反射電子が生成されたためと推測される。Merli らは、同様の理由により、半導体の多層膜を用いた実験から、反射電子像の空間分解能がスキャンしている電子線のビーム径と S/N で決まることを示した(Merli et al., 1995)。Thiberge らも、環境セルを用いた実験で類似の結論を導き出した(Thiberge et al., 2004a)。

なお、電子の反射はターゲット物質の Z に関連がある。コロイダルゴールドの Z は大きく(79)密度が高いために、それを取り囲んでいる細胞内構造(subcellular structures)の上でも明瞭に観察される。これらから、試料内部の構造の視認性を向上するためには、Z の高い重金属で染色しなければならないことがわかる。しかしながら、染色した細胞に含まれる高 Z の元素比が低いために、染色した細胞の空間分解能は金粒子の場合よりも悪いことが多い。

3.2.3.4 観察できる深さ

図 3.2.4 に、ランディングエネルギーが 10 および 20 keV の時の試料内部での電子線の広がりをモンテカルロシミュレーションした結果を示す(Suga et al., 2009)。ランディングエネルギーが 20 keV の場合、電子線の侵入深さは 6 μm 以上となる。したがって、少なくとも 3 μm の深さを観察できると予測される。これに対し、ランディングエネルギーが 10 keV の場合、電子線の侵入は 2 μm 程度にとどまっていることがわかる。したがって、電子

線が反射して出てくる深さは、その半分の $1\ \mu\text{m}$ 以下と予測される。

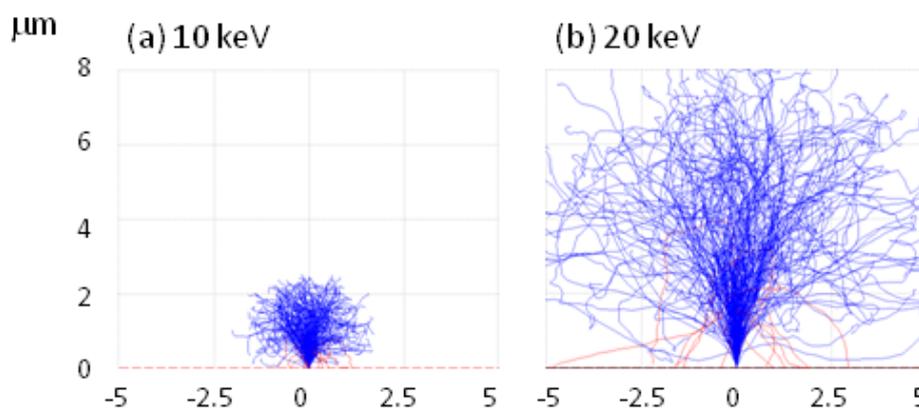


図 3.2.4 モンテカルロシミュレーションで計算した試料内部での電子線の軌跡。(a) ランディングエネルギー = $10\ \text{keV}$ 。電子線の侵入深さは $2\ \mu\text{m}$ 程度であるため、観察できる深さは $1\ \mu\text{m}$ 以下と予測される。(b) ランディングエネルギー = $20\ \text{keV}$ 。電子線は、 $6\ \mu\text{m}$ 以上の深さに到達し、 $3\ \mu\text{m}$ 程度の深さまでは少なくとも観察できると予測される。計算を簡単にするため、試料が水であることを仮定した。

図 3.2.5 に、COS7 細胞を大気圧 SEM で観察した結果、および、コンフォーカル顕微鏡で観察した結果をそれぞれ示す。加速電圧が $20\ \text{kV}$ の場合の大気圧 SEM 像(図 3.2.5 (a))には、矢印部分にフィラメント状の構造が観察される。この構造は、SiN 膜と試料の界面から $2.83\ \mu\text{m}$ の深さでオプティカルスライスしたコンフォーカル顕微鏡像にも観察されている(図 3.2.5 (c)の矢印部分)。ランディングエネルギーが $20\ \text{keV}$ の場合に、観察できる深さはモンテカルロシミュレーションから少なくとも $3\ \mu\text{m}$ 程度と予測されたが、これにほぼ対応する深さ $2.83\ \mu\text{m}$ の構造を大気圧 SEM で観察できることが実験的にわかった(Suga et al., 2009)。

一方、ランディングエネルギーが $10\ \text{keV}$ の場合の大気圧 SEM 像(図 3.2.5 (b))には、図 3.2.5 (a)や(c)の矢印部分に対応するフィラメント状の構造は観察されない。これは、ランディングエネルギーが $10\ \text{keV}$ の場合に、モンテカルロシミュレーションから観察できる深さが $1\ \mu\text{m}$ 以下と予測されたことと一致する。

このように、大気圧 SEM では $3\ \mu\text{m}$ 近くの深さまで観察できることがわかった。ランディングエネルギーをさらに上げることにより、より深い部分を観察することもできる可能性がある。一方で、大気圧 SEM で観察した図 3.2.5 (a)矢印部分のフィラメント構造は、コンフォーカル顕微鏡で観察した同部位(図 3.2.5 (c)の矢印部分)と比較してぼんやりと見える。これは、図 3.2.1 に示すように、試料内部で電子線が広がるためである。式 3.2.1 を用いて計算した電子線の広がり深さ依存性を、ランディングエネルギーごとに図 3.2.6 に示す。

広がり、水が厚くなるとともに大きくなる。また、同じ水の厚さでは、ランディングエネルギーが大きい方が広がり小さい。また、最も広がり小さなランディングエネルギーが 30 keV の場合においても、

深さが 2 μm の際にビームの広がり 400 nm にも及ぶ

深さが 1.3 μm 程度の際に、ビームの広がり光学顕微鏡と同程度の 200 nm

深さが 0.5 μm 程度の際に、ビームの広がり 50 nm 程度

である。すなわち、大気圧 SEM で観察できる深さは 3 μm 程度、あるいは、それ以上であるが、深さが 1.3 μm 以上の場合は光学顕微鏡の方が空間分解能は高い。また、SEM としての特徴が十分に出る空間分解能を 50 nm 以下と考えると、この空間分解能が得られる深さは 0.5 μm 以下と予測される。なお、本計算には試料として「水」を用いたが、実際の生体試料は C, N, H, O から成るため、本結果はラフな予測としてとらえるべきである。

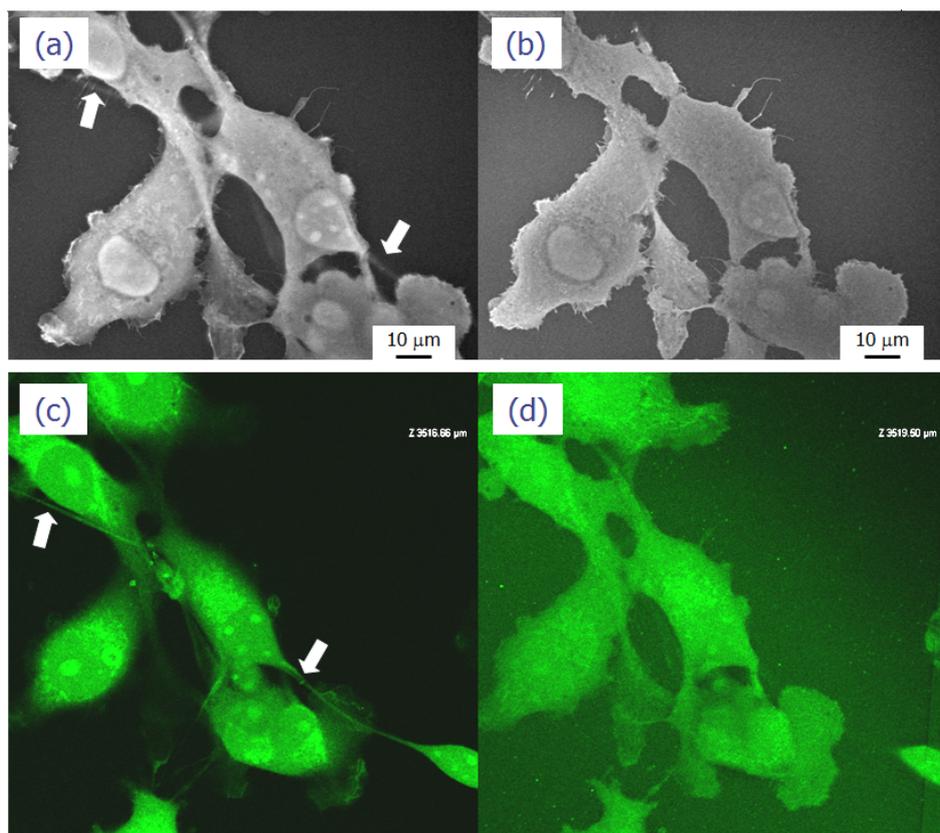


図 3.2.5 大気圧 SEM で観察できる深さを示すための大気圧 SEM 像とコンフォーカル顕微鏡像の比較。(a) 大気圧 SEM 像 (ランディングエネルギー 20 keV)。(b) 大気圧 SEM 像 (ランディングエネルギー 10 keV)。(c) コンフォーカル顕微鏡像 (SiN 膜と試料界面から 2.83 μm の深さでオプティカルスライスした像)。(d) コンフォーカル顕微鏡像 (SiN 膜と試

料界面でオプティカルスライスした像)。試料は、COS7 細胞。図は許可を得た上で修正して転載: ref (Suga et al., 2009), copyright 2009 Cambridge University Press。

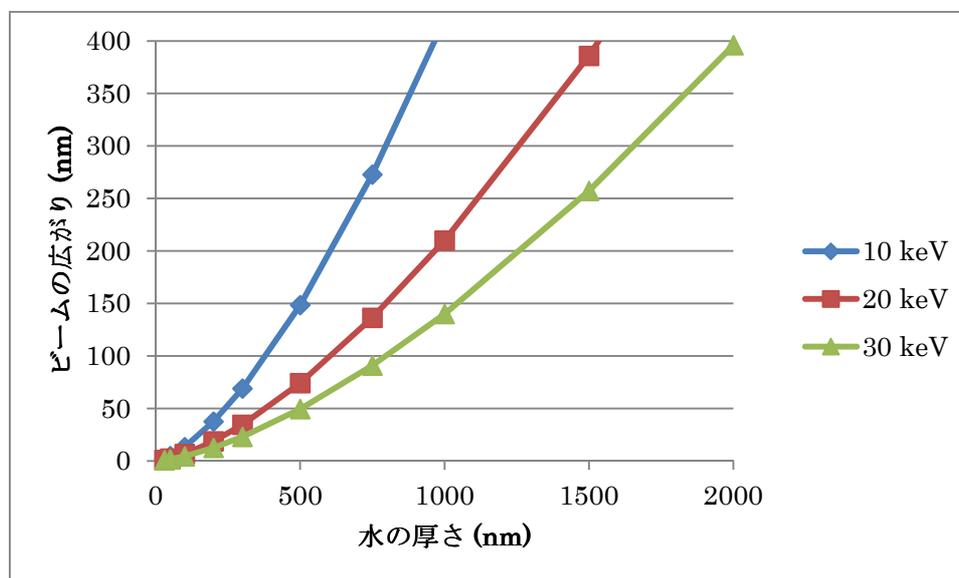


図 3.2.6 水に侵入した電子線の広がり。電子線の照射位置からの深さの関数として示した。計算には式 3.2.1 を用いた。簡単のため、試料として水を仮定した。

3.2.3.5 様々な細胞の可視化

(1) 神経細胞のコネクション (Neuronal connections)

ニューロンは、一般的に細胞を培養する環境に敏感であり、特に細胞の基板に敏感である。これらがシナプスを形成するのに数日あるいはそれ以上必要なため、神経細胞のコネクションを観察するためには長時間の細胞培養が必須である。環境セルと違ってとりはずし可能な薄膜ディッシュには数 ml の培養液を入れることが可能であるとともに、安定した培養環境を提供する CO₂ 培養器に入れることができるために、大気圧 SEM はこのような細胞の培養と観察に適している。

コラーゲンをコートした厚さ 100 nm の SiN 薄膜の上で PC12 細胞(rat adrenal pheochromocytoma)を 4 日間培養した後に、細胞を固定・穿孔した。これらをウラン代替染色剤として開発された白金ブルー(Inaga et al., 2007) で染色した。大気圧 SEM により、高い倍率で大変多くのニューロンどうしのデリケートなシナプス結合を観察できた(図 3.2.7)。3.4 節に記載するように、初代培養したマウス脳のシナプスも大気圧 SEM で観察可能である。

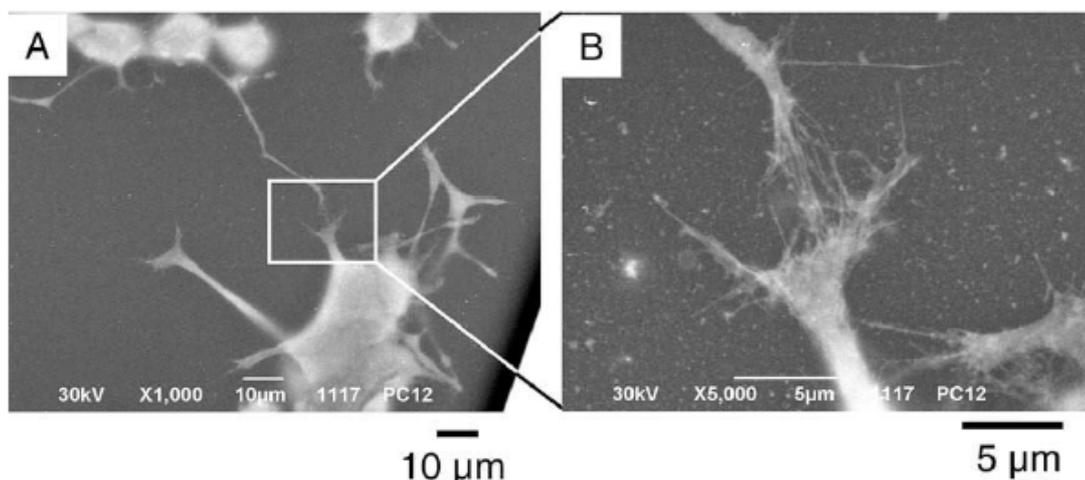


図 3.2.7 大気圧 SEM で観察した PC12 細胞の神経の結合。コラーゲンをコートした SiN 薄膜の上で、神経成長因子を含む培養液中で 4 日間培養することにより、2つのニューロンから神経突起が成長し、多くの微小なシナプスが形成された。細胞はグルタルアルデヒドで固定した後、トライトン X100 で穿孔し、白金ブルーで染色した。図は許可を得た上で転載: ref (Nishiyama et al., 2010), copyright 2010 Elsevier。

(2) 貪食

細胞外の物質や病原菌を破壊・分解することはどの細胞にとっても不可欠であり、特に免疫細胞において重要である。この最初のステップである貪食で、細胞外の異物を取り込むプロセスを観察した。直径が 10–20 nm の量子ドット(Qdot の Qtracker)を、100 nm の SiN 膜上で培養した COS7 の生細胞に付与した。大気圧 SEM の試料室は大気に開放されているため、簡単に試薬を細胞に付与することができた。

光顕・大気圧 SEM 複合システムでは、光学顕微鏡で細胞のダイナミクスを観察するとともに、固定した直後に光顕の観察領域と同じ場所を大気圧 SEM で観察することにより、タイミングを選んだ観察を実現できる。貪食により細胞が粒子を貪食した瞬間を蛍光顕微鏡でモニターした。細胞をすぐにグルタルアルデヒドで固定し、BSA でブロックし、WGA を結合した Qdot をつけて光顕観察し(図 3.2.8 (a))、さらに大気圧 SEM 用に 1%のリンタングステン酸でラベルした。図 3.2.8 (a)の蛍光像では、細胞の表面(Qdot-WGA による赤色)、および、貪食された粒子(矢印で示される黄色)を確認できた。大気圧 SEM によりこの領域を詳細に観察したが、蛍光顕微鏡で楕円に観察される粒子が、特に 2つの粒子(図 3.2.8 (b)の左にある太矢印)に分離された。核はリンタングステン酸で適度に染色されており、その中の核小体(nucleoli)はより強く染色されている。これに対し、細胞質は弱く染色されていた。

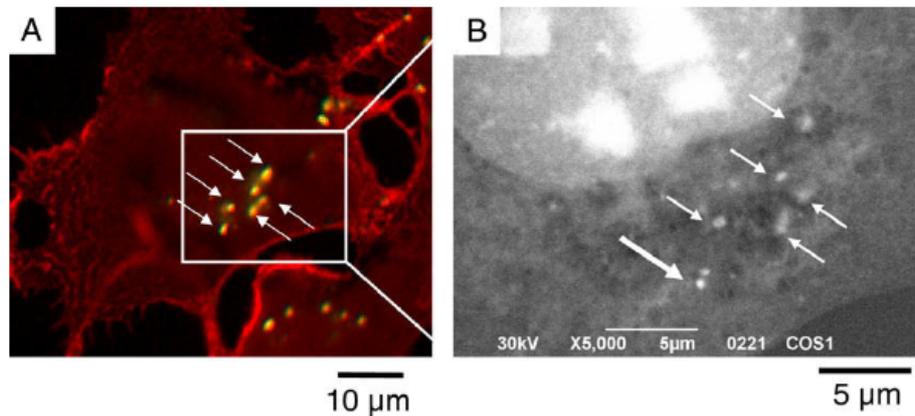


図 3.2.8 大気圧 SEM と光顕の複合システムを用いて、COS7 細胞の貪食を光顕と電顕で連続観察した。(a) 光顕による蛍光像。COS7 の生細胞が直径 10-20 nm の量子ドット(黄色)を貪食する様子を光顕で観察した後に細胞をグルタルアルデヒドで固定し、Qdot を結合した WGA で細胞表面をラベルした後に観察した。(b) 大気圧 SEM 像。(a)の光顕観察後、リンタングステン酸で染色した後に、大気圧 SEM で観察した。対応する量子ドットを、光顕と大気圧 SEM で観察できた。光顕でひとつに見える粒子を、大気圧 SEM では高分解能であるため 2 つに分離して観察できた((b)の太い矢印)。図は許可を得た上で転載: ref (Nishiyama et al., 2010), copyright 2010 Elsevier.

(3) 小胞体(ER)

小胞体は細胞の Ca^{2+} 貯蔵庫であり、神経伝達や胚形成(embryogenesis)を含む細胞の様々な生理機能に不可欠である。しかしながら、その構造は光顕で観察するには小さすぎる。薄膜ディッシュ上に培養した COS7 細胞を固定・穿孔した。そして、Alexa Fluor 488 で染色し光顕で観察した。光顕では、大まかな構造だけを認識できた(図 3.2.9 (a), (b))。試料ステージ上で、細胞をさらに白金ブルーを用いて染色した。大気圧 SEM により、光顕で観察したのと同じ領域を、20,000 倍で主なチューブから分岐する小胞体のクモの巣のような構造を明瞭に観察できた(図 3.2.9 (c)-(e))。細胞の核(nuclei)も白金ブルー染色で観察することが可能であり、特にその核小体(nucleoli)が顕著であった。これらの画像は、後述するようにリンタングステン酸や他の染色液を用いた場合よりもはるかに明るかった。

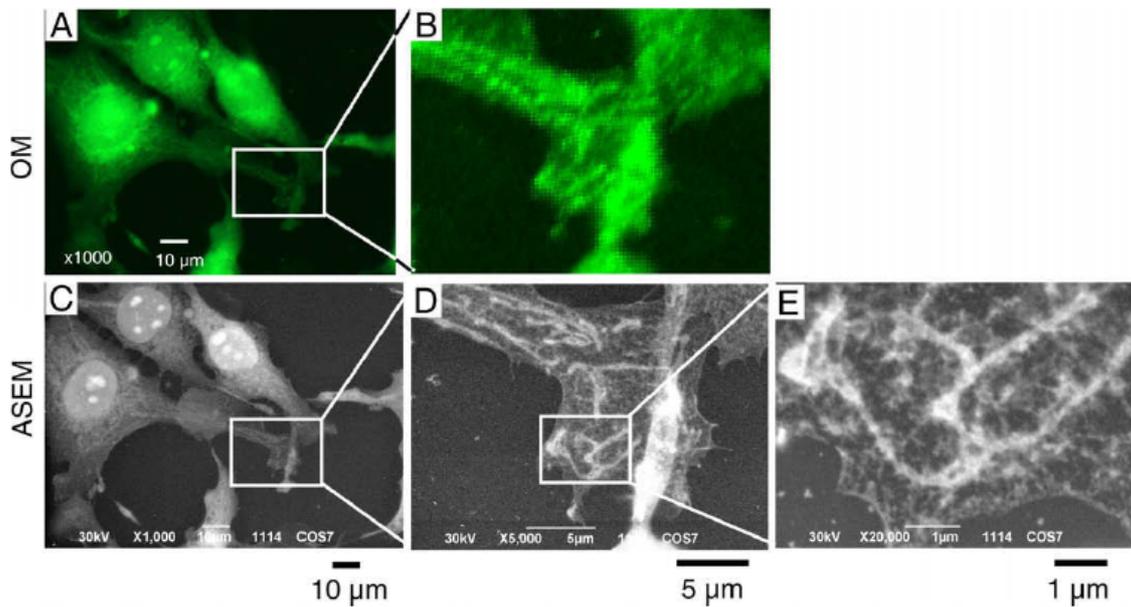


図 3.2.9 大気圧 SEM で観察した小胞体(ER)。SiN 薄膜の上で COS7 細胞を培養し、固定・穿孔した。(a) 光顕像。光顕で小胞体を観察するために、ジスルフィドイソメラーゼタンパク質に対する IgG 抗体で一次ラベルし、アレクサ 488 蛍光体付きの抗体で二次ラベルした。(b) (a) の四角部分のデジタル拡大像。(c) (a) と同じ領域の大気圧 SEM 像。光顕観察後、細胞をさらに大気圧 SEM 用に白金ブルーで染色した。(d) (c) の四角部分の高倍率大気圧 SEM 像。(b) に対応する領域であるが、(b) でボケてしまう部分を明瞭に観察できた。(e) (d) の四角領域の高倍率大気圧 SEM 像。小胞体の詳細を観察できた。図は許可を得た上で転載: ref (Nishiyama et al., 2010), copyright 2010 Elsevier.

(4) 細胞分裂(Cell mitosis)

COS7 細胞を、薄膜ディッシュの上にまばらに培養した。分裂している細胞を、固定・穿孔した上で白金ブルー染色し、上記のように大気圧 SEM で観察した。クロモゾームが核や核小体よりかなり明るいため(図 3.2.10 (a))、分裂をはっきりと見る事が可能である。これは、白金ブルーがクロモゾームを優先的に染色することを明瞭に示す。5,000 倍では、クロモゾームをはっきりと観察できる(図 3.2.10 (b))。しかしながら、10,000 倍では、予想されたよりもシャープではなかった(図 3.2.10 (c))。このボケは、先に記載したシミュレーションの結果から、クロモゾームが SiN 薄膜から離れた位置にあるためと思われる。

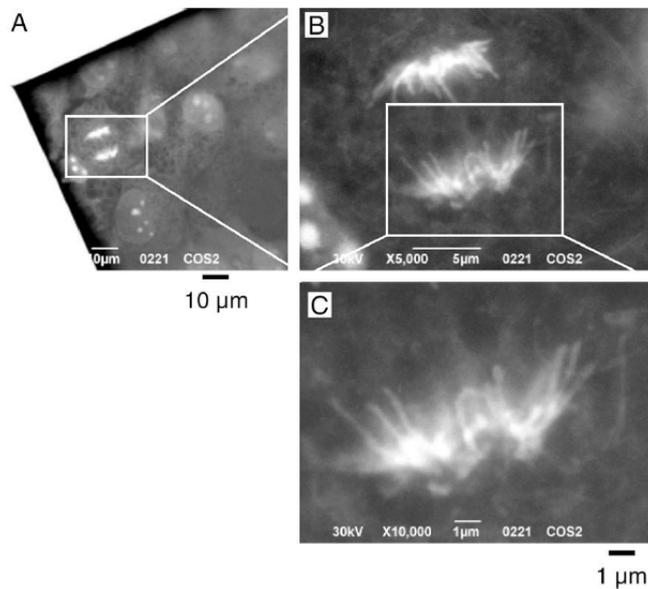


図 3.2.10 分裂する細胞のクロモゾーム。成長する COS7 細胞を白金ブルーで染色し、大気圧 SEM で観察した。クロモゾームが強力に染色されるため、分裂細胞を簡単に識別できた。クロモゾームは若干ぼやけて観察されたが、その位置が SiN 薄膜から離れているためと思われる。細胞は、グルタルアルデヒドで固定した後に白金ブルーで染色した。図は許可を得た上で転載: ref (Nishiyama et al., 2010), copyright 2010 Elsevier.

(5) 手術で切除した器官の表面

心臓や腎臓の切断面の表面近傍を、環境セルと SEM を用いて観察できることが報告された(Thiberge et al., 2004b)。しかしながら、これらの画像では、細胞の核は明瞭に観察されなかった。核の大きさは、ガンの検査に重要である。上記したように白金ブルーがクロマチンを選択的に染色することから、COS7 培養細胞を用いて核を強調するための固定/染色条件を調べた。環境セルにおいて実績のある他の染色液(Thiberge et al., 2004b)も、比較のために用いた。

1% パラホルムアルデヒドで固定した後に白金ブルーで染色したものは、4% パラホルムアルデヒドで固定した後に白金ブルーで染色したもの、あるいは、その他の染色剤を用いたものと比較して、背景の中に核が顕著に観察された(図 3.2.11 (a))。比較のために、クロマチンの典型的な蛍光染色剤である DAPI で染色し光顕で観察した結果を示す(図 3.2.11 (b) 左)。白金ブルーで染色した場合と異なり、クロマチンははっきりと見えるが核小体はそうではなかった(図 3.2.11 (a))。核小体には RNA が多いことから、これらの結果は白金ブルーが DNA と RNA の両方を染色することを示唆する。この特徴の少なくとも一部は、前駆体であるシスプラチンが化学療法剤であり、DNA に結合するためと考えられる(Rosenber.B et al., 1965)。このシスプラチンの結合は、化学療法剤として様々ながん細胞の分裂を抑制

する。

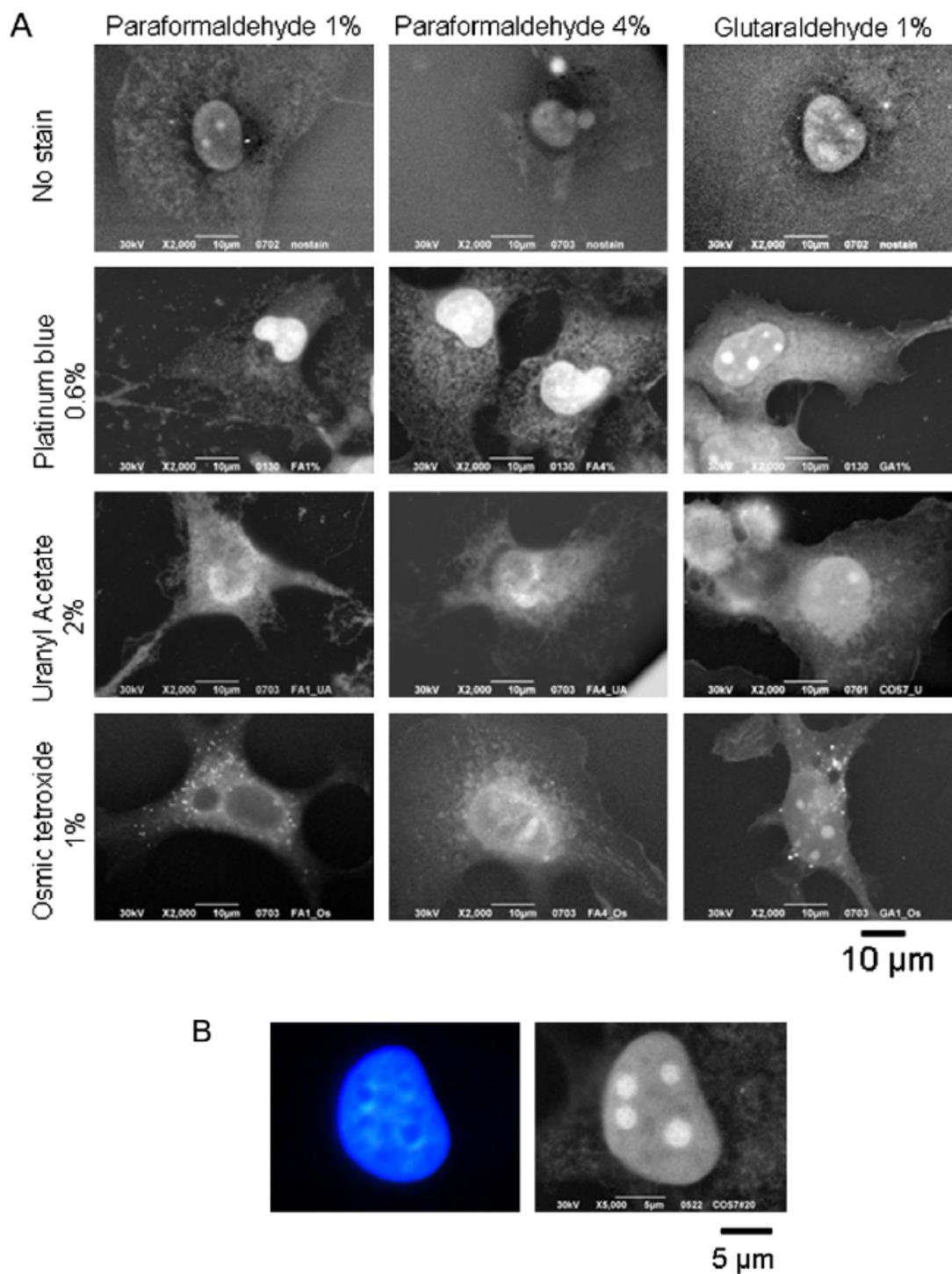


図 3.2.11 大気圧 SEM 観察用に核を最適に染色するための固定と染色方法。(a) 様々な固定液と染色液で処理した COS7 培養細胞の大気圧 SEM 像。様々な染色液の中で、白金ブルーが特に核を強調した。白金ブルー染色の中では、1%パラホルムアルデヒドで固定したものが、4%パラホルムアルデヒドあるいは1%グルタルアルデヒドで固定したものよりも

核のコントラストが高かった。比較のために、細胞を酢酸ウラン、あるいはオスミウム酸で染色した。オスミウム酸は、脂肪球を強く染色し、白い輝点として観察された。(b) DAPIによる核染色(光顕像; 左)と白金ブルー染色(大気圧 SEM 像; 右)の比較。いずれにおいても核が強調されるが、核小体が染色されたのは白金ブルーだけであった。図は許可を得た上で転載: ref (Nishiyama et al., 2010), copyright 2010 Elsevier。

次に、金魚から切除した脳を固定し、白金ブルーを用いて核に適した条件で染色した後、半分に切断した。組織を薄膜ディッシュの SiN 膜の上に乗せて、大気圧 SEM で観察した。表面の核が、暗い背景の中で明るく識別された。輪郭は明瞭であるため、これらの直径の測定は容易である。神経突起的な繊維も、弱く染色された(図 3.2.12)。

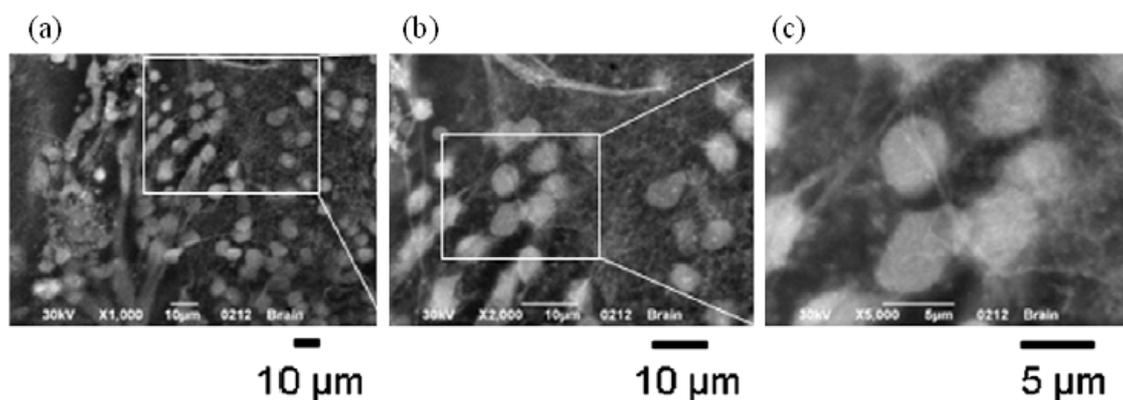


図 3.2.12 金魚脳の切片試料の大気圧 SEM 像。金魚の脳を 1%パラホルムアルデヒドで固定し白金ブルーで染色した後、切片を作製し、薄膜ディッシュの SiN 薄膜の上に切断面を乗せた。大気圧 SEM で、切断面の核が背景の中に明るく観察された。2枚の拡大図では、核の詳細を確認できた。また、核の外形を明瞭に観察することができた。神経突起のような繊維も、弱く染色された。図は許可を得た上で転載: ref (Nishiyama et al., 2010), copyright 2010 Elsevier。

3.2.3.6 バイオ分野への応用に関する考察

SEM 用の環境セルは、溶液中の細胞の観察を可能にした。しかしながら、SEM 用環境セルの容量はわずか 15 μl であり、外部から細胞を操作するには少なすぎる。これに対し、新しい薄膜ディッシュは、最大 3 ml の容量であり、環境セルのようなほんの数 μl の水滴の繊細な操作は必要ない。薄膜ディッシュは大気に開放されているため、ステージ上でマイクロインジェクションや電気生理の実験が可能であると予測される。また、薬剤やウイルスの滴下もできることは言うまでもない。そして、目的細胞のマニピュレーションの直後

に、薄膜ディッシュの上部に設置した光頭で変化を観察できる。これにより観察の瞬間に細胞を固定可能であり、さらにステージ上で染色や洗浄などが可能である。そして、光顕観察から nm スケールの空間分解能を有する大気圧 SEM 観察に移り、巨大分子や器官の変化の決定的な瞬間をとらえることができると予測される。反対に、大気圧 SEM で観察された新しい細胞内の構造は、GFP(Green Fluorescent Protein: 遺伝的に細胞内に発現させることが可能な蛍光タンパク質)を発現した試料の蛍光観察により同定・解析できる。最初に大気圧 SEM 像における構造の分布から、これらを形成するタンパク質の候補を選択できる。候補タンパク質の遺伝子に基づいて、そのタンパク質の組換え発現(recombinant expression)により蛍光タンパク質と組換えできる。光顕での観察により蛍光タンパク質を発現したタンパク質の位置がわかり、さらに染色やラベルした上で大気圧 SEM 観察することにより、ターゲットと蛍光の位置を相関させることができる。この方法により、目的の構造がどんなタンパク質からできているかを調べられる。大気圧 SEM を共焦点レーザー顕微鏡、2光子励起顕微鏡(Denk et al., 1990)、そして最近開発された新型の超解像光学顕微鏡(特に STORM や PALM) (Hell, 2007)と組み合わせることにより、分子局在の位置精度を改善できる可能性がある。

10,000 倍における大気圧 SEM の視野は $13 \times 10 \mu\text{m}$ であり、光頭の視野よりもかなり小さい。迅速に両者を比較するために、大気圧 SEM で自動画像取得やタイル画像の取得をすることが重要である。将来 MEMS 技術を用いて SiN 膜の上に OM と大気圧 SEM の両方で使えるリファレンスマークをつけることができるだろう。このマークを用いて、十分にオーバーラップさせた上で大気圧 SEM 画像を自動的に取得できるだろう。マークとオーバーラップ領域を用いることにより、ソフトウェアで大気圧 SEM 画像を自動的にアライメントおよび合成することができるだろう。

TEM 用に開発された環境セルを用いて、高い空間分解能で様々な細胞内構造が取得された。例えば、まわりに電子密度の高い粒子がついた金属を還元するバクテリアの細胞全体が、TEM を用いて水蒸気の中で観察されて、EELS を用いて細胞によるクロム(IV)の還元が観察された(Daulton et al., 2001)。厚さが 50 nm の SiN 薄膜を持つ環境セルを用いて、円環状暗視野検出器(ADF)がついた走査透過電子顕微鏡 (STEM)で、哺乳類の COS7 fibroblast 細胞について、大きさが 10 nm の金粒子でラベルした EGF (Epidemial Growth Factor: 上皮成長因子)が EGF レセプターに結合しているのを観察できた(de Jonge et al., 2009)。また、環境 SEM の STEM 検出器を用いて、バクテリアの細胞を取り囲む 2 重膜構造を観察できた (Bogner et al., 2005)。

大気圧 SEM を用いた 10 万倍での画像取得に伴う電子のドーズは $150 \text{ electrons}/\text{\AA}^2$ あるいはそれ以下と見積もられ、クライオ TEM トモグラフィーで傾斜シリーズの画像を取得する際の最大値 $80 \text{ electrons}/\text{\AA}^2$ の 2 倍程度である(Iancu et al., 2006)。このため、構造を保つためにアルデヒド系の固定材で試料を固定した。さらに、大気圧 SEM 観察をする際のバッファには、ラジカル消去剤として常にアスコルビン酸あるいはグルコースを添加した。

これらの条件の下で、40 pA のビーム電流の際に 2 万倍の画像を 3-4 回あるいはそれ以上スキャンしても画像が安定であることを確認した。ただし、これは試料が無傷であることを保証するものではない。最高倍率で数回スキャンしたとしても、薄膜ディッシュ内部の温度上昇はとて小さいと見積もられ、バッファの温度は室温に保たれる。これは、試料が大きな体積の水の中に入っており、水の熱伝導率がとても高いためである。電子のドーズは、空間分解能の 2 乗に比例することが知られている (Spence, 2013) (Colliex et al., 1984)。このため、低倍率での測定では電子のドーズが急速に小さくなる。ニューロンを培養することが可能な薄膜ディッシュは、エネルギーの低い低加速電圧 TEM 用の環境セルにも作り変えられるだろう。もう一枚の SiN 薄膜で薄膜ディッシュの上をシールし、電子の検出器をその上に付加することにより、大気圧 SEM システムを環境 STEM として作り変えることができる。薄膜ディッシュは広く平らな形状なため、その上に高感度の電子検出器を配置することが可能である。ただし、この広く平らな形状により、試料と検出器のために大きな体積の真空チャンバーが必要である。これは、大気圧 SEM, STEM, OM の triple integration になる。

同様に、シンチレーターあるいは集光ミラーと光センサーを薄膜ディッシュの上に配置することにより、大気圧 SEM は電子線照射によるカソードルミネッセンス (CL) を検出できるだろう (Carlsson and Vanessen, 1974)。これにより、高分解能の蛍光顕微鏡を実現できる可能性がある。さらに、薄膜ディッシュの形状は平らであるため、高感度の光検出器をその上部に配置できる (Reimer, 1998)。

電子を透過する薄膜の品質、特にその薄さと平坦さは、電子が透過して試料に到達し、かつ、戻って検出器に到達することから、画像取得にとって重要である。この理由により、とても平坦で均一な厚さの SiN 薄膜を CVD 法で形成した (Hwang et al., 1982)。薄膜の膜厚を 150 nm から薄くしていくと、像のシャープさが徐々に改善した。このため、より薄い薄膜を用いることにより画質が改善されると予測される。そこで、膜厚が 10 nm の薄膜も試作したが、膜厚を薄くすると破損しやすくなる。これらを総合的に考慮し、標準的な商品の 大気圧 SEM では 100 nm の膜厚を採用した。膜の薄さと平坦さへの要求は、よりランディングエネルギーの低い大気圧 SEM 観察で重要である。ランディングエネルギーが低いと、試料への電子線浸透力が低くなるためである。SiN 薄膜は既に半導体製造プロセスに様々な目的で用いられているため (Hsu, 2008) (Sze, 1998)、複数のウインドウを有する薄膜ディッシュを量産するのも困難ではないだろう。

SEM 観察では、電子線照射による試料のチャージングにより、像をうまく取得できないことがある。真空中では、試料を金属でコートすることによりチャージングを防止できる。これに対し、大気圧 SEM 観察では、チャージングが観察されない。これは、試料の周囲のバッファに電荷が移動するためと推測される。

容量が 3 ml の薄膜ディッシュは、顕微鏡のステージから取り外すことができる。これにより、CO₂ インキュベーターの中で長期間細胞を培養することが可能であり、ニューロン

や上皮細胞などの培養が難しい細胞を含めて様々な細胞を培養できる。このような培養技術を用いて、*in vitro* でニューロン間のシナプス形成を大気圧 SEM で可視化できた。胚形成の間にシナプス形成に影響する様々な刺激が知られており、それが脳のネットワークを決定し、そして本能や記憶などを含む高次の精神活動を制御する。*In vivo* のニューロン器官はシナプスの形成を観察するには複雑すぎるため、これらの基本的な制御メカニズムはニューロンの培養システムを用いて研究されてきた。ニューロンの接続は、エポキシ包埋した神経突起を基板と平行な方向に薄切することはかなり難しいため、これまで一般的に TEM ではなく光顕で観察されてきた。神経突起、スパイン、シナプスなどは小さくて、通常 50~500 nm 程度であり、光顕よりも大気圧 SEM で観察するのが適している。このシステムで対応できる細胞の種類は、SiN 薄膜に適用できるコーティング剤を増やすことにより増加できるだろう。

酢酸ウラン、リンタングステン酸、オスミウム酸を含む様々な染色液を、大気圧 SEM による細胞の観察に適用することができた。これらの中で、特に白金ブルーを用いた際に染色体が明るく観察されるのは、核酸とタンパク質の複合体を選択的にラベルしているためと思われる。これは、白金ブルーと大気圧 SEM の組み合わせで、迅速かつ高空間分解能な染色体分析に利用できる可能性を示唆する。これは、これまで同定することが難しかった遺伝的な病気に関連したわずかな染色体の狂いを検査することにも使える可能性があるだろう。

大気圧 SEM は、白金ブルー染色との組み合わせで、薄切することなしに細胞の表面、特に核を明確に観察できる。手術中におけるガンの検査で最も重要なのは核の大きさであり、これまではクライオ薄切した上でエオシンとヘマトキシリンで染色し光顕で観察していた。しかしながらこの方法には少なくとも 15~30 分必要であり、その間腫瘍を切除するための手術を中断する必要がある。検査の工程の中で、組織のクライオ薄切が最も難しいステップであり多くの時間を占める。さらに、この工程が難しいために、検査は手術後にパラフィン薄膜法や抗体を用いた方法で確認されるが、これらは再手術の可能性を含む。大気圧 SEM は、薄切を必要としないために、検査を迅速かつ簡単にできる可能性がある。

免疫電顕での標準的なステップである脱水およびその後の水溶性レジン包埋は、時々敏感なエピトープ(抗体が結合する抗原の一部)を保つには過酷すぎる。脱水せずに直接親水性レジンに包埋することもできるが、水溶性レジンの薄切は一般的に簡単でない。

大気圧 SEM は、免疫電顕としての良い能力を備えている。必要なのは固定液だけであり、エピトープにあわせてそれを選択できるからである。薄切しなくて済むことは、スルーブット向上にも有効である。固定とラベル(および追加の染色)は、30 分以内に完了できる。これと薄膜ディッシュの開放された構成により、細胞内のエピトープを効率よく観察できる。さらに、薬剤とタンパク質を光化学的にクロスリンクさせた後に金のラベルをすることにより、薬のスクリーニングに用いることができるだろう(Kiyonaka et al., 2009)。また、複数のウインドウを持った薄膜ディッシュを用いることにより、観察の効率が向上するだ

ろう。

この研究の中で、大気に開放された試料室を持つ新しい大気圧 SEM について記載した。試料を外部から操作できる柔軟性、高い空間分解能 (8 nm)、そしてスピードがシステムの核心である。大気圧 SEM の高い空間分解能により、これまでチャレンジングな課題であった、固定したメソスケールの分子を観察することが可能となった。大気圧 SEM は、特に金属、セメント、ナノ材料などの電子線照射に耐性のあるものに対して有効であり、基礎的な生物学だけでなく創薬、病原菌の検査、食品科学、化粧品、そして高分子化学などにも広く適用できるだろう。

3.3 材料系試料の動的観察等

大気圧 SEM は、当初バイオ系試料観察を目的として開発した。しかしながら、材料系の試料を液体や気体中で観察したいとのニーズも高い。本節では、材料系の試料に対する大気圧 SEM の応用について記載する(Suga et al., 2011) (須賀三雄 et al., 2011) (須賀三雄, 2012)。

3.3.1 材料系分野における大気圧 SEM の位置づけ

材料系試料の観察で最もニーズが高いのが、液体や気体中で動いている試料をそのまま *in situ* で観察することである。バイオ系の試料を観察する際には、電子線照射によるダメージに常に注意を払う必要がある。これに対して、材料系の試料には電子線照射に対して安定なものも多い。このような試料については、液体や気体中で動いている様子を直接大気圧 SEM で観察できると予測される。本研究では、最初にシリカ粒子やタンパク質のボールが液体中で動いているのをリアルタイムで観察する。動的観察では、特に大気圧 SEM の試料室が大気に解放されていることにより、様々な観察が可能になる。まず、観察中に体積が急速に変化する試料の観察である。本研究では、その一例として、PBS 溶液が蒸発することにより、塩の固体が形成される様子を動的に観察する。また、試料室が大気に解放されているので、試料を外部から操作しやすい。例えば、大気圧 SEM で観察中に、外部から試薬を試料に投入することが可能である。本研究ではその一例として、シリカ粒子がランダムに運動している最中に、外部から食塩水を注入することにより、粒子の運動が停止する様子を観察する。

特殊な薄膜ディッシュを開発することにより、さらに観察の幅を広げることができる。本研究では、2つの例を示す。ひとつは、SiN 薄膜上に電極を形成した特殊ディッシュ（電気化学薄膜ディッシュ）を開発することにより、電気化学反応を観察する。もうひとつは、温度を制御するためのヒーターと温度計を組み込んだ温度制御ディッシュである。これを用いた温度変化の観察例として、はんだの融解と凝固を観察する。

一方、大気圧 SEM は簡単に使えることも大きな特徴である。これを用いて、液中試料の品質管理などにも使える可能性があるだろう。その可能性を調べるために、本研究では金属ペーストの迅速観察も試みた。以下、それぞれについて説明する。

3.3.2 実験

3.3.2.1 粒子の動的な観察

液体中における動的な観察の可能性を調べるため、液体中に分散した粒子を薄膜ディッシュに入れて観察した。第一の実験では、直径 1 μm のコロイダルシリカ粒子(micromod sicastar43-00-103, 液体中に分散したものを 2.5 mg/ml の密度になるように純水で希釈し

た。SiN 薄膜上の試料を、大気圧 SEM で連続的に観察した。ビーム電流は 1.2 nA とした。画像は、アベレーシングなしに 0.075 秒/フレームで撮像し、ビデオに記録した。

第二の実験では、より小さな直径 400 nm のシリカ粒子を用いた。実験の条件は、第一の場合と同様である。

第三の実験は、さらに小さなタンパク質ボールを観察するために行った。10 μ l のタンパク質溶液(マクロファージ炎症性タンパク質: Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1a, 7.8 kDa)と 90 μ l の 45 mM グリシン塩酸バッファー (pH 2.42)の混合液に、固定のために 1%のグルタルアルデヒド(pH 4.5)を 4 μ l 加え、染色のために 0.08%のリンタングステン酸(pH 7.5)を 20 μ l 加えた上で、室温で約 5 分間保持した。リンタングステン酸の pH を 7.5 とするために、水酸化ナトリウムで調整した。この混合溶液を薄膜ディッシュの上に乗せて、大気圧 SEM で連続的に観察した。いずれの実験においても、電子線のランディングエネルギーは 30 keV とした。

3.3.2.2 蒸発

数 μ l の PBS を薄膜ディッシュの上に滴下し、その蒸発の過程を大気圧 SEM により 1,000 倍で連続的に観察しビデオに記録した。電子線のランディングエネルギーは 30 keV、ビーム電流は 40 pA、フレームレートは 0.15 秒、4 回積算の条件で観察した。

3.3.2.3 *In situ*の試薬投与

大気圧 SEM では、試料室が大気に解放されているために、観察中に試料に試薬を投与できる。ここでは、その原理実証を目的として、薄膜ディッシュの上部にシリコンチューブの一端を固定し、他の端を大気圧 SEM の外部に配置したシリンジに接続した。目的とする量の NaCl 溶液を、シリンジを操作することにより、薄膜ディッシュ側のシリコンチューブで吸い込み保持した(須賀三雄 et al., 2011)。

試料には、3.3.2.1 と同様に直径 1 μ m の粒子を用いた。観察の条件も、3.3.2.1 での粒子の動的観察と同様である。粒子がランダムに運動するのを大気圧 SEM で観察中に、シリンジを操作して試料に NaCl 溶液を滴下した。

3.3.2.4 電気化学反応の観察

電気化学反応を観察するために、SiN 薄膜の上に電極を形成した電気化学薄膜ディッシュを作製した(図 3.3.1 (a),(b)) (Suga et al., 2011)。薄膜ディッシュの SiN 薄膜の上に、厚さが 30 nm のチタンと厚さが 100 nm の金の 2 層膜を堆積した。次に、フォトリソグラフィとウェットエッチングを用いて、2 層の薄膜を 2 つの対向する電極に加工した。電極間の距離は、100 μ m である(図 3.3.1 (b)) (Suga et al., 2011)。

電気化学薄膜ディッシュに、電解液として(1)飽和食塩水溶液、(2)飽和食塩水溶液 10 に対し 0.05 mole の塩化金水溶液 1 を混合した溶液、および、(3)硝酸銀溶液を入れた。大気

圧 SEM 観察を開始すると共に、電極間に電圧を印加した。(1)と(3)の実験では、上記2つの電極(積層膜)間に電圧を印加したが、(2)の実験ではアノードとして白金線を用い、カソードとして上記の電極(積層膜)を用いた。

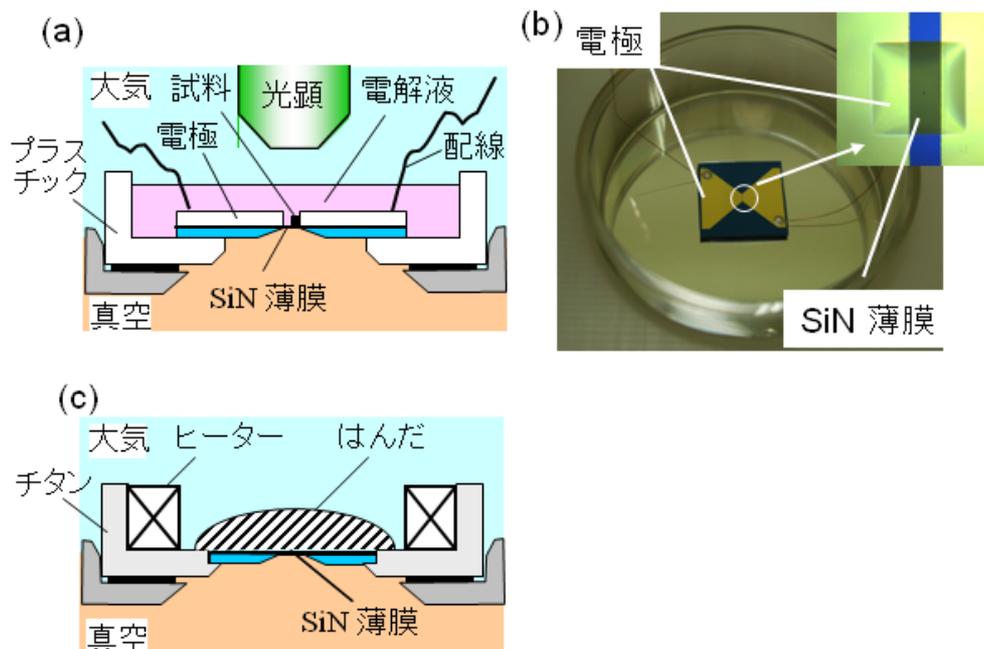


図 3.3.1 電気化学薄膜ディッシュと温度制御薄膜ディッシュ。電気化学薄膜ディッシュの (a) 断面の模式図、および、(b) 外観写真。SiN 薄膜の上に MEMS 技術を用いて電極を形成し、外部より電流・電圧を印加できるようにした。(c) 温度制御薄膜ディッシュの断面の模式図。ボディをチタンで構成し、ディッシュ内にヒーターを配置した。

3.3.2.5 大気圧下のはんだの融解と凝固の観察

温度変化を観察するために、温度制御ディッシュを開発した(図 3.3.1 (c)) (Suga et al., 2011)。昇温に耐えられるようにディッシュ本体をチタンで構成し、温度を制御するために本体にヒーターと熱電対を組み込んだ。その性能を調べるために、はんだの融解、および、凝固の様子を観察した。はんだには、鉛フリーの Bi 58 %, Sn 42 %を用いた。

3.3.2.6 ペーストの観察

近年プリントドエレクトロニクス用の配線材料として用いられることが多くなってきた銀ペーストについても、大気圧 SEM で観察した。大気圧 SEM は、液中の試料を迅速に観察できるため、溶媒の中に分散した銀粒子を簡単に観察できる。市販の3種類の銀ペースト(銀ペースト A, 銀ペースト B, 銀ペースト C)についての観察を行った。また、市販の

はんだペーストの観察も行った。いずれの試料についても、それぞれ 5,000 倍、および 20,000 倍の倍率で観察した。

3.3.3 結果および考察

3.3.3.1 粒子の動的観察

(1) シリカ粒子の放射線誘起自己組織化

液体中のコロイダルシリカ粒子を、大気圧 SEM で連続的に観察した。観察の最初に倍率を 5,000 倍にした後、10,000 倍にして、最後に再び 5,000 倍にした。動画は、文献(Suga et al., 2011) の supplementary Fig. 1 に掲載されている (doi:10.1016/j.ultramic.2011.08.001)。

図 3.3.2 (a)-(c)に、倍率 5,000 倍の際に 0.5 秒おきにビデオからキャプチャーした画像を示す。画像には、直径 1 μm の多数の輝点が観察された。シリカの平均原子番号と密度はそれぞれ 10 と 2.2 g/cm^3 であり、水の 3.3 と 1 g/cm^3 よりも顕著に大きいことから、これらの輝点はコロイダルシリカ粒子によるといえる。シリカ粒子は、観察の最中ずっと動いていた。2つの粒子の軌跡(図 3.3.2 (a)の白の矢印)を、図 3.3.2 (c)の拡大図の上に重ねて図 3.3.2 (d)に示す。周囲の水分子の動きにより、シリカ粒子がランダムに運動する様子が示されている。

He と Donald は、ポリメチルメタクリレート(PMMA: poly-methyl methacrylate)とラバーよりなる多層ラテックス粒子の動きを環境 SEM で観察した(He and Donald, 1996)。彼らは、試料に上方から電子線を照射して観察した。電子線の試料への侵入深さが限定されていることから、液体表面近傍に浮かんでいる粒子を観察したと思われる。彼らは、ブラウン運動による粒子のランダムな運動を観察したと結論した。

これに対し本実験では、シリカ粒子は水より明らかに密度が高いため、これらは沈み SiN 薄膜の上にいるため、SiN 薄膜を通して下側から観察できた。粒子の運動は、SiN 膜との接触による影響を受ける。光頭だけで薄膜ディッシュ上のシリカ粒子を観察し、光の強さが粒子の運動に顕著な影響を与えないことを確認した。このため、粒子が SiN 膜に接触しているため 3 次元的に自由に動くことはできないが、粒子のランダム運動は熱に起因していると推測された。さらに、正に帯電したシリカ粒子の運動は、電子線照射により形成されるポテンシャルの影響も受ける。これは、今後 *correlative microscopy* によって、より詳細に調べるべきものである。

倍率 10,000 倍でビデオよりキャプチャーした大気圧 SEM 像を、図 3.3.2 (e)-(h)に示す。倍率を 5,000 倍から 10,000 倍にすることにより、観察時における平均的な電子線の照射密度は、9 $\text{pA}/\mu\text{m}^2$ から 36 $\text{pA}/\mu\text{m}^2$ に増加した。

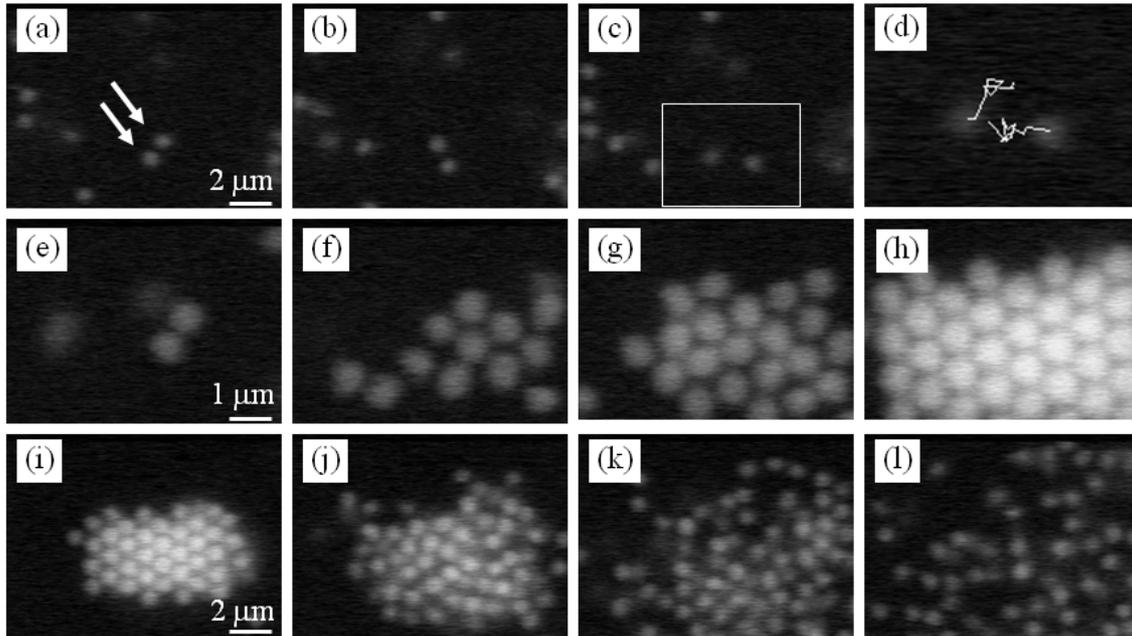


図 3.3.2 大気圧 SEM で観察した微粒子の運動。溶液中のコロイダルシリカ粒子（直径 1 μm ）を連続観察し、記録したビデオからキャプチャーした画像。(a-c) 倍率 5,000 倍。各画像の間隔は 0.5 秒。(d) (c)の四角の領域の拡大図に(a)の矢印で示す 2つの粒子の 1 秒間の軌跡を重ねたもの。微粒子のランダムな運動が観察された。(e-h) 倍率 10,000 倍での放射線誘起自己組織化。(e)と(f)の間隔は 1 秒、(f)と(g)の間隔は 4 秒、(g)と(h)の間隔は 20 秒。(i-l) 倍率 5,000 倍で観察した粒子の疎開。測定の間隔は、それぞれ 2 秒。図は許可を得た上で修正して転載: ref (Suga et al., 2011), copyright 2011 Elsevier。

シリカ粒子は、水溶液中で正に帯電している。入射電子のエネルギーが 30 keV の場合、2.4.2 項で説明したように、電子放出率 σ は 1 よりも大幅に小さい(Goldstein et al., 2003; Reimer, 1998)。すなわち、SiN 膜表面から真空中に放出される SE 量と BSE 量の和は、入射電子の量よりも少ない。このため 30 keV の電子線照射により液体中に負の電荷が注入されるが、これにより形成される液体中のポテンシャル差は、正に帯電した粒子を SiN 膜の方に引き寄せる。この引力は、倍率を高くすることにより強くなる。倍率を上げることにより、観察領域の電荷注入密度が高くなるため、ポテンシャル差が大きくなるからである。さらに、ポテンシャル差の SiN 薄膜に平行な方向の成分は、シリカ粒子を電子線照射領域に近づける。このため、倍率 10,000 倍の場合、シリカ粒子は電子線を照射した SiN 薄膜の上で集まり最密構造を形成したと解釈している。これは、電子線照射により誘起されたため、「放射線誘起自己組織化」と名付けるべきものであろう。粒子はランダム運動をしながら集まったために、最密構造を形成しやすかったものと推測される。この自己組織化は、

材料科学や生命科学を含む様々な分野で重要である。

電子線を照射している間、電子線照射による引力とランダム運動による斥力が競合するだろう。本研究では、これを粒子のクラスターの中で観察した。クラスターの外縁近傍ではシリカ粒子の動きは大きい、中心では小さい。これは、中心付近では個々の粒子が周囲の6個の粒子に囲まれているため、動きが制限されるためと推測される。

倍率を 10,000 倍から 5,000 倍に下げた際に、上記クラスターが徐々に分散するのを観察した。ビデオから 2 秒ごとにキャプチャーした画像を図 3.3.2 (i)-(l)に示す。この現象は、倍率の変更に伴い繰り返し観察された。粒子間の斥力はシリカ粒子のランダムな動きに依存することから、電流密度を下げた場合(倍率を下げた場合)にこの斥力が支配的になったものと思われる。

同様な放射線誘起自己組織化は、直径 1 μm のシリカ粒子だけでなく、より小さな 400 nm でも起こることがわかった (図 3.3.3) (須賀三雄 et al., 2011)。この場合も電子線照射により最密構造が形成されるが、その中に結晶欠陥のような粒子配列の乱れが観察された。

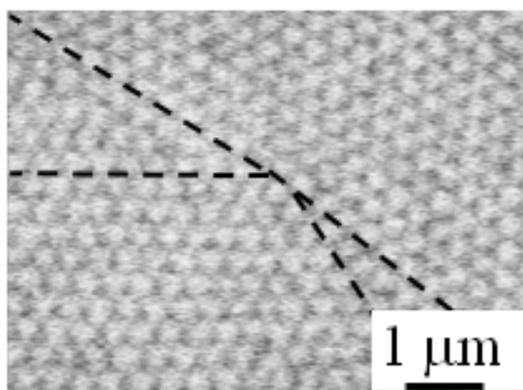


図 3.3.3 放射線誘起自己組織化したコロイダルシリカ微粒子(直径 400 nm)の大気圧 SEM 画像。微粒子は最密構造に配列するが、そこには結晶欠陥のような構造が観察された。

薄膜ディッシュの容量は 3ml であるため、蒸発による影響を最小限にすることが可能である。これにより、物理現象の長時間の観察も可能となった。

(2) タンパクボール

アルデヒドの架橋溶液の中で、タンパク質(MIP-1 α : 7.8 kDa)から成る粒子を大気圧 SEM により 20,000 倍で観察した(図 3.3.4 (a)-(c))。動画は、文献(Suga et al., 2011) の supplementary Fig. 2 に掲載されているが、図 3.3.4 (a)-(c)は、そこからキャプチャーしたものである。多くの明るいスポットが観察されるが(図 3.3.4 (a)-(c))、これらはグルタルアルデヒド溶液の中で凝集したタンパクボールであろう。平均的な直径は約 200 nm である。

この倍率で、粒子は最初ランダムに運動していた。やがてこれらは、シリカ粒子の場合と同様に、細密構造に配列していった (図 3.3.4 (c)を拡大した図(d))。しかしながら、シリカ粒子の場合と異なり、配列した後に電子線を弱めたり止めたりしても、グルタルアルデヒド溶液の中でクラスターは分散しなかった。これは、グルタルアルデヒドの中で照射誘起自己組織化した後に粒子間に共有結合が起こったためと考えられる。

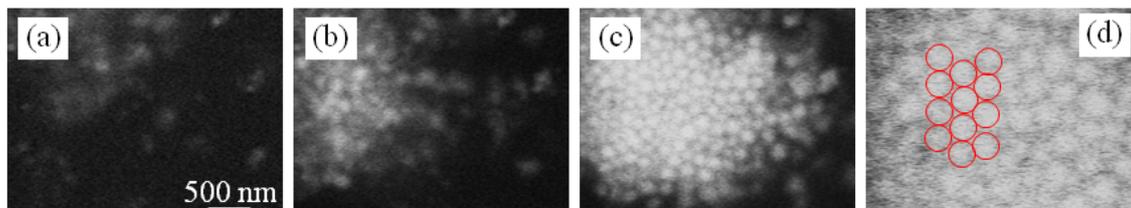


図 3.3.4 大気圧 SEM で観察した凝集したタンパクボールの運動。(a-c) 溶液中の凝集タンパクボール (直径約 200 nm)を連続観察し、記録したビデオからキャプチャーした画像。(a)と(b)の間隔は 10 秒、(b)と(c)の間隔は 26 秒。(c) 放射線誘起自己組織化。(d) (c)の拡大図。粒子の振る舞いは、図 3.3.2 のシリカ粒子と類似であった。図は許可を得た上で修正して転載: ref (Suga et al., 2011), copyright 2011 Elsevier。

3.3.3.2 蒸発の観察

急速な蒸発による結晶化の過程を観察するために、少量の PBS を薄膜ディッシュの SiN 膜上に滴下し大気圧 SEM で観察した。動画は、文献(Suga et al., 2011) の supplementary Fig. 3 (doi:10.1016/j.ultramic.2011.08.001)に掲載されているが、ビデオからキャプチャーした画像を図 3.3.5 に示す。PBS の液滴について、最初は何もコントラストがなかったが(図 3.3.5 (a))、次にデンドライド的な構造が突然に現れ(図 3.3.5 (b))、さらに成長し(図 3.3.5 (c))、最終的に大きなデンドライドになった(図 3.3.5 (d))。観察後、SiN 薄膜表面が完全に乾燥しているのを肉眼で確認した。

本結果は、大気圧下で蒸発による結晶化を電顕で観察した初めての例である。蒸発による乾燥現象は、ペンキやプリントを含む様々な産業分野において重要である。蒸発による結晶化はまた技術的に重要であり、特にフィルム産業においてとても重要である。結晶化の工程を、このように電顕により *in situ* で観察できるようになったことで、様々な条件、例えば様々な温度や様々な溶媒を用いた際の結晶化を観察できるだろう。これにより、製造プロセスを改善できると期待される。同様に、大気圧 SEM は様々な相変化を観察できるだろう。

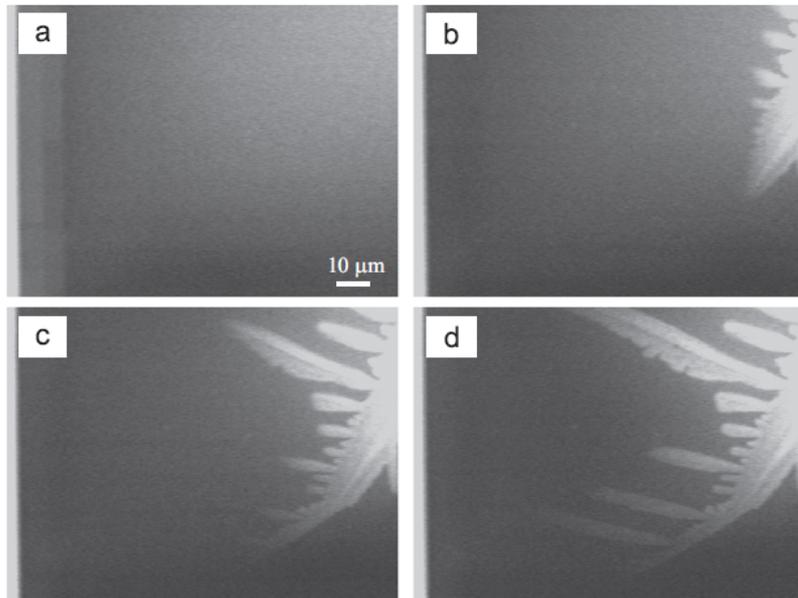


図 3.3.5 PBS 溶液の蒸発による塩の析出の *in situ* 観察。大気圧 SEM で連続観察し記録したビデオから画像をキャプチャーした。観察の間隔は 2 秒。(a) 明瞭なコントラストは観察されない。(b) デンドライド的な構造が突然に現れた。(c-d) (b)の構造が成長した。図は許可を得た上で修正して転載: ref (Suga et al., 2011), copyright 2011 Elsevier。

3.3.3.3 *In situ*の試薬投入

液体中でランダムに運動していた直径 $1\ \mu\text{m}$ のシリカ粒子は、外部から NaCl 溶液を加えることにより、SiN 薄膜に吸着されて静止していった(図 3.3.6) (須賀三雄 et al., 2011)。

溶液中のシリカ粒子は、帯電することにより互いに反発し、凝集するのを防いでいる。帯電は電気二重層を形成するが、その厚さは溶液のイオン強度に依存し、強度が高くなると薄くなる(Tadmor et al., 2002)。NaCl 溶液を滴下することによりイオン強度が高くなり、これにより電気二重層が薄くなったために粒子間、あるいは、粒子と薄膜の反発力が弱まり粒子の動きが停止したものと推測される。

このように、大気圧 SEM では薄膜ディッシュが大気に解放されているために、観察中に外部から試料に試薬を加える事ができる。

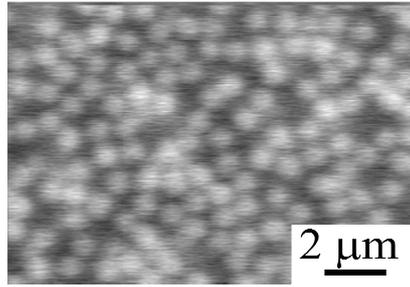


図 3.3.6 運動するコロイダルシリカ粒子に NaCl 溶液を投入した後の大気圧 SEM 像。NaCl 溶液の投入により、シリカ粒子が SiN 膜に吸着し動きが止まるのを観察できた。

3.3.3.4 電解液中の電気化学反応の動的観察

(1) 飽和食塩水溶液

電気化学薄膜ディッシュ内に飽和食塩水を入れた後、2つの電極間に 2.1 V の電圧を印加した。カソード付近を、大気圧 SEM で連続観察しビデオに記録した。動画は、文献(Suga et al., 2011) の supplementary Fig. 4 に掲載されている (doi:10.1016/j.ultramic.2011.08.001)。ビデオからキャプチャーした画像を図 3.3.7 に示す。これらは、電圧を印加した直後から観察した結果である。図 3.3.7 (a)には明確なコントラストは見えないが、(b)で突然樹木に類似(tree like)の析出物が現れ、(c)~(f)でこの析出物がアノード方向に向かって成長する。大気圧 SEM での観察後、試料を乾燥させてから SEM/EDS (走査電子顕微鏡/エネルギー分散型 X 線分析)にて析出物の元素分析をした結果、樹木に類似(tree like)の析出物は金であることがわかった。

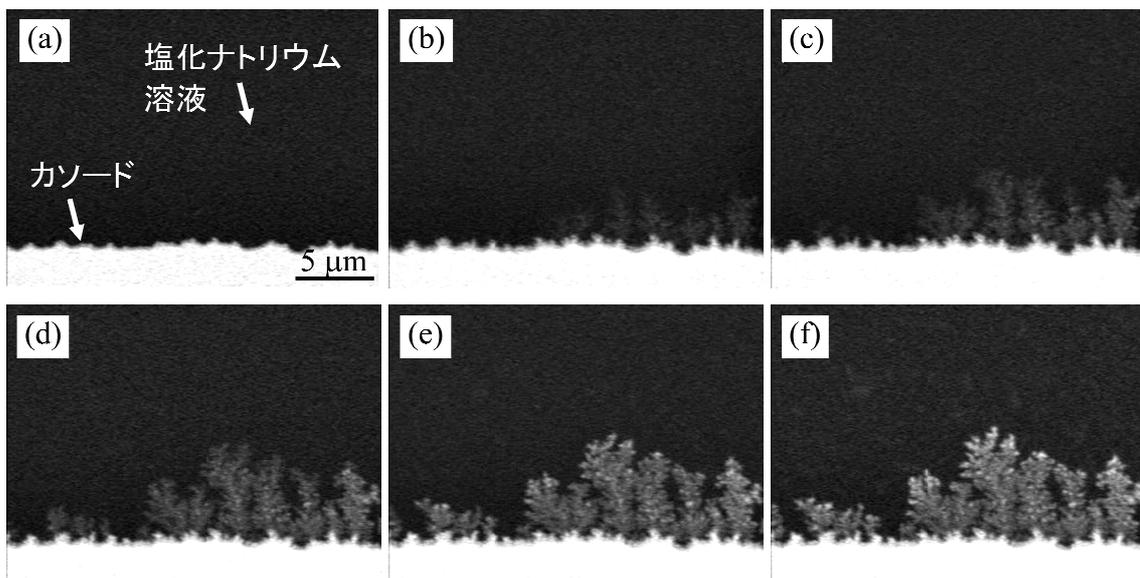
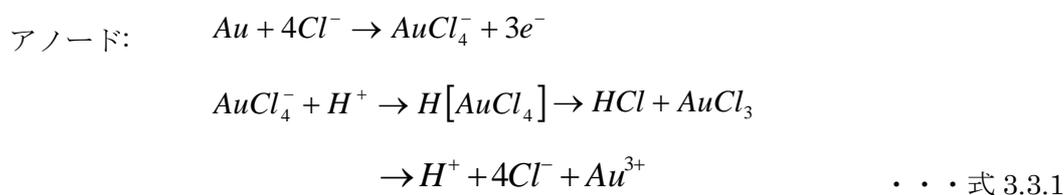


図 3.3.7 NaCl 溶液の中で2つの電極間に電流を流した状態で観察した電気化学反応。(a-f) 大気圧 SEM でカソード近傍を連続観察し、記録したビデオからキャプチャーした画像。(a)は電圧を印加した直後であり、その後の観察の間隔は、(a)と(b)が 2.4 秒、(b)と(c)が 0.6 秒、(c)と(d)が 1 秒、(d)と(e)が 2 秒、(e)と(f)が 2 秒である。樹木に類似(tree like)の構造が(b)で突然に現れて、(c-f)で成長した。観察後 SEM/EDS で観察したところ、樹木に類似の構造は金であることがわかった。図は許可を得た上で修正して転載: ref (Suga et al., 2011), copyright 2011 Elsevier。

カソード付近の金は、電気化学的マイグレーションにより、アノードの金が電解液中に溶解し析出したものと思われる(Harsanyi, 1999)。塩素が存在する場合の化学反応は、



と考えられている(Harsanyi, 1999)。また、 $[Au(OH)_x Cl_y]^{(x+y-3)-}$, $(x+y < 4)$ の寄与も議論されている(Harsanyi, 1999)。

これまで、SEM で電気化学反応を観察する際には、真空中での観察が必須だったために、電解液はイオン液体など真空中であっても非常に蒸気圧が低いものに限られていた(Arimoto et al., 2008)。本結果は、大気圧下の電解液中における電気化学反応を、SEM を用いてはじめての動的に高分解能観察したものである。これにより、様々な電解液中における電気化学反応を観察可能になると期待される。

(2) 飽和食塩水溶液+塩化金溶液

積層された電極(カソード)と白金線(アノード)の間に 2.0 V の電圧を印加した。この状態で、カソード付近を大気圧 SEM で連続的に観察した後、スロースキャンで画像を取得した(須賀三雄, 2012)。

連続観察の際には、時間の経過とともにデンドライドが成長した。スロースキャンで取得した画像(図 3.3.8)には、飽和食塩水溶液単独の場合と異なり、より成長の軸がはっきり

としたデンドライド(dendrite)が観察された。また、アノードに Au/Ti の電極を用いた場合と異なり、本条件では Pt が溶解することはなかった。

デンドライド状の電気化学的析出物は、条件に応じて、2つの形態で起こることが知られている(Grier et al., 1986; Sawada et al., 1986)。ひとつは、規則度の高いデンドライドで、もうひとつは秩序がないフラクタル(disordered fractal)である。図 3.3.7 の樹木に類似した構造には、対称軸や秩序ある配置(ordered configuration)がないため、これらは秩序がないフラクタル(disordered-fractal)のグループに属すると思われる。これらの形は、主に分子の輸送に律速されたものと考えられており、拡散律速凝集(DLA: diffusion limited aggregation)に帰属される。一方、図 3.3.8 の構造には、明確な対称軸や秩序ある配置(ordered configuration)がみられる。したがって、規則度の高いデンドライドと思われる。

このように形態の違いから、その成長要因を推測することができる。今後、形態変化をリアルタイムに観察することにより、成長の時間的なゆらぎなど変化する現象を観察できるようになると期待される。

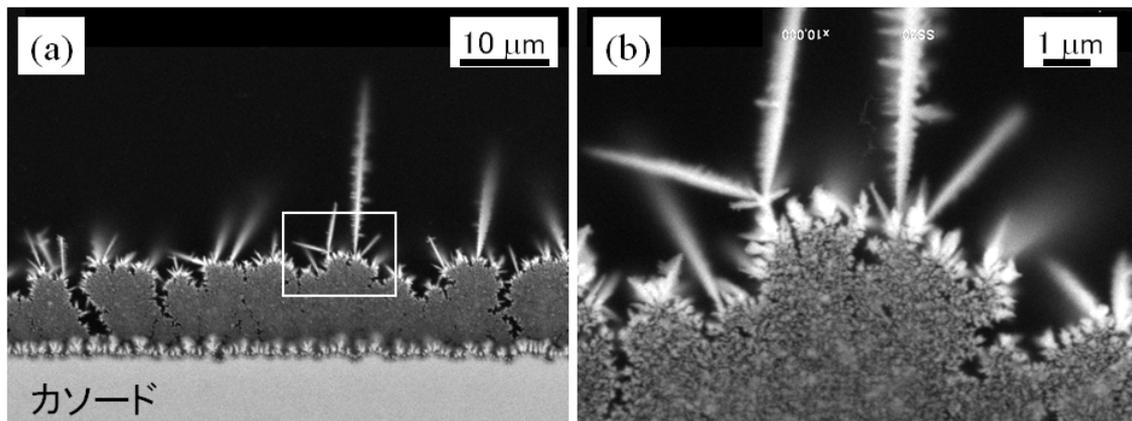


図 3.3.8 NaCl と塩化金の混合溶液中の電気化学反応の大気圧 SEM 像。薄膜ディッシュの電極をカソードとし、白金線をアノードとして、両電極間に電圧を印加した状態でカソード近傍を観察した。アノードからカソードに向かってデンドライド状の析出物が成長した。

(3) 硝酸銀水溶液

ディッシュに硝酸銀溶液を入れた後、2つの電極間に 1.1 V を印加した状態で、カソード付近を大気圧 SEM で連続観察した。動画は、文献(Suga et al., 2011) の supplementary Fig. 5 に掲載されている(doi:10.1016/j.ultramic.2011.08.001)。ビデオから 4 秒ごとにキャプチャーした画像を図 3.3.9 に示す。明るい三角形、あるいは、四角形の領域がカソード付近で成長した。矢印で示す裂け目はだんだんと狭くなり(図 3.3.9 (b), (c))、図 3.3.9 (d)に示すように直径が 1 μm 以下のポイドを形成した。

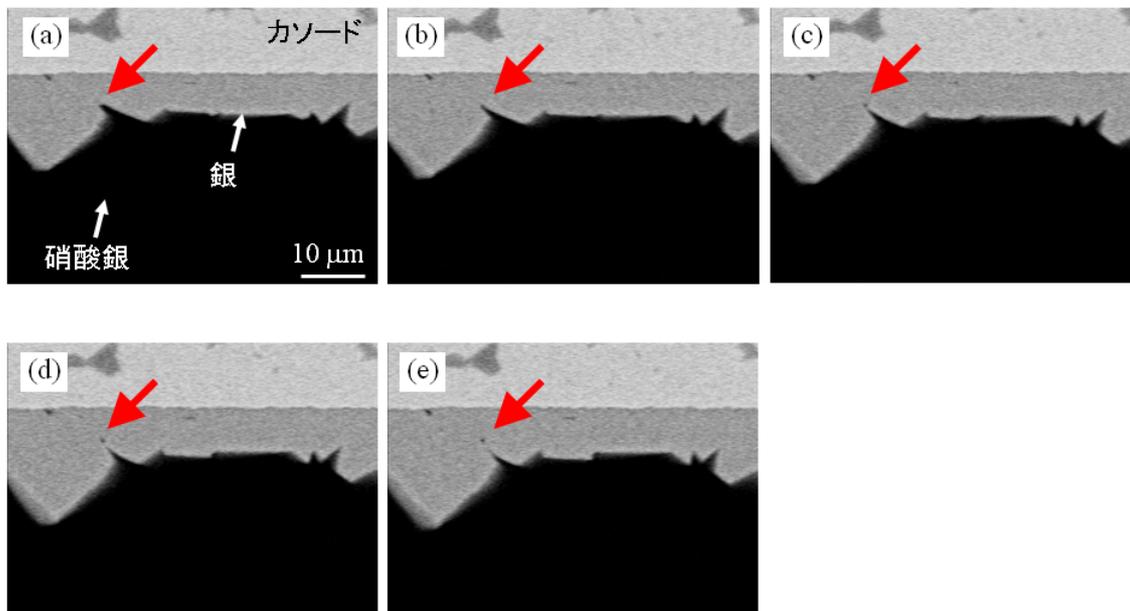


図 3.3.9 硝酸銀溶液中で2つの電極間に電圧を印加した状態で観察した電気化学反応。(a-e) 大気圧 SEM でカソード近傍を連続観察し、記録したビデオからキャプチャーした画像。銀が堆積する際に、赤の矢印で示すように、ボイドが形成される様子を観察できた。図は許可を得た上で修正して転載: ref (Suga et al., 2011), copyright 2011 Elsevier。

硝酸銀溶液中でカソードの近傍に成長した明るい領域は、銀によると推測される。堆積は、次の化学反応によると思われる。



大気圧 SEM により、金属堆積の最中にマイクロサイズのボイドが形成される様子を *in situ* で観察できた。ボイドは、メッキなどの耐久性に影響するため、これらの工程を制御するのに重要である。大気圧 SEM を用いて様々な条件下で電気化学反応を観察することによって、ボイド形成のメカニズムが明らかになると期待される。

大気圧 SEM の上部に配置した光顕・大気圧 SEM 複合システムの光顕は、これらの電気化学現象を低い倍率で俯瞰的に観察するのに有効である。特に、大気圧 SEM だけでは観察が容易でないガスバブルの垂直方向の移動など、電気化学反応によるマクロな現象の観察に有効である。

3.3.3.5 はんだの融解と凝固の観察

図 3.3.10 に、はんだの温度変化を大気圧 SEM で観察した結果を示す(Suga et al., 2011)。図 3.3.10 (a) に、測定時の温度変化を示す。最初、温度が 130°C の状態では Bi が多い固溶相と Sn が多い固溶相が分離しているが (図 3.3.10 (b))、温度の上昇とともにはんだが融解しコントラストは一様になる (図 3.3.10 (c))。冷却をすることにより、再度 Bi が多い固溶相と Sn が多い固溶相が分離して凝固する (図 3.3.10 (d))。再度温度を上げるとはんだは融解し、さらに温度を下げることによって再び凝固した (図 3.3.10 (e))。また、冷却条件の違いによって、凝固組織の形態が大きく異なることもわかった(図 3.3.10 (d), (e))。

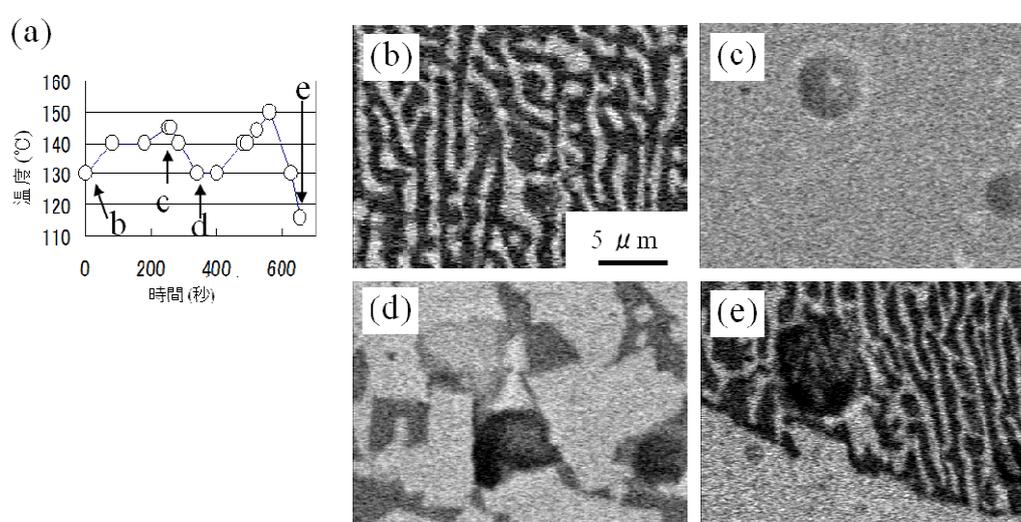


図 3.3.10 大気圧 SEM で観察したはんだ(Sn:42wt%,Bi:58wt%)の温度変化。(a) 観察時の温度の時間依存。(b) 130°Cで凝固しているはんだの大気圧 SEM 像。Bi が多い固溶相と Sn が多い固溶相を、BSE 像のコントラストで識別できた。(c) 145°Cではんだの大気圧 SEM 像。はんだは融解し、コントラストはほぼ一様となった。(d) 145°Cから 130°Cに冷却したはんだ。(e) 150°Cから 125°Cに冷却したはんだ。(d)と(e)では、それぞれ Bi が多い固溶相と Sn が多い固溶相に対応する明るい領域と暗い領域が観察された。(d)と(e)の形態は異なっており、これらが冷却条件に依存することが示唆された。図は許可を得た上で修正して転載: ref (Suga et al., 2011), copyright 2011 Elsevier。

このように、大気圧 SEM と温度制御薄膜ディッシュを用いて、はんだの融解・凝固プロセスを空气中でリアルタイムに観察できる。はんだ付けの際には様々な添加物をはんだに加えるが、これらの多くは揮発性である。このため、真空中における SEM 観察では添加物が蒸発するレートが高く、大気中とは大きく状況が異なると予測される。大気圧 SEM を用いて様々な添加物を加えた際はのはんだ付けプロセスを *in situ* 観察することは、実用的にも

有用な知見を与えるものと考えられる。

3.3.3.6 各種ペーストの観察

銀ペーストの大気圧 SEM 像を図 3.3.11(a-i)に示す(Suga et al., 2011)。観察倍率は、1,000 倍、5,000 倍、および 20,000 倍である。前処理が必要でないため、単に試料をセットするだけで観察が可能であり開始から数分以内に完了できる。3 種類の異なる銀ペーストを観察した(図 3.3.11 (a)-(c), (d)-(f), (g)-(i))。様々な形の銀の塊を、明るい領域として観察することができた。それぞれのペーストに応じて、銀の塊の形状と分散状態は異なっていた。

はんだペーストの大気圧 SEM 像を、図 3.3.11 (j)-(l)に示す。はんだは、液体の中に分散された直径が 20 μm 程度のボール状に観察された。それぞれのはんだボールには、明るい領域と暗い領域が観察された。それぞれが、Bi が多い固溶相と Sn が多い固溶相である。

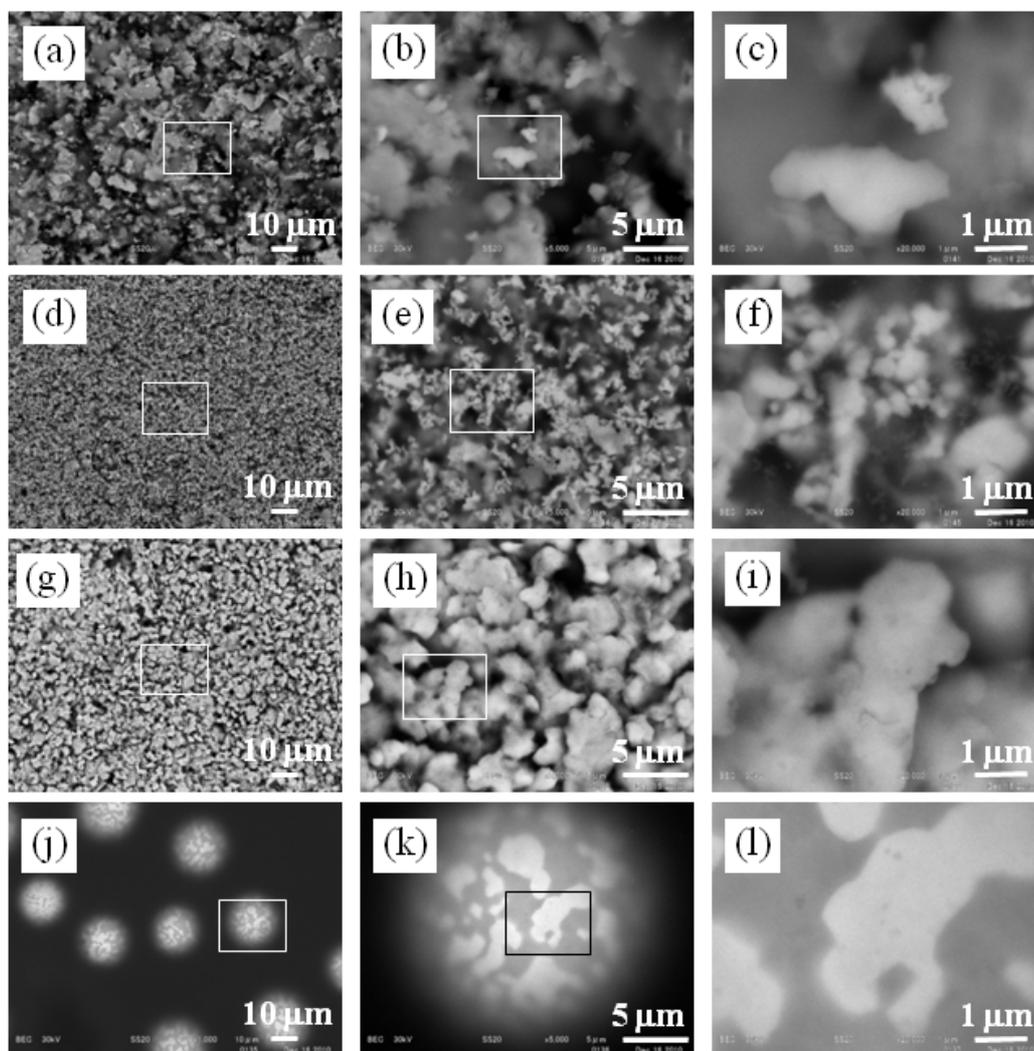


図 3.3.11 各種銀ペーストとはんだペーストの大気圧 SEM 像。試料を薄膜ディッシュの

SiN 薄膜の上に配置し、その直後に前処理なしで観察した。(a-c) 銀ペースト A の大気圧 SEM 像。(d-f) 銀ペースト B の大気圧 SEM 像。(g-i) 銀ペースト C の大気圧 SEM 像。様々な形態の明るい粒子は銀と解釈される。これらの銀粒子の形態と分散を、大気圧 SEM で迅速かつ簡単に観察できる。(j-l) はんだペーストの大気圧 SEM 像。直径約 20 μm の球状のはんだペーストが観察された。その中には、明るい Bi が多い固溶相と暗い Sn が多い固溶相が観察された。図は許可を得た上で修正して転載: ref (Suga et al., 2011), copyright 2011 Elsevier.

銀ペーストは、基板用の配線材料として使われるようになってきた。銀の形状や分散は、配線の性能に影響を与える。品質を保持するために、これらの状況を逐次観察することが有効である。しかしながら、銀ペーストは液体中に分散されているために、通常の電子顕微鏡では容易に観察することはできなかった。急速凍結とクライオ SEM や TEM を使った観察が用いられてきたが、これらにはスキルの高いオペレーターが必要であり、また、前処理に手間と時間がかかるため、頻繁に観察するのは容易でなかった。はんだペーストの観察についても、状況は同じように困難であった。

大気圧 SEM 観察では、前処理が不要であり、観察にわずか数分しかかからないために高いスループットでの観察ができる。また大気圧 SEM では、SiN 薄膜の高さが常に一定であるため焦点位置が大きく変わることがない。このため、焦点は微調整だけで良いので、初心者にも簡単に使うことができる。

3.3.3.7 他の液中高分解能観察手段との比較

環境セルと TEM や STEM の組み合わせは、液体やガス中での試料を観察するための優れた方法である。近年特に、MEMS 技術により薄膜ウインドウを用いたシステムは劇的に改善されて様々に利用されている (Creemer et al., 2008; Gai, 2002b)。ただし、電子の散乱のため、観察できる試料の厚みが限定されている。

走査プローブ顕微鏡 (SPM) は、液体やガス中で光の波長よりも小さいものを観察するための優れた方法である。SPM を用いて、電気化学反応、特に、電極上の螺旋状成長が *in situ* で観察された (Kanani, 2004)。しかしながら、デンドライドなどのより複雑な構造の観察は、探針の 3 次元的な動きによる制限のため限定的である。また、観察の際にプローブ顕微鏡の探針は試料の近傍にあるため、電気化学反応の際に電位やイオンの拡散に影響を与える可能性がある。さらに、通常の液中プローブ顕微鏡のスキャン速度は限定されている (Engel, 1991; Fukuma et al., 2005)。ただし、走査速度は常に向上している (Kodera et al., 2010)。

これらに対し、大気圧 SEM では、観察できる領域は SiN 薄膜の近傍に限定されるが、試料が厚い場合についても観察が可能である。また、デンドライドのような複雑な構造も、0.15 秒/フレームの速度で観察することが可能である。今後、これまで観察が困難であっ

た様々な試料の観察に適用できると予測される。

3.3.3.8 液中試料の観察に関する考察

ここでは液体、特に、水に電子線を照射した際についての考察を行う。水に電子線を照射すると、放射線分解(radiolysis)が起こり、かなり複雑な反応が進行する (Draganic and Draganic, 1971) (Cobut et al., 1998)。その生成物の中で、H や OH のラジカル、あるいは、 H_2O_2 などが生体試料にダメージを与えると考えられている(Glaeser and Taylor, 1978)。このため本研究において生体試料を観察する際には、生体試料をアルデヒド系の固定材で架橋し、ダメージを受けにくくしてから観察を行った。また、ラジカル除去剤 (radical scavenger)の添加により、ラジカルによるダメージを低減した(Thiberge et al., 2004a)。

また、水に電子線を照射すると、電荷を注入することになる。3.3.3.1 では、この電荷注入により粒子が集まり自己組織化することを記載した。このように、試料が電子線照射の影響を受けることがある。このため、実際の観察の際には、電子線照射密度を変更し、観察される現象が変わらないか検証する必要がある。反対に、強い電子線照射により、様々な現象や化学反応を引き起こす研究も開始している。

本研究におけるシミュレーションでは、スクリーンされたラザフォード散乱、あるいは、モット散乱(いずれも弾性散乱)を用いて電子の散乱角度と平均自由行程を計算した。弾性散乱断面積は、原子の原子番号、質量数、電子の質量、電子の速度、電子の波長等で決まり(式 2.2.2-2.2.5)、また、平均自由行程はこれらと密度で決定される(式 2.2.6)。液体中では固体中よりも原子(あるいはイオン)がより大きく運動しているが、室温での熱エネルギーは eV 以下であることから、本研究のように 10 keV 以上のエネルギーの電子を主に考える際には、原子の運動による電子の軌道変化は無視できる程度と考えられる。

また、電子が連続的にエネルギーを失うモデルを採用した。エネルギーロスは、試料中における励起過程に依存するために、液体と固体で違うと予測される。もちろん、固体の場合でも金属と絶縁体では異なるはずである。これらの違いを反映するために、光学特性の測定から電子の非弾性散乱を近似計算する方法も用いられている(Ding and Shimizu, 1996)。ただし、このような励起過程の違いが大きく反映されるのは電子のエネルギーが数 keV 以下の場合である。本研究で用いた 10 keV 以上のエネルギーの電子に対しては、これらの個別の励起過程の違いの影響は小さいと考えられる。

モンテカルロシミュレーションの誤差については、3.2.3.4 にてシミュレーション結果と実験結果が一致していることから、計算はオーダーとしては正しいものと推測できるだろう。今後、より詳細な定量的検討をしていきたい。

3.4 免疫染色試料の correlative microscopy

バイオ分野の研究では、各種のラベルを用いてタンパク質などの位置を調べるのが重用である。本節では、光顕・大気圧 SEM 複合システム用の免疫染色法について記載する (Maruyama et al., 2012a)。

3.4.1 本研究の背景と目的

多くのタンパク質は細胞の中で動的に位置を変え、他のタンパク質や分子と結合することにより機能を発現する。タンパク質の挙動と機能を完全に理解するためには、形成される複合体を認識するとともに、それらの位置の変化を調べる必要がある。これらの情報は、様々な色の蛍光プローブと蛍光顕微鏡や超解像光顕により得られる (Betzig et al., 2006) (Donnert et al., 2006) (Gustafsson, 2005) (Hell, 2007) (Rust et al., 2006)。しかしながら、得られる最高の空間分解能 (< 100 nm) でも、細胞内の詳細な構造の中で分子の分布あるいは分子集合体を明らかにするためには不足である。むしろこれらは、様々な試料の埋め込みやラベルを用いた免疫電子顕微鏡法により達成されるものである。

透過電子顕微鏡を用いた免疫電子顕微鏡法では、プリエンベディングあるいはポストエンベディング法により高い空間分解能が得られる (Griffiths et al., 1993)。しかしながら、これらの試料作製方法は、数日から1週間程度を要するとともに、各方法にはそれぞれに不都合な点がある (Maunsbach and Afzelius, 1998)。抗原性は、ポストエンベディング法では試料の取り扱いにより弱くなり、プリエンベディング法では立体障害 (steric hindrance) により弱くなる。さらに、脱水や樹脂包埋の工程により、細胞内の詳細な構造が影響を受ける可能性がある。樹脂包埋の影響を減らすための方法が検討されてきたが、その中で樹脂包埋工程の前に固定を行った後に水溶性レジンを用いる方法が開発された (Bennett et al., 1976)。

樹脂包埋をする場合は包埋後のどこかで薄切することが必須であるため、連続切片を形成する以外は観察できる領域が 20 – 700 nm の厚さに限定されていた (Rieder, 1981) (Sjostrand, 1958) (Toida et al., 1996)。あるいは、3次元的な再構成を行うためにトモグラフィが用いられてきた。(Hoenger and Bouchet-Marquis, 2011) (McEwen and Marko, 2001)。培養基板に平行な方向の薄切は、細胞のつながりや細胞末端構造などを調べるために重要であるが、広がったニューロンなどを観察する際には高いスキルが必要である。

環境セルを用いた TEM (Abrams and McBain, 1944) (Daulton et al., 2001) (de Jonge and Ross, 2011) (de Jonge et al., 2009) や環境セルを用いた SEM (EC-SEM) (Thiberge et al., 2004a) により、液体中の試料を観察できる。これらの方法では、試料は電子線を透過する薄膜でシールされたカプセルの中に配置された上で観察される。この活用は、電顕用のリガンドやアフィニティーラベルの分野にて、意義深いブレイクスルーをもたらした。

しかしながら、環境セルの小さな試料ホルダーは、培養できる細胞、および、おそらく実験中のラベルと洗浄の効率も限定している。環境セルと走査透過電顕 (STEM) を組み合わせ

せることにより、de Jonge らは COS7 細胞の EGF レセプターに結合した 10 nm 金粒子付きの EGF の分布を可視化するのに成功した(de Jonge et al., 2009)。さらに、Thiberge らは、ストレプトアビジンを結合した 0.8 nm のナノゴールドで HeLa 細胞のミトコンドリアをラベルし、銀で増感した後、環境セルと SEM を用いて観察した(Thiberge et al., 2004a)。

近年、correlative microscopy のために、環境セルと電顕を蛍光顕微法と組み合わせることが行われるようになってきた(Dukes et al., 2010) (Nishiyama et al., 2010)。また、蛍光像とより高分解能の電顕像を比較するために、蛍光体とナノゴールドの両方のラベル(FluoroNanogold™)を有する抗体やプローブ(Powell et al., 1997) (Robinson and Vandre, 1997)、蛍光する量子ドット(quantum dots) (Giepmans et al., 2005) (Smith and Nie, 2009)、および、蛍光コンバージョンプロトコル(Gaietta et al., 2002) などの 2 重ラベル法が開発されたきた。

大気圧 SEM により、correlative microscopy の応用が増えると期待される。多少の試料前処理は必要であるが、プリエンベディングにおける立体障害を除き、今日の免疫電顕の様々な問題を解決できる可能性がある。本研究では、大気圧 SEM でどのような画像が得られるか、および、特別なラベリング法の効率について調べた。また、各種の測定例により、大気圧 SEM の correlative microscopy としての有効性を検討した。既存の培養細胞を用いて、カルシウムセンサーである STIM1、2つの主要な細胞骨格タンパク質、および、小胞体(ER)におけるシャペロン活動に伴うジスルフィド結合形成触媒と名付けられた protein disulfide isomerase (PDI) (Kaiser et al., 2007)の局在を可視化した。さらに、初代培養した神経細胞のニューロンにおける成長円錐内の F アクチンとチューブリン、および、シナプスを可視化した。

3.4.2 実験方法

3.4.2.1 細胞培養と固定

COS7 と Hela 細胞は、10%の BSA と 100 $\mu\text{g/ml}$ のカナマイシンを含むダルベッコの修正イーグル培養液を用いて、直接薄膜ディッシュの SiN 薄膜上で、5% CO₂ インキュベーターを用いて 37°C で培養した。ヒト T 細胞である Jurkat E-6.1 細胞は、ポリ L リジン(シグマ)でプリコートした薄膜ディッシュの上で、10%の BSA と 100 $\mu\text{g/ml}$ のカナマイシンを含む RPMI 1640 培養液の中で培養した。

17 日目のマウス脳からの海馬細胞は、若干の修正をしたが、既報と同様の方法で培養した (Ebihara et al., 2003)。簡単に記載すると、EGFP-PSD-Zip45 (ホーマー1c)の遺伝子を導入したオスのマウスを野生のメスのマウスと交尾させ、17 日目の胎児を取り出し、蛍光解剖顕微鏡下で導入遺伝子が発現していることを確認した。海馬のニューロンは、10% FBS-DMEM 培養液の中で培養し、培養開始 4h から 1 日後に Gln (0.5 mM), B-27 (GIBCO)

を含む神経基本培養液 (Neurobasal medium; GIBCO)に交換した。薄膜ディッシュは、事前にポリ L リジンでコートした。

顕微鏡で観察する前に細胞を PBS で洗浄し、すぐに PBS 中の 4%パラホルムアルデヒド (PFA)を用いて室温で 15 分固定した。STIM1 の実験で用いた COS7 と Jurkat ヒト T 細胞については洗浄を省略した。培養温度に近い室温での固定 (洗浄)により、4°Cでの固定にみられる細胞の収縮を最小限にすることができる。細胞を穿孔しラベルした後に、室温で 1% グルタルアルデヒド(GA)に 15 分間浸漬することによりさらなる固定を実施した。

3.4.2.2 発現系の構築、遺伝子導入、および、Ca²⁺貯蔵庫の欠乏

C 末端に FLAG タグのついたマウスの cPMV-tag4B ベクター中の STIM1 は、森 泰生 博士(京都大学)にご提供いただいた。COS7 細胞は、薄膜ディッシュの上で直接培養し、リポフェクタミン 2000 (インビトロジェン)を用いた 0.45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の STIM1 コンストラクト(宿主細胞(ここでは COS7 細胞)内に異種遺伝子を発現するために遺伝子を切り貼りしたもの)を製造者のマニュアル通りに遺伝子導入し 24 時間培養した。Ca²⁺を欠乏させるために、最初に細胞を室温で 10 分間 PBS 中の 0.9 mM CaCl₂ で処理し、次に Ca²⁺イオンポンプの阻害剤である 0.5 mM のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid) と 2 μM のカプサイシン(Calbiochem)の中で PBS を溶媒として 15 分間処理した。コントロールの細胞は、0.9 mM の CaCl₂が入った PBS 中に保管した。処理の後で、細胞をすぐに PBS 中の 4%パラホルムアルデヒドで固定した。

3.4.2.3 免疫ラベル

固定細胞を、PBS 中の 0.1%あるいは 0.5%のトライトン X-100 で 15 分間穿孔した。洗浄した後、非特異的結合をブロックするため、PBS 中の 1%スキムミルクで 30 分間処理した。一次抗体でラベルするために、ブロッキング溶液に抗体あるいはファロイジンを加えて培養した。

抗体として、マウスの抗チューブリン抗体 (Invitrogen, ブロッキング溶液中に 0.5 – 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、マウスの抗 PDI 抗体 (Invitrogen, 1/200 – 1/400 に希釈)、および、ウサギの抗 STIM1 (C 末端)抗体 (シグマアルドリッチ、1/200 希釈)を用いた。F-アクチンをラベルするために、ファロイジン-ビオチン (シグマアルドリッチ、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を用いた。

2 次ラベルのために、細胞を PBS で洗浄した後、ウサギあるいはマウスの IgG に対する Fab'に 1.4 nm のナノゴールドと蛍光アレクサフルオロ色素の両方が結合(フルオロナノゴールド、ナノプローブ社、ブロッキングバッファーで 1/100 – 1/8000 に希釈)したヤギの抗体とともに保持した。蛍光の波長は、目的に応じて 488 nm あるいは 594 nm とした。ファロイジン-ビオチンラベルした試料は、1.4 nm のナノゴールドとアレクサ 594 の両方を結合したストレプトアビジン(フルオロナノゴールド、ナノプローブ社、1/50 希釈)とともに保持した。

他の蛍光体を用いた対比ラベルのために、試料を最初にマウスの抗 PDI 抗体で、次にアレクサフルオロ 488 を結合した抗マウス IgG (インビトロジェン、1/500-1/1000 希釈) の中で保持した。核の蛍光ラベルのために、25 ng/ml の DAPI で 15 分間染色した。抗体の結合は、蛍光顕微鏡で確認した。結合した抗体は、室温で 15 分間 PBS 中の 1% グルタルアルデヒドで固定した。

2 重蒸溜した水 (DDW) で洗浄した後、ナノゴールドを室温で 5 分間 GoldEnhance EM (ナノプローブ社) を用いて増感した。そして、細胞を大気圧 SEM で観察した。

3.4.2.4 重金属染色

エピトープの周囲の細胞部分を詳細に可視化するために、金でラベルした細胞を PBS 中の 2% タンニン酸で 20 分間処理した。DDW で洗浄した後、2% の酢酸ウランで 20 分間染色し、0.4% の水酸化ナトリウム中の 0.4% クエン酸鉛の中でさらに 5 分間染色した。

3.4.2.5 大気圧 SEM による観察

観察には、光顕・大気圧 SEM 複合システムを用いた。大気圧 SEM 観察の際には、ラジカル消去剤として 10 mg/ml (w/v) のアスコルビン酸を含む PBS の中に試料を配置した。ランディングエネルギーは 30 keV とした。10 万倍におけるピクセルレートは、0.06 ms/pixel である。

3.4.2.6 コンフォーカルレーザー顕微鏡による観察

コンフォーカル蛍光画像は、488 nm のアルゴンイオンレーザーを光源にフルオロビューコンフォーカルレーザー走査顕微鏡 (オリンパス) を用いて測定した。オプティカルスライスのステップは、0.44 μm とした。20 倍の水浸対物レンズ (NA: 1.0) を用いた。

3.4.3 結果および考察

3.4.3.1 チュブリンをターゲットにした溶液中の免疫ラベル

採用した 2 重ラベルを最適化するため、COS7 細胞に豊富にあるマイクロチュブルを可視化することを試みた。薄膜ディッシュの上で直接培養した細胞を固定し、穿孔し、抗チュブリンの一次抗体、そして蛍光体と 1.4 nm のナノゴールドを結合した二次抗体でラベルした (図 3.4.1) (Powell et al., 1997)。二次抗体がついたことを蛍光顕微鏡で確認 (図 3.4.2 (a)) した後に、オートメタログラフィー (autometallography) を用いた金増感によりナノゴールドの直径を増加した (図 3.4.1, 図 3.4.2 (b)-(d)) (Powell and Heinfeld)。ラベルしたマイクロチュブルは光学顕微鏡を用いて緑色の蛍光を認識した後で (図 3.4.2 (a))、低倍率の大気圧 SEM で細胞の中心から周辺に向けた白いラインとして簡単に観察することができた (図

3.4.2 (b))。より高い倍率では、ラインはビーズ状になり、並んだ金の堆積物により形成されていた(図 3.4.2 (c), (d))。細胞質における孤立した堆積物は、自由なチューブリン分子、あるいは、非特異的な信号と思われる。大気に開放された薄膜ディッシュにより、効率的なラベリングと洗浄が可能であるため、これらのステップは数時間で完了できる。

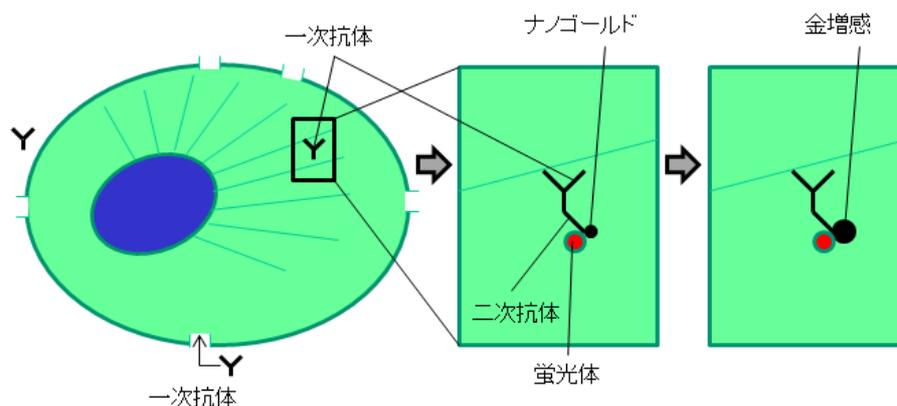


図 3.4.1 2重ラベルを用いた免疫染色法の模式図。コート付あるいは無の薄膜ディッシュの上で細胞を培養し、固定し、トライトン X100 で穿孔した。次に、一次抗体でエピトープをラベルした。この一次抗体を、さらに蛍光とナノゴールドの両方が結合した Fab'の二次抗体でラベルした。蛍光を光顕で観察した後、抗体をグルタルアルデヒドで再度固定し、ナノゴールドを金増感で大きくした。このようにして、蛍光観察した試料を大気圧 SEM で観察した。

次に、上記の実験を、免疫ラベルで良く用いられる銀増感で行った(Takizawa et al., 1998) (図 3.4.2 (e)-(h))。比較をすると、金の方が銀の場合よりもシャープで強い信号が得られた。BSE 強度は試料の原子番号と密度に依存するが、金の方が原子番号と密度が大きいためと推測される。また、Powell と Hainfeld (2002)が報告したように、背景信号も金の方が少なかった(Powell and Hainfeld) 。これらの理由から、この後の実験で金増感を用いることにした。

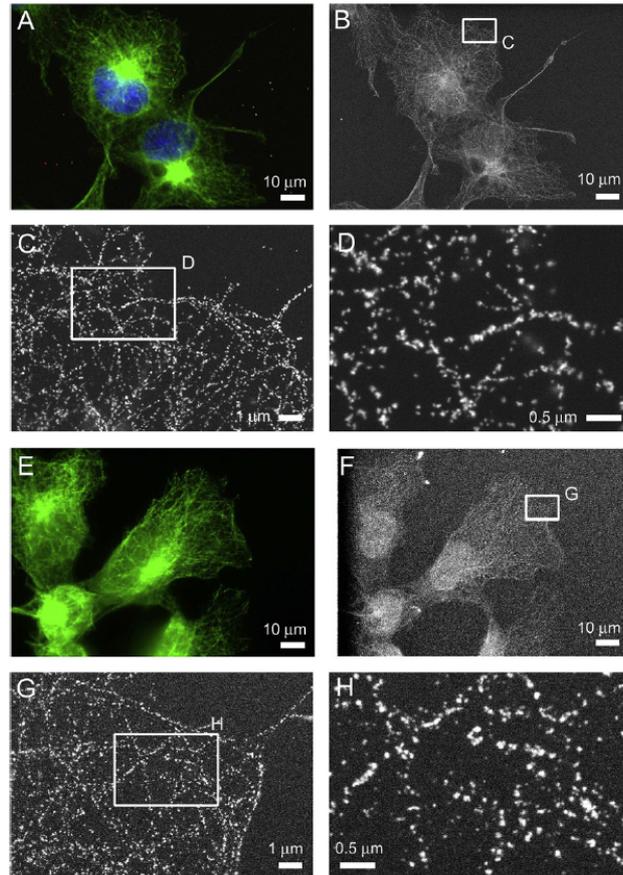


図 3.4.2 光顕と大気圧 SEM で観察したマイクロチューブルの分布。COS7 細胞を抗チューブリン抗体でラベルした上で、アレクサ 488 (緑)とナノゴールド(白)の両方を結合した二次抗体でラベルした。(a) 蛍光顕微鏡像。核を DAPI (青)で染色した。(b) 金増感した後の大気圧 SEM 像。細胞質におけるマイクロチューブル繊維を明瞭に観察できた。(c) (b)の四角領域の拡大図。エピトープを、バックグラウンドノイズの少ない金の堆積物として観察できた。(d) (c)の四角領域の拡大像。エピトープは、並んだビーズ状に観察された。(e-h) 上記観察を、銀増感で行った実験結果。(e) DAPI 染色のない蛍光顕微鏡像。(f-h) 大気圧 SEM 像。金増感による堆積の方が、銀増感の場合と比較して、均一でありバックグラウンドが低かった。図は許可を得た上で転載: ref (Maruyama et al., 2012), copyright 2012 Elsevier。

3.4.3.2 2重タグがついたプローブの細胞浸透性

比較的大きな蛍光体とナノゴールドによる免疫ラベルは、細胞の膜システムを通じた拡散が不十分なために、細胞表面近傍が優先的にラベルされる可能性がある。固定、穿孔した COS7 細胞で均一なラベルが実現されていることを示すために、コンフォーカル顕微鏡を用いて、フルオロナノゴールドでラベルした場合、および、より小さな蛍光ラベルのみの場合を比較した(図 3.4.3 (a), (b))。いずれの実験においても、蛍光ラベルされたフィラメ

ントが細胞内の各レイヤーに同じように分布しており、細胞内においていずれのプロープも十分に拡散していることが示唆された。

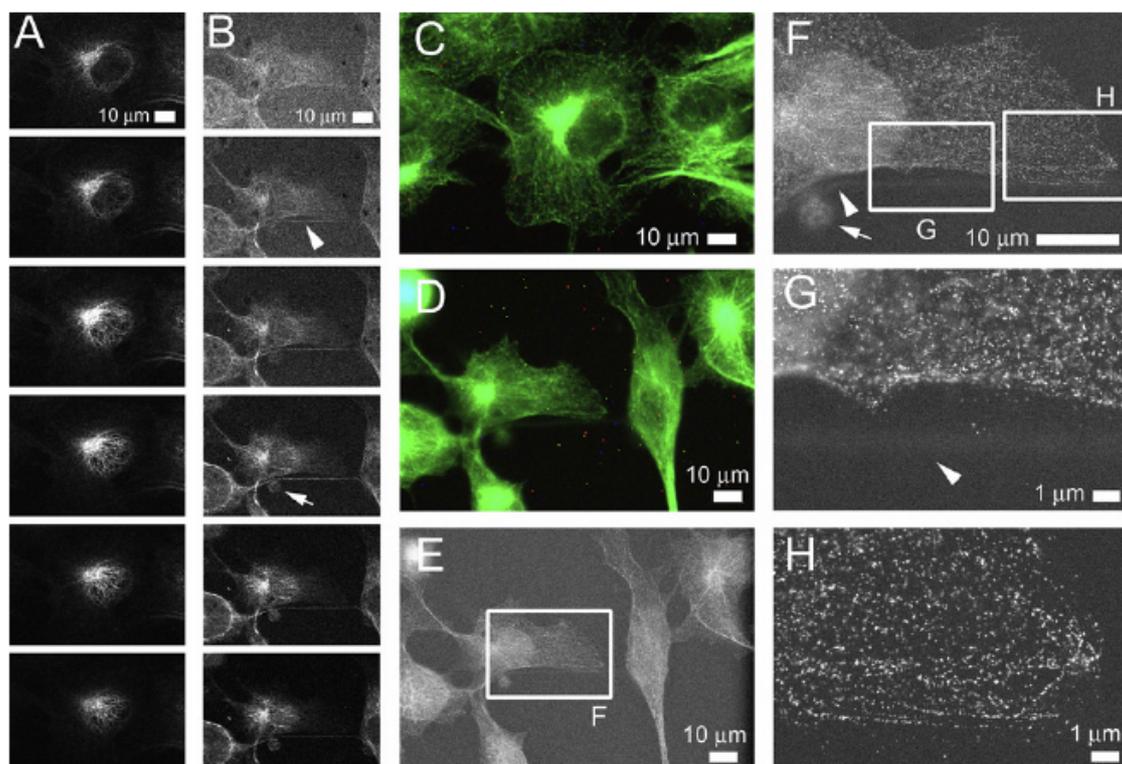


図 3.4.3 細胞内における 2 重タグのついた抗体の 3 次元的な分布。2 重タグのついた比較的大きな抗体が 0.1% のトライトン X-100 で穿孔した穴を通して核近傍のエピトープに到達できることを確認するため、COS7 細胞を抗チューリン抗体でラベルした後、2 重タグ(アレクサ 488 とナノゴールド)のついた二次抗体、および、蛍光タグのみ(アレクサ 488)がついた二次抗体でラベルした。(a,b) 細胞の基底(第一列)からトップ(第六列)の共焦点顕微鏡像。それぞれのスライスの厚さ(z のステップに対応)は $0.44 \mu\text{m}$ である。(a) 蛍光タグのみがついた二次抗体でラベルしたもの。(b) 蛍光とナノゴールドの 2 重タグがついた二次抗体でラベルしたもの。細胞内の各層で、2 種類の異なる二次抗体の分布は類似であった。(b) の矢印頭と矢印は、それぞれ SiN 膜から離れた所にある細長いあるいは丸まったマイクロチューブルに対応する。(c,d) 標準的な蛍光顕微鏡で観察した細胞全体。(c) 蛍光タグのみがついた二次抗体でラベルしたもの。(d) 蛍光とナノゴールドの 2 重タグがついた二次抗体でラベルしたもの。(c) と (d) で、エピトープに結合した二次抗体の分布は類似であった。(e) (d) に対応する大気圧 SEM 像。(f) (e) の四角領域の高倍率像。(g,h) (f) の四角領域の高倍率像。(f,g) の矢印頭は(b) の矢印頭に対応し、SiN 薄膜から離れた所にあるマイクロチューブルである。(f) の矢印は(b) の矢印に対応し、SiN 薄膜から離れた所にあるマイクロチューブルが丸まった構造物である。図は許可を得た上で転載: ref (Maruyama et al., 2012), copyright 2012

Elsevier。

さらに、図 3.4.3 (f)-(g)に示すように、大気圧 SEM で基板の少し上にある 2つのマイクロチューブル構造（白い矢印頭と矢印）を観察できる。これらは図 3.4.3 (b)の 2 段目と 4 段目の列にある白い矢印頭と矢印に対応する。明瞭な丸い構造（矢印）は、図 3.4.3(b)の上の 3 つの画像を除いて全てで観察できる。これは、細胞の底から 1.3 μm 厚さの位置に対応する。従って、大気圧 SEM 像(図 3.4.3 (f)-(g))とコンフォーカル顕微鏡像(図 3.4.3 (b))の比較により、ランディングエネルギーが 30 keV の大気圧 SEM 観察で、少なくとも 1.3 μm 以上の深さまで観察できることがわかった。これは、3.2.3.4 に記載したランディングエネルギーが 20 keV の場合においても、SiN 薄膜から厚さが 2-3 μm の位置を観察できるという実験結果と矛盾しない。予想されたように、薄膜ディッシュの SiN 薄膜から離れた位置における構造からの信号はぼけているのに対し(図 3.4.3 (f), (g))、薄膜に近いところの構造からの信号はクリアである (図 3.4.3 (h))。

3.4.3.3 アクチンフィラメント

固定・穿孔した HeLa 細胞内の F-アクチンを、免疫プローブではなく、ビオチンタグをつけたファロイジンでラベルした。ビオチンを、さらにナノゴールドと蛍光タグがついたストレプトアビジンでラベルした。光顕による蛍光シグナルの観察で、細胞の中心に大きな F-アクチンのバンドルがあり、それが細胞の周囲に向かって伸びていた(図 3.4.4 (a))。これは、ストレスファイバーと思われる。また、細胞の周囲には、F-アクチンの細いヒモがあった(図 3.4.4 (a))。同様な構造は同じ倍率で大気圧 SEM でも観察可能であり(図 3.4.4 (b))、さらに高い倍率で取得した画像からより詳細な構造が認識された(図 3.4.4 (c)-(f))。すなわち、太いバンドルのまわりのデリケートな構造が観察できて(図 3.4.4 (c), (d))、また、細胞周囲の細いフィラメント構造も観察できた(図 3.4.4 (e), (f))。

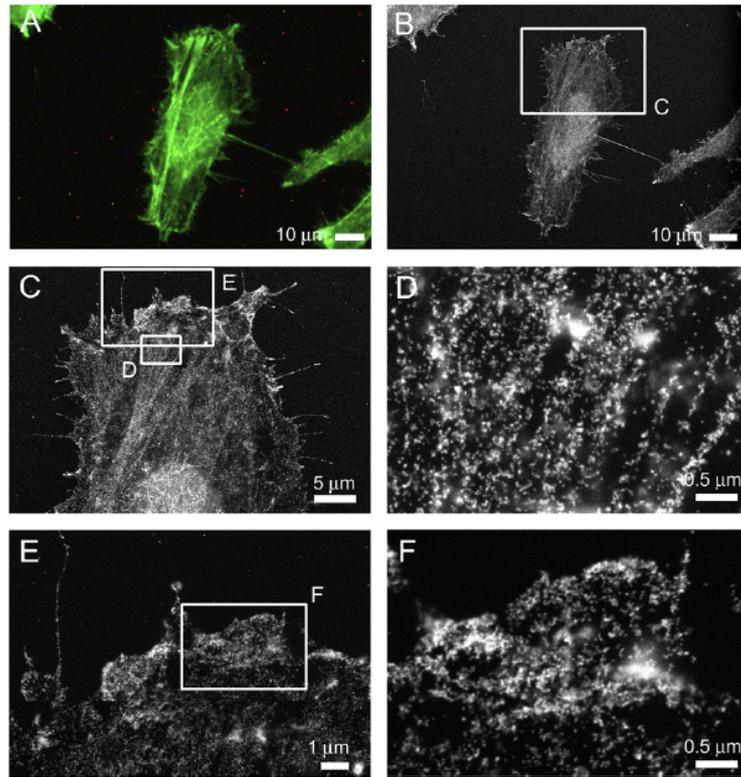


図 3.4.4 フィラメント状のアクチン(F アクチン)の光顕と大気圧 SEM 像。HeLa 細胞の F アクチンを、ファロイジン-ビオチンでラベルし、さらにアレクサ 488 とナノゴールドが結合したストレプトアビジンでラベルした。(a) 細胞の蛍光顕微鏡像。アクチンストレス繊維のバンドルが顕在化された。(b) 細胞の大気圧 SEM 像。(c) (b)の四角領域の高倍率像。(d) (c)の四角領域の高倍率像。アクチン繊維が観察された。これらは、ファロイジンの低いラベル効率のため、ドット線として示された。(e,f) 大気圧 SEM で観察した細胞端近くの F アクチンの繊維構造。図は許可を得た上で転載: ref (Maruyama et al., 2012), copyright 2012 Elsevier.

3.4.3.4 PDI を用いた小胞体の観察

次に、込み入った構造の小胞体を可視化することを試みた。小胞体を、小胞体のルーメン(ER lumen) に局在することが知られている protein disulfide isomerase (PDI) に対するマウスの抗体でラベルし(Kaiser et al., 2007)、さらに2重タグのついたマウス IgG に対する二次抗体でラベルした。光顕観察では、小胞体は核の周囲で豊富であり、細胞の周辺領域にはあまりなかった(図 3.4.5 (a))。低倍率の大気圧 SEM 像からは類似の情報が得られるが(図 3.4.5 (b))、高倍率の大気圧 SEM 像では細胞質に広がるネット状の構造を明らかにすることができた(図 3.4.5 (c))。また、ネット構造の細かい分岐を細胞の周囲で観察できた(図 3.4.5 (c), (d))。これらのラベルは可溶性のタンパク質である小胞体のルーメンに局在するため、これらの結果はトライトン X-100 を用いた COS7 細胞の穿孔によりラベルが細胞内を

通って小胞体に入ることを示唆する。

細胞をさらに重金属で染色した。2%タンニン酸、2%酢酸ウラン、そして最後に 0.4%のクエン酸鉛を用いた(図 3.4.5 (e), (f))。大気圧 SEM 観察では、図 3.4.3 (g)に示すように金属染色は弱いコントラストで外縁があいまいであるが (白の矢印頭)、金の堆積物は高いコントラストでシャープであるとともに外縁がはっきりとしている (白矢印)。ただし、金の堆積物が薄膜ディッシュの SiN 膜から離れた位置にあると、ぼやけて見える(例えば、図 3.4.3 (g) 白の矢印頭)。細胞の外形が重金属の対比染色で明瞭に可視化され、核が強く染色された(図 3.4.5 (e))。増感した金粒子で小胞体を識別することが可能であるとともに、それを取り囲む入り組んだ構造も観察できた(図 3.4.5 (f))。

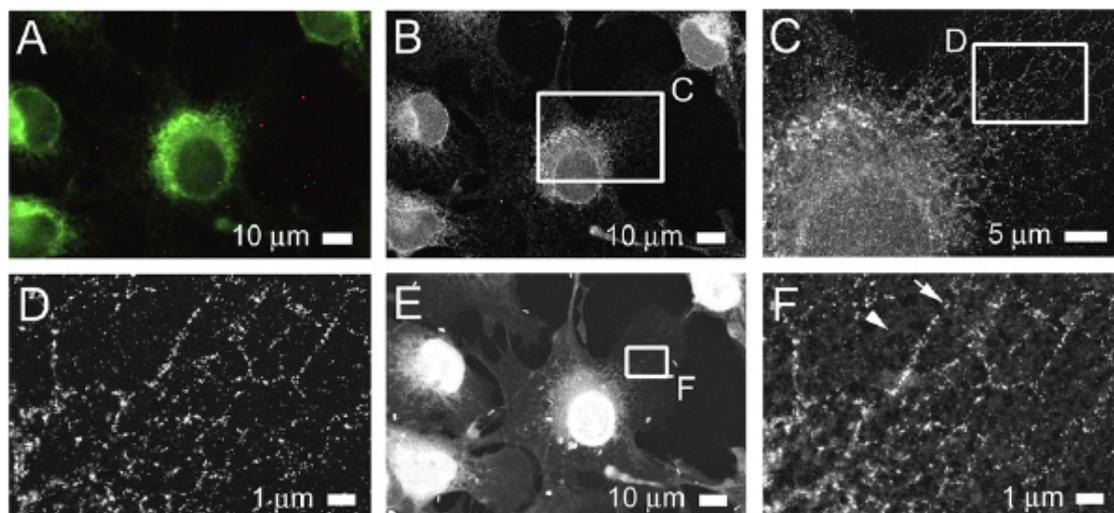


図 3.4.5 光顕と大気圧 SEM で観察した小胞体。COS7 細胞を抗 PDI 抗体でラベルし、さらに 2 重タグのついた二次抗体でラベルした。(a) ラベルした細胞の光顕像。(b) 金増感した後の大気圧 SEM 像。(c) (b)の四角領域の高倍率像。(d) (c)の四角領域のより高倍率な像。細い網の目のような(web-like)構造が観察された。(e) (b)の画像を取得した後に、酢酸ウランとクエン酸鉛で対比染色を行った細胞の大気圧 SEM 像。細胞の端を観察できる。(f) (d)に対応する対比染色後の大気圧 SEM 像。矢印は金の堆積物、矢印頭は重金属染色を示す。図は許可を得た上で転載: ref (Maruyama et al., 2012), copyright 2012 Elsevier。

3.4.3.5 Ca^{2+} の貯蔵による STIM1 分子の集合

STIM1 は、小胞体のカルシウム放出により活性化されるチャネル(CRAC: the calcium-release-activated calcium)の Ca^{2+} のセンサー部分である。 Ca^{2+} が欠乏すると、プラズマ膜に結合している Orai1 と高次の複合体を形成し、細胞表面近傍の点に集まると信じられている。STIM1 の集合は、蛍光顕微鏡により円形の集点として観察されてきた(Baba

et al., 2006) (Liou et al., 2005) (Mercer et al., 2006)。STIM1 分子を COS7 細胞に発現させた上で、細胞をカプサイシンがある状態とない状態で培養した。カプサイシンは、Ca²⁺ポンプの阻害剤で Ca²⁺の蓄積を欠乏させる。

細胞を固定し、穿孔し、STIM1 に対する抗体でラベルした後に、二重のタグがついた 2 次抗体でさらにラベルした。Ca²⁺の貯蔵庫が欠乏していなければ、STIM1 はネット的な構造でまばらに分散していた(図 3.4.6 (a), (b))。これは、PDI に対する抗体を用いた比較ラベルにより示された小胞体の分布から予測されたものである。

より高い倍率での画像から、小胞体の網目構造の太いチューブと細い枝の両方に STIM1 が分布していることが示唆された。(図 3.4.6 (c))。これは、対比染色により明らかにされた小胞体とそれを取り囲む構造により確認された。(図 3.4.6 (e), (f))。

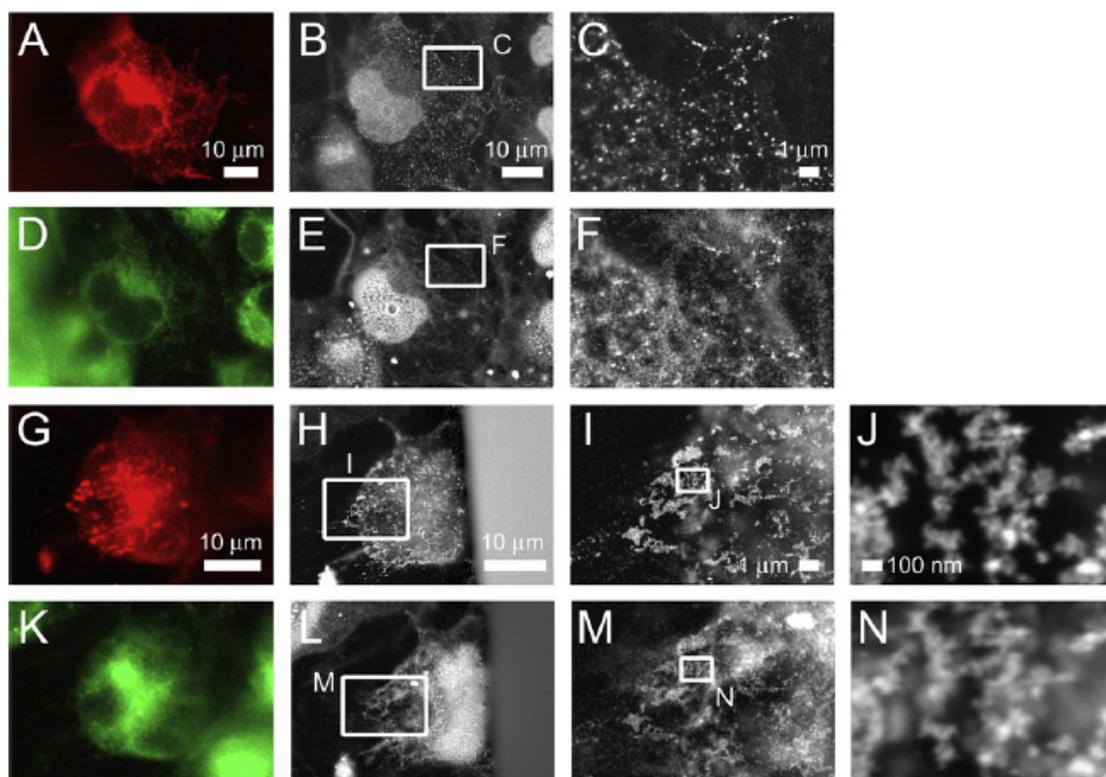


図 3.4.6 Ca²⁺の貯蔵庫の欠乏に対応した STIM1 の動的な再配置。STIM1 を発現させた COS7 細胞について、カプサイシン処理を行った上で、あるいは、行わずに固定した。これらの細胞を穿孔し、抗 PDI のマウス抗体、および、抗 STIM1 ウサギ抗体でラベルした。さらに、アレクサ 488(緑)が結合した抗マウス IgG 抗体、および、アレクサ 594(赤)とナノゴールドが結合した抗ウサギ IgG 抗体を用いてラベルした。(a-f) カプサイシン処理を行っていない細胞の光顕像および大気圧 SEM 像。(a) 蛍光顕微鏡による STIM1 の分布。(d) 蛍光顕微鏡による PDI の分布。(b) (a)の視野に対応する大気圧 SEM 像。(c) (b)の四角領域の高倍率像。(e,f) それぞれ(b,c)の視野に対応する対比染色を行った後の大気圧 SEM 像。対

比染色は、(b,c)の観察後、酢酸ウランとクエン酸鉛で行った。(g-n) カプサイシン処理を行った細胞の光顕像および大気圧 SEM 像。(g) 蛍光顕微鏡による STIM1 の分布。(k) 蛍光顕微鏡による PDI の分布。(h) (g)の視野に対応する大気圧 SEM 像。(i) (h)の四角領域の高倍率像。(j) (i)の四角領域のより高倍率な像。(l-n) それぞれ(h-j)の視野に対応する対比染色を行った後の大気圧 SEM 像。対比染色は、(e,f)と同様に行った。図は許可を得た上で転載: ref (Maruyama et al., 2012), copyright 2012 Elsevier。

貯蔵庫が欠乏しているときは、これまでに報告されているように、STIM1 分子は蛍光の大きなスポットとして小胞体の上に観察された(図 3.4.6 (g)), (Liou et al., 2005)。大気圧 SEM は、点が STIM1 の複数の焦点を持った分布であることを示した。予測とは異なり、集点は単なる球形の凝集ではなく、金の堆積物が示すようにベルトのような一次元のヒモであった。(図 3.4.6 (h)-(j))。これらのヒモは、しばしば互いに繋がっており、幅 100 nm, 長さが最大 2 μm の様々な形の微細なネットワークを形成していた(図 3.4.6 (j))。対比染色により、小胞体の分布とエピトープまわりの構造が可視化された(図 3.4.6 (l)-(n))。相関蛍光顕微法は、 Ca^{2+} 貯蔵庫が欠乏している場合とそうでない場合で、PDI が同じように細胞内で分布していることを示した (図 3.4.6 (d), (k))。

上記の実験において、STIM1 の過剰発現による影響の可能性を避けるために、ヒト T 細胞である Jurkat においても固有な STIM1 の局在を観察した。細胞は COS7 の場合と同様に処理をしたが、対比染色は行わなかった。貯蔵庫が空の場合、STIM1 は網目状のパターンに分布し(図 3.4.7 (a)-(d))、COS7 細胞に過剰発現させた STIM1 の場合と類似であった。貯蔵庫の欠乏に反応して、光顕では STIM1 分子が細胞内でほぼ全て一点に凝集していた(図 3.4.7 (e))。凝集は、大気圧 SEM でより詳細に観察することができて(図 3.4.7 (f)-(h))、中間的な倍率で焦点のカラム(円柱、縦列)が明らかにされた(図 3.4.7 (g))。これらのカラムの中で、金の堆積物は球状に凝集するだけでなく、多くのターンを持つ一次元のヒモのようであった(図 3.4.7 (h))。凝集のパターンは、STIM1 を過剰発現させた COS7 細胞の場合と類似であった(図 3.4.6 (j))。

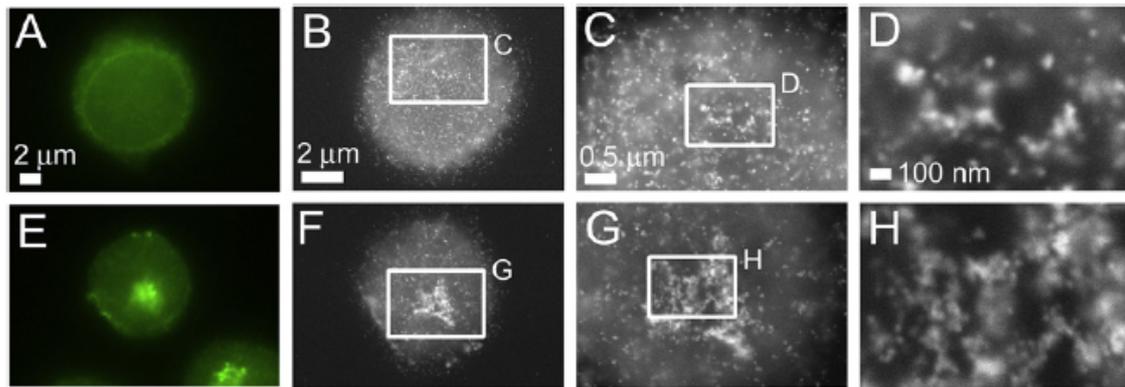


図 3.4.7 遺伝子操作していない Jurkat T 細胞における Ca^{2+} の貯蔵庫の欠乏に対応した STIM1 の動的な再配置。Jurkat T 細胞をカプサイシン処理した上で、あるいは、処理せずに固定した。これらの細胞を穿孔し、抗 STIM1 抗体でラベルした。さらに、アレクサ 488(緑)とナノゴールドが結合した二次抗体を用いてラベルした。(a-d) カプサイシン処理を行っていない細胞の光顕像および大気圧 SEM 像。(a) 蛍光顕微鏡による STIM1 の分布。(b) (a) の視野に対応する大気圧 SEM 像。(c) (b) の四角領域の高倍率像。(d) (c) の四角領域のより高倍率な像。(e-h) カプサイシン処理を行った細胞の光顕像および大気圧 SEM 像。(e) 蛍光顕微鏡による STIM1 の分布。(f) (e) の視野に対応する大気圧 SEM 像。(g) (f) の四角領域の高倍率像。(h) (g) の四角領域のより高倍率な像。 Ca^{2+} 貯蔵庫の欠乏に対応して、遺伝子操作を行っていない T 細胞の STIM1 タンパク質は、球形に集積するだけでなく、多くのターンの持つ一次元状に集積した。集積のパターンは、STIM1 を過剰発現させた COS7 の場合と類似であった。図は許可を得た上で転載: ref (Maruyama et al., 2012), copyright 2012 Elsevier.

3.4.3.6 初代培養したニューロンにおける成長円錐の F アクチンとチューブリン

薄膜ディッシュは CO_2 インキュベーターの中に配置することにより、環境セルと比較して体積が大きくかつ大気に解放されているため、ニューロンなどのデリケートな細胞を安定に培養できる。成長円錐における F アクチンとチューブリンの詳細な局在を決定するために、ホーマー1c に EGFP(蛍光タンパク質)を組み込んだ遺伝子改変マウスから海馬のピラミダルニューロンを分離し、ポリエルリジンをコートした薄膜ディッシュの上で培養した。

遺伝子改変マウスにおける蛍光タンパク質を組み込んだホーマー1c は、遺伝子を改変していないワイルドタイプのホーマー1c タンパク質複合体と同じ位置に集積することが知られている(Ebihara et al., 2003) (Gasperini et al., 2009)。位相差顕微鏡、蛍光顕微鏡、大気圧 SEM で細胞を観察した(図 3.4.8)。最初に蛍光顕微鏡を用いて、F アクチンあるいはチューブリン(Alexa 594: red)と EGFP-ホーマー1c (green)の関係を調べた(図 3.4.8 (b),(c)に F アクチンを示し、(g),(h)にチューブリンを示す)。葉状仮足の多い *in vitro* で培養した 4 日目の若いニューロンにおける成長円錐(図 3.4.8 (a), (f))では、F アクチンは葉状仮足全体に分布し

ており(図 3.4.8 (b)と(c)の明るい赤)、そこではマイクロチューブルが軸索の骨格に集中していた(図 3.4.8 (g), (h))。ホーマー1c は、これら2つの領域の間の緑のバンドに集中していた(図 3.4.8 (c))。大気圧 SEM の高倍率観察では、F アクチンがホーマー1c の局在しているバンドから葉状仮足の端まで広がっているのがわかり(図 3.4.8 (d))、これは蛍光顕微鏡の画像(図 3.4.8 (c))に良く一致する。全体的な印象として、フィラメントは自転車のスポークのように放射状であり、それらの間ではシグナルは弱かった(図 3.4.8 (e))。F アクチン分布の一部はホーマー1c に重なっており、そこでは黄色の蛍光となっていた。大気圧 SEM によるアクチン繊維の配置(図 3.4.8 (e))から、アクチンのスポークはおそらくホーマー1c のバンドを垂直に横切っていると思われる。

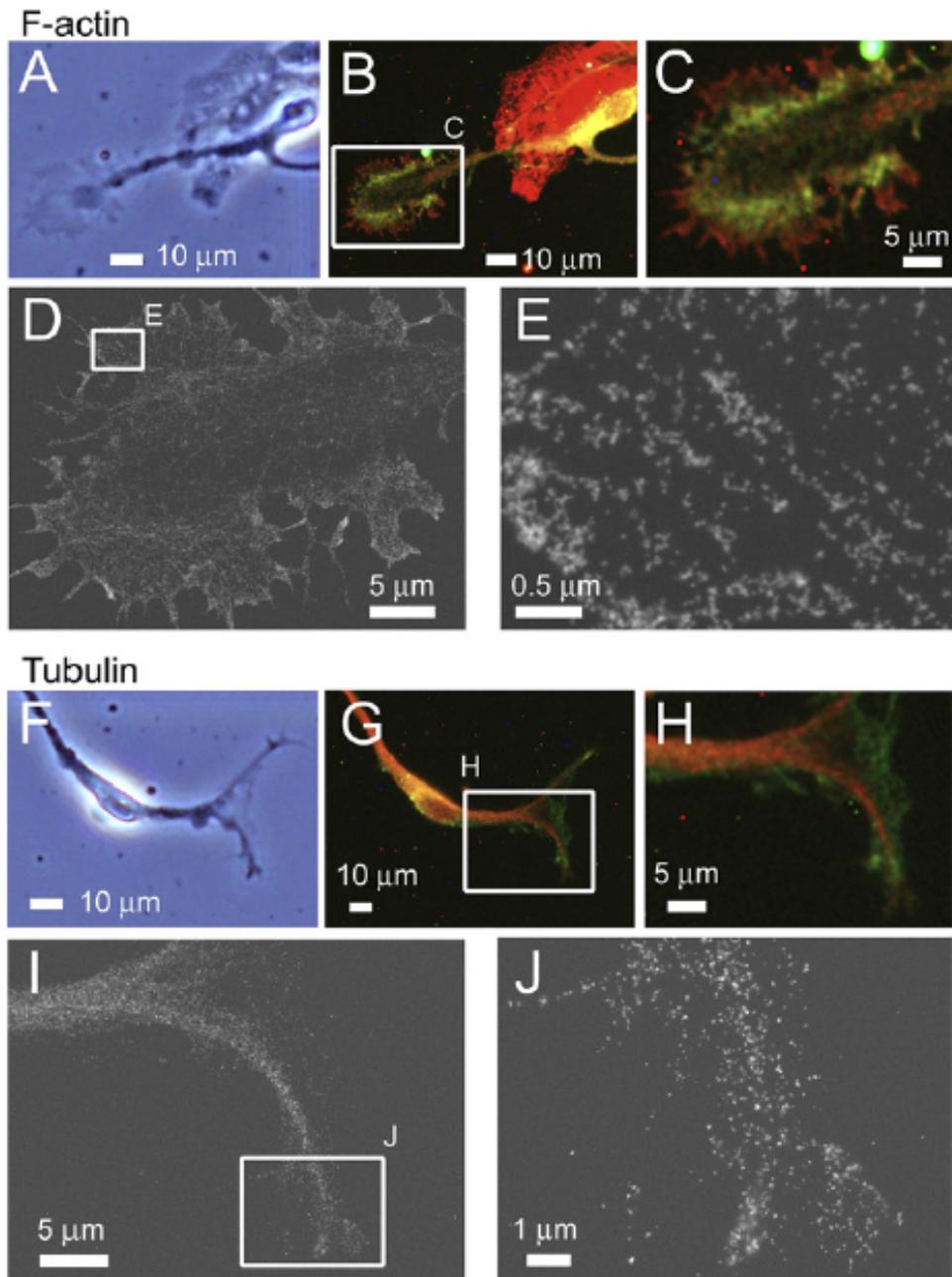


図 3.4.8 海馬の初代培養細胞の成長円錐における F アクチンとチューブリンの分布およびホーマー1c との関係。(a,f) EGFP(緑色蛍光タンパク質)をホーマー1c に発現させた 4 日目の遺伝子改変マウスの成長円錐の位相差光顕像。(b-e) ファロイジン-ビオチンでラベルし、さらにアレクサ 594 とナノゴールドを結合したストレプトアビジンで二次ラベルした F アクチンの分布を示す光顕像および大気圧 SEM 像。(b) 蛍光顕微鏡で観察した F アクチンの概略分布。(c) (b)の四角領域の高倍率像。ファロイジンによるラベル(赤)では、成長円錐の周囲(葉状仮足)および神経突起の骨格に F アクチンが観察された。ホーマー1c(緑)は、薄板のより中央に近い領域に F アクチンとともに存在した(黄緑)。(d) 大気圧 SEM で観察した

F アクチンの分布。(e) (d)の四角領域の高倍率像。F アクチンのバンドルが、薄板の周囲方向に伸びていた。(g-j) 抗チューブリン抗体、および、アレクサ 594 とナノゴールドを結合した二次抗体でラベルしたチューブリン分布の光顕像と大気圧 SEM 像。(g) 蛍光顕微鏡で観察したチューブリンの概略分布。(h) (g)の四角領域の高倍率像。成長円錐の骨格に、チューブリンの蛍光(赤)が観察される。ホーマー1c(緑)は、チューブリン骨格のまわりに集まっている。(i) 大気圧 SEM で観察したチューブリンの分布。(j) (i)の四角領域の高倍率像。チューブリンの幹は、マイクロチューブルの束である。チューブリンの幹のまわりに、金粒子の堆積が少し観察される。図は許可を得た上で転載: ref (Maruyama et al., 2012), copyright 2012 Elsevier.

一方上記したように、マイクロチューブルは成長円錐の周辺部には分布しておらず、細胞の本体から円錐の首の部分に伸びるバックボーンに蓄積しており、それは散乱したホーマー1c タンパク質に囲まれている (図 3.4.8 (g), (h))。大気圧 SEM では、マイクロチューブルは繊維の束として可視化される(図 3.4.8 (i))。また、バックボーンの周囲には孤立したチューブリン分子が存在していた(図 3.4.8 (j))。ただし、これらの信号が、結合してないタンパク質やバックグラウンドノイズに起因しているのではなく、繊維からのものと断定することは難しい。

3.4.3.7 シナプスのFアクチンとチューブリン

2週間の培養の後にシナプスが形成され(図 3.4.9 (a), (e))、樹状突起が太い神経突起として認識された。この神経突起には、シナプスのスパインにあるシナプス後肥厚部 (postsynaptic density (PSD)) に EGFP の緑の点がついている (図 3.4.9 (b), (f))。これらは、ホーマー1c/EGFP の蛍光をシナプス後マーカー (postsynaptic marker)として用いられることを示唆する。その他の ホーマー1c からの信号はずっと弱かった。F アクチンは、樹状突起の周囲に蓄積した。例えば、ホーマー1c のない糸状仮足的な構造(図 3.4.9 (b), 四角 C)、および、ホーマー1c が蓄積した近くのシナプス的な構造(図 3.4.9 (b), 四角 D)に蓄積した。大気圧 SEM ではより高い空間分解能が得られるため、糸状仮足やシナプスにおける F-アクチンの局在をより正確に可視化できる。細い糸状仮足的な分岐は F-アクチンバンドルからなり (図 3.4.9 (c))、シナプスのボタンおよびスパインはアクチンのより複雑な構造の骨組みの上にあった(図 3.4.9 (d))。これに対し、マイクロチューブルは樹状突起の幹の部分に密なファイバーとして蓄積されており、スパインや糸状仮足への蓄積はほとんど観察されなかった(図 3.4.9 (e), (f))。マイクロチューブルは、ホーマー1c の蓄積から完全に離れていた。すなわち、赤と緑は画像において離れていた。図 3.4.9 (f)における四角の上部領域の黄色は、おそらく樹状突起の上部に直接ホーマー1c が蓄積していることによると思われる。大気圧 SEM により観察された金の信号は、多数のマイクロチューブルからなるバンドルがそれぞれの樹状突起の幹において骨格(backbones)を形成していることを示唆する(図 3.4.9

(g)-(k)。これらのマイクロチューブルのバンドルは直径がそれぞれ異なるようであり、樹状突起のサイズに比例して大きくなることが明らかであった。マイクロチューブルのバンドルに沿った強い緑の蛍光は、軸索 (axon)が樹状突起 (dendrite)とシナプスを形成する場所を示す(図 3.4.9 (f))。

大気圧 SEM によるこれらの領域(図 3.4.9 (f)の四角の中の緑)の観察により、前シナプスと後シナプスのシナプス末端において、チューブリンの蓄積が少ないことが明らかになった(図 3.4.9 (g))。重金属を用いた対比染色で、弱いチューブリンの信号を取り囲むスパイン状の外形、および、左側から軸索がマイクロチューブルの束に接合するのを観察できた(図 3.4.9 (h))。さらに、細い内部のチューブリン繊維をマーカーとして、電顕だけで観察できる極めて細い軸索を見出した(図 3.4.9 (i)の矢印頭)。この軸索(図 3.4.9 (i)と(j)の矢印)は、図 3.4.9 (f) (白の四角 i)の蛍光顕微鏡で示される樹状突起(図 3.4.9 (i)と(j)の矢印)に達しており、シナプスを形成していた。

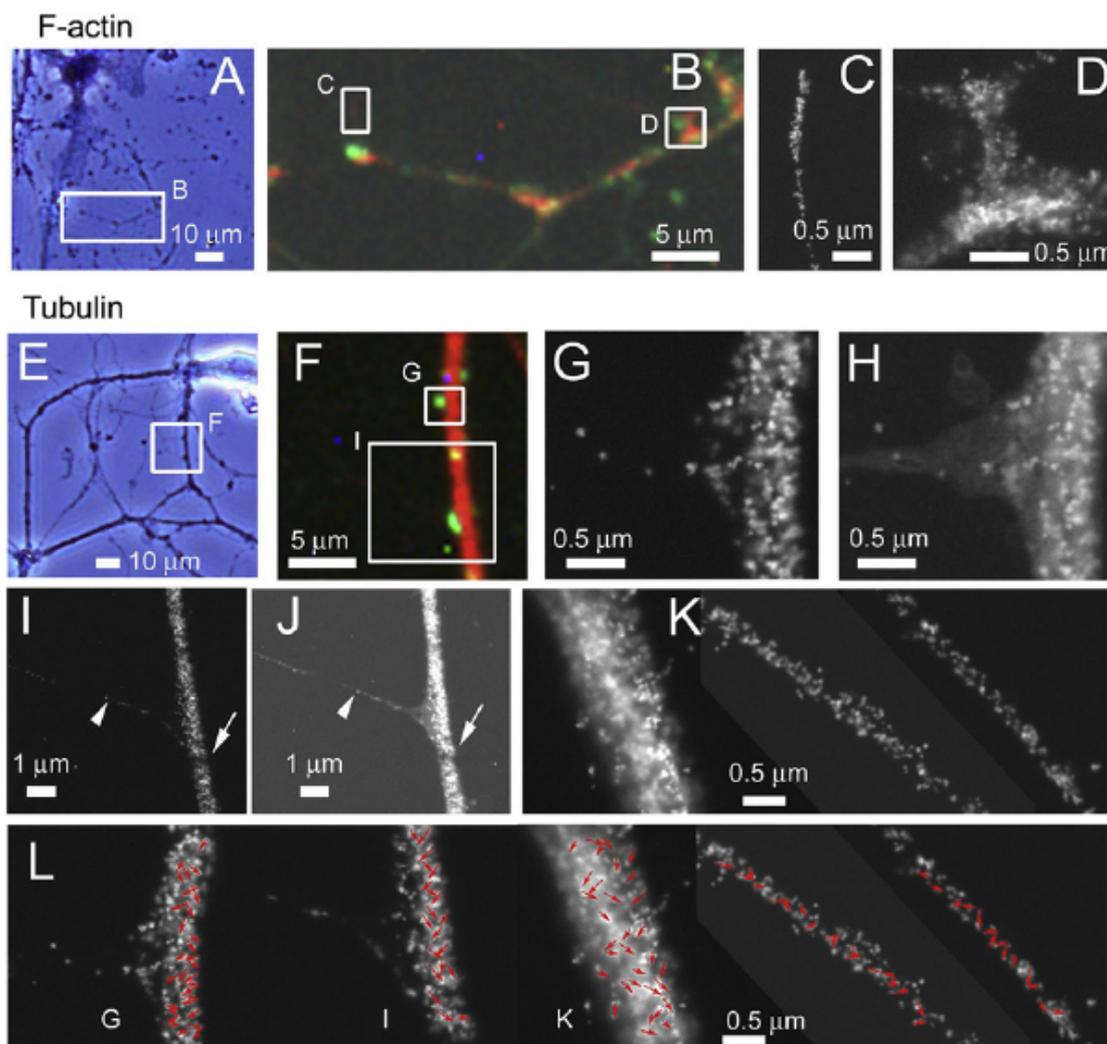


図 3.4.9 シナプスにおける F アクチンとチューブリンの分布。海馬の初代培養細胞を薄膜ディスプレイ上で2週間行った後に固定した。(a,e) 位相差像。成長したシナプスが形成されていた。(b) (a)の四角領域の蛍光顕微鏡像。細胞内では、F アクチン(赤)は糸状仮足(白の四角 c)とシナプス後肥部(PSD; 白の四角 d)に観察された。ファロイジンでラベルした蛍光顕微鏡像では、糸状仮足やスパイン内の F アクチンの細かい構造を解析することはできなかった。(c) 糸状仮足内の F アクチン分布の大気圧 SEM 像((b)の四角 c に対応)。(d) ボタンおよびスパインにおける複雑な F アクチンのネットワークを示す大気圧 SEM 像((b)の四角 d に対応)。(f) (e)の四角領域の蛍光顕微鏡像。ホーマー1cの蓄積(緑)は後シナプスのマーカーであり、シナプスが形成されていることを示す。樹状突起の幹にチューブリン(赤)が蓄積されているが、ホーマー1c(緑)で示されているスパインには蓄積されていない。(g) (f)の四角 g に対応する大気圧 SEM 像。シナプス領域に、少しチューブリンがあることが示された。(h) (g)に対応する領域について、酢酸ウランとクエン酸鉛を用いて対比染色を行った後の大気圧 SEM 像。シナプスの外観(スパインとボタン)が顕在化された。(i) (f)の四角 i の領域の大気圧 SEM 像。蛍光顕微鏡では観察できない細いマイクロチューブル (矢印頭で示す軸索)が矢印で示す樹状突起にアプローチし、シナプスを形成している。(j) (i)に対応する領域を、酢酸ウランとクエン酸鉛を用いて対比染色を行った後に大気圧 SEM で観察した。軸索とシナプスの外観が示された。(k) 樹状突起の骨格の高倍率像。金の堆積が螺旋状に並んでいる。(l) (g, i, k)のマイクロチューブルのねじれた構造を、赤の矢印で示す模式図。図は許可を得た上で転載: ref (Maruyama et al., 2012), copyright 2012 Elsevier。

より高い倍率で観察した樹状突起の骨格上の金の堆積物を図 3.4.9 (k)に示す。予測されなかったが、これらの堆積物は図 3.4.9 (g, i, k)に対して概略的に図 3.4.9 (l)に示すように、しばしば斜めのストライプを形成していた。これは、マイクロチューブルのバンドルが密に螺旋状に並んでいることを示唆する。ただし、これは他の要素、例えばマイクロチューブルのバンドルのエピトープに対する抗体の可触性(accessibility)を反映している可能性もある。

3.4.3.8 議論

本研究は、大気圧 SEM の性能を示すことに加え、生体システムについての情報を得ることを目的として行った。試料処理によるネガティブな点、例えば化学固定による細胞の収縮、サイズに依存した透過性によるバイアスのかかったラベリングなどは見出されなかった。また、構造が入り組んだ小胞体の表面について、大気圧 SEM で Ca^{2+} の蓄積作用による STIM1 のネットワークが可視化され、これらは分子の側面同士の結合により形成されることが示唆された(図 3.4.6, 図 3.4.7)。この結合は、アミノ酸配列から結論された STIM1 の非対称な形状と矛盾しない。このヒモ状の形態は過剰発現した細胞だけでなく(図 3.4.6)、過剰発現していないヒトの T 細胞でも形成されるため(図 3.4.7)、STIM1 の真の生理学的特

徴と思われる。

3.4.3.9 大気圧 SEM で観察できる厚さとその意義

大気圧 SEM 観察では、SiN 薄膜から特定の距離以下の細胞内構造を観察できる。F アクチンとチューブリンは両方とも細胞の動き、形態、細胞内小器官の局在、および生理機能に重用であるが、これらが見えていることは観察できる深さがこれらの位置以上であることを示す(図 3.4.2 – 3.4.4)。このため大気圧 SEM は、積み荷タンパク質や小胞を運ぶタンパク質をはじめとして、細胞骨格に結合するタンパク質を含む共局在の研究に重用なツールになると予測される。

さらに、3.2.3.4 に記載したように、大気圧 SEM で観察できる深さはランディングエネルギーを小さくすることにより浅くなるため、ランディングエネルギーが異なる複数回のスキャンによりターゲットの深さを調べられる可能性がある。これを実現するためには、深さを調べるためのアルゴリズムを開発する必要がある。これにより、大気圧 SEM で共焦点レーザー顕微鏡と同様に、ある程度深さを調べられる可能性がある。ただし、両者の原理は大きく異なる。

3.2.3.4 に記載したように、大気圧 SEM で観察できる深さは 2-3 μm 以上と予測される。図 3.4.3 (b)と(f)の比較に示したマイクロチューブルの大気圧 SEM と共焦点レーザー顕微鏡の画像の比較により、大気圧 SEM は 1.3 μm より深い場所を観察できることが示された。しかしながら、SiN 薄膜近傍の構造は明瞭に観察されるが(図 3.4.3 (h))、離れた構造はぼやける(図 3.4.3 (g), 白の矢印頭)。また、式 3.2.1 で計算した水中におけるビームの広がり、SiN 薄膜から 1 μm 離れた位置では 140 nm 程度であり、2 μm 離れた位置では 400 nm 程度である。通常の光学顕微鏡の空間分解能は 200 nm 程度であるが、これよりも高い空間分解能が得られるのは厚さ 1 μm 強までである。さらに、電子顕微鏡として十分な空間分解能が得られるのは、SiN 薄膜より 500 nm 程度までである。大気圧 SEM を適用するには、これらに留意する必要がある。

3.4.3.10 大気圧 SEM と光顕の correlative microscopy

本研究では、2重ラベルを用いて、*in situ* の免疫大気圧 SEM の correlative microscopy(*in situ* immuno-ASEM correlative microscopy)を行った。光顕・大気圧 SEM 複合システムの蛍光顕微鏡は、大気圧 SEM と比較して視野が広いために、細胞のより広い領域を観察することが可能であり、さらに倒立 SEM を用いて高い空間分解能でタンパク質の分布を調べることができる。これにより、まばらに分布しているエピトープを効率的に観察することが可能であり、色の異なるタグがついた抗体を用いることにより共局在を調べることもできる。Correlative microscopy のもう一つのメリットは、mStrawberry のような蛍光タンパク質が用いられた場合、蛍光顕微鏡でリコンビナントタンパク質(遺伝子組み換えによるタンパク質)が発現している細胞を選んで SEM 観察できることである。こ

れは、リコンビナントプラスミドによるトランスフェクション (transfection: ウイルスなどの核酸を細胞に取り込んで増殖させること)の効率が限定されている場合、例えば数%の場合は特に有効である。

蛍光とナノゴールドの両方を持つタグのついたラベル用プローブは、免疫 correlative microscopy に本質的に重要である。FluoroNanogold™は、以下の理由により蛍光だけをタグに持った場合よりも蛍光が弱い有効である。第一に、FluoroNanogold™は Fab0 フラグメントを用いているため、抗体全体に蛍光体がついている蛍光体だけがついたラベルと比較して、ひとつのプローブについている蛍光体の量が少ない(Powell et al., 1998)。第二に、ナノゴールドにより蛍光体の一部が消光していると考えられる(Powell et al., 1998)。オートメタログラフィー (電気化学反応による銀あるいは金の増感) の中で、電子線による化学反応の可能性が銀の堆積物について示唆されたが、金の堆積物については不活性 (inert)かもしれない(Pohl and Stierhof, 1998)。

量子ドットは、半導体から構成される効率のよい蛍光タグである(Giepmans et al., 2005)(Smith and Nie, 2009)。3.2 節に記載したように、大気圧 SEM で量子ドットの食作用が観察されているため、このタイプのタグを用いることにより免疫大気圧 SEM が改善される可能性があるだろう。

ラベルのもうひとつのトレンドは、タンパク質に付け加えたアミノ酸のシーケンスに蛍光物質をつけて、これによりジアミノベンジン (3,3'-diaminobenzidine)を電子密度の高い物質に変換し、さらにオスミウム酸でこれを増感する方法である(Gaietta et al., 2002)。この遺伝的な方法を用いた洗練された方法は、特に抗体が得られない場合に大気圧 SEM の応用範囲を広げるだろう。

3.4.3.11 液中免疫電顕を適用できる細胞と抗体

大気に開放された薄膜ディッシュを用いることにより、環境セルと比較して2つのメリットがある。ひとつは細胞の種類を選ばないことであり、もうひとつはラベリング、洗浄、染色のサイクルを効率化できることである。図示していないが、ニューロンだけでなく様々な細胞を薄膜ディッシュの上で培養することができた。これは、薄膜ディッシュの体積が大きいので培養に必要な安定な環境が得られるため、および、SiN 薄膜上にコラーゲンやフィブロネクチンを含む様々なコーティングができるためである (Sato et al., 2012)。ラベルと染色のプロセスは、単純な溶液の入れ替えだけで数時間以内に終了できる。これによりスループットが高くなるため、様々な条件での観察だけでなく、薬のスクリーニングにも有効と予測される。

大気圧 SEM 観察に必要な前処理工程が全て溶液の中で行われることは、抗原と形態を保つのに有効である。蛍光観察で免疫細胞化学 (immuno cytochemistry)に有効な 50 以上の異なる抗体を大気圧 SEM で試した。データは示していないが、これらは 100%成功であった。これらの半数は、マウスのモノクローナル抗体である。この成功には、2次抗体のサ

イズが小さいことにより、立体的な障害を最小限にできることが関係しているだろう。細胞表面の構造も、もちろんタグと金増感で観察できる。例えば、細胞表面にあるグリカンレセプターである CD44、および、マイコプラズマの足タンパク質である Gli349 を大気圧 SEM で観察できた(Murai et al., 2011a) (Sato et al., 2012) 。全般的に、免疫大気圧 SEM の適用性とスループットは、免疫光顕のレベルまで改善された。

3.4.3.12 神経細胞ネットワーク

培養基板に垂直な方向からの大気圧 SEM を用いた免疫顕微鏡観察により、神経回路網の形成や神経可塑性の調査が容易になる。これは、成長円錐やシナプスのスパインを調べたい場合に、これらのほとんどが光顕で観察するには小さすぎることから特に有効である(図 3.4.9 に示したとおりである)。F アクチンは、それに結合している関連タンパク質とともに、成長円錐の成長方向に重要な役割を果たし回路網を制御する(Jang et al., 2010) (Kodama et al., 2004) 。カルシウムの流入は成長円錐の運動を制御し(Gasperini et al., 2009) 、また、タンパク質のホーマーファミリーがカルシウムのシグナル伝達に関与していると思われる(Worley et al., 2007) 。カルシウムの流入はホーマー1c をホーマー1a に置き換えるのを加速するので、カルシウム流入によるホーマーサブタイプの交換が共局在を通じて F アクチンの安定性に影響を与えるとの仮説をたてることができる。メカニズムの全体を理解するには、カルシウム流入を蛍光観察するとともに、大気圧 SEM を用いたアクチンファイバーの再配列のさらなる研究が有効であろう。図 3.4.9 (k)と(l)に示す樹状突起胴体での螺旋状のチュブリン分布は、スパインの組織化に関連するかもしれない。これらのスパインは、樹状突起の上に螺旋状に分布することが知られている(O'Brien and Unwin, 2006) 。

成熟したニューロンの中で、大気圧 SEM を用いて糸状仮足とシナプスにおける局所的な F アクチンの集積を観察できたことから、*in vitro* で2週間程度培養した成熟したニューロンにおいて一日以内に起こることが知られているニューロンのシナプスの再配置(Ebihara et al., 2003) を観察することもできると予測される。このプロセスを光顕でモニタリングし、決定的な瞬間に固定液を投入することによりシナプスの形成をストップさせた上で、高分解能の大気圧 SEM でニューロンのダイナミクスのスナップショットを撮影できるだろう。例えば、分化や再配置における細胞骨格やシナプス後肥部にある他のタンパク質の再分布、あるいは、シナプスの再配置を光顕よりも高い空間分解能で観察できる。スパイン上のシナプスの外形や他のぼんやりとした構造をウランと鉛を用いた対比染色で強調することができた。

3.4.4 本節の結論

将来、免疫大気圧 SEM、および、免疫大気圧 SEM を用いた *correlative microscopy* は、免疫組織化学に活用することが可能であろう。大気圧 SEM によりタンパク質位置の局在を高い空間分解能で調べることが可能であり、かつ、大気圧 SEM の高いスループットは検査

や薬のスクリーニングに適していると予測される。

3.5 マイコプラズマの観察と検査の可能性

本節では、マイコプラズマの迅速検査の可能性について記載する(Sato et al., 2012)。

3.5.1 本研究の背景と目的

マイコプラズマは、単独の生存生物 (free living organism)の中で最も小さい(Razin et al., 1998) (Weisburg et al., 1989)。マイコプラズマ肺炎菌とマイコプラズマモビレは良く研究されており、大変良く動き、幅が約 200 nm で光の波長より小さく、大きなウイルスと同じオーダーの大きさである(Waites and Talkington, 2004) (Principi and Esposito, 2001) (Miyata, 2008) (Miyata, 2010)。他のバクテリアと異なり、マイコプラズマの細胞にはペプチドグリカン層がないため、マイコプラズマ肺炎菌による肺炎の場合のように通常用いられる抗生剤(antibiotics)に耐性がある。そのかわり、彼らは3層の脂質膜に覆われている。最外層は、多様な抗原性の要因である表面タンパク質とともに、膜にアンカーされたタンパク質が豊富に存在する(Razin et al., 1998) (Kusumoto et al., 2004)。少なくともいくつかの膜脂質は、マイコプラズマに固有であることが示されている。これらの生体のとても小さなゲノムは、遺伝子数が数百しかなく、生合成を限定しており、ガラス容器内での培養の難しさの要因になっている。

淡水魚から分離されたマイコプラズマモビレは、大きさがマイコプラズマ肺炎菌と類似なだけでなく形態もマイコプラズマ肺炎菌に似ている。これらは、内部の骨格とともに、極性のある突起や DNA が入ったバルブ状の領域を有する。滑らかな動作機構(gliding machinery)は突起のつけ根にあり、柔らかい足が細胞の外側に出ている(Miyata, 2010)。知られている限り、他の原核・真核生物の細胞骨格やモータータンパク質にこの構造の相同体(homolog)はない(Himmelreich et al., 1996) (Jaffe et al., 2004)。モビレは、マイコプラズマの中で最も速く動く(Miyata, 2010)。モビレの足のタンパク質は、G1i349 と同定されている。G1i349 に対するモノクローナル抗体が、滑らかな移動(gliding)の速度を低下させ、かつ、基板からマイコプラズマをはがすからである。G1i349 の c 末端の細胞外突起(extracellular tip)、すなわち足は、宿主表面のシアル酸に付着し、感染において重要な役割を果たす(Uenoyama et al., 2009) (Lesoil et al., 2010) (Nagai and Miyata, 2006) (Uenoyama et al., 2004)。

マイコプラズマは、最初に牛肺疫 (CBPP: contagious bovine pleuropneumonia)から分離されたが、特にヒツジやブタに深刻な疾病をもたらす。自己免疫疾病、リウマチ、喘息、肺炎などを含む様々な疾病をもたらす 16 種のマイコプラズマが、ヒトから分離された。肺炎菌は呼吸器の飛沫を介して広がり、15%以上の市中肺炎 (community-acquired pneumonia)、および、治療を必要とする子供の 18%の要因となる(Waites and Talkington, 2004)。特に 5 才以下の子供には、疫学的な調査により、マイコプラズマ肺炎菌は通常の風

邪、咽頭炎、急性気管支炎、肺外の疾病などの上下の呼吸器への感染をひきおこすことがわかっている。マイコプラズマ肺炎菌は、急性および慢性の喘息の 20-50%の原因としても認識されている(Principi and Esposito, 2001)。マイコプラズマ肺炎の流行は 3-7 年ごとにおこり、薬剤耐性の流行(outbreak)が現在日本、アメリカ、ドイツ、中国に影響を与えている (IDSC) (Morozumi et al., 2010) (Dumke et al., 2010) (Xin et al., 2009)。

胸部 X 線検査あるいはコンピュータトモグラフィ(CT)が、マイコプラズマ肺炎検査の最初のアプローチとして用いられる。しかし、それは簡単でなく、血清、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR: polymerase chain reaction)、培養によって確かめられる必要がある。血清法では、特定のタンパク質や糖脂質抗体を用いて肺炎菌に対する IgM や IgG、あるいは肺炎菌の初期の抽出物(crude extracts)を検出する(Waites and Talkington, 2004) (Petersen et al., 1981) (Lind, 1982)。もし感染から十分に抗体ができるだけの時間がたっていれば、この方法は PCR 法に匹敵する感度で迅速に病原菌を同定できる(Waites and Talkington, 2004) (Waites, 2001)。松田らは、近年比較的初期から検出可能な肺炎菌に特徴的な糖グリセロ脂質を抗原に用いて特異性を高めた(Miyachi et al., 2009) (Matsuda et al., 1994)。PCR による生物同定では、マイコプラズマ肺炎菌の ATPase オペロン、P1 adhesin、16s RNA、あるいは *tuf* 遺伝子を増幅する(Waites and Talkington, 2004) (Bernet et al., 1989)。これは感度が高いが、PCR 反応は時々試料内の異物により抑制される。特に鼻咽頭からの吸引物の場合に問題となる(Waites and Talkington, 2004) (Reznikov et al., 1995)。古典的な培養法の場合、呼吸器系またはその他の部位からとった細胞を寒天培地のプレート上で培養し目に見えるコロニーを同定するが、少なくとも 8 日以上必要である(Waites and Talkington, 2004) (Tully et al., 1979)。

これらの手法は、特に疾病の中期または後期のステージにて有効である。これに対し、初期における検査が確立されれば、治療のために有効だろう。特に、薬剤耐性菌の場合は初期の検査が有効である。しかしながら、マイコプラズマは小さいためにこれは容易ではない。マイコプラズマ肺炎菌は特徴的な平らなバルブ形状のボディと細胞内の構造を有しているため、迅速な高分解能イメージング法は検査の役に立つだろう。

通常の電子顕微鏡は nm 以下あるいは nm 程度の空間分解能を持っているが、試料を真空中に配置する必要がある。このため、時間のかかる前処理が必要であり、迅速な検査には不向きである。薄膜技術に基づいた新しい大気圧 SEM は、開放された溶液中の試料を観察できる。直径 35 mm の大気に開放された薄膜ディッシュにより、迅速な染色とラベリングが可能になった。空間分解能が高いこと、および、液中観察ができることから、大気圧 SEM は小さな真核生物を観察するのに適している。

本研究では、大気圧 SEM を用いて、モデル種であるマイコプラズマモビレを溶液中で直接観察した。薄膜ディッシュにフェチュイン(fetuin; 低分子のグロブリンのひとつ)をコートすることにより、バッファー中に分散させたモビレは迅速にフィルムに付着し、SEM 観察を行うことが可能となる。免疫染色により特定タンパク質の分布を明らかにできるとと

もに、重金属染色により内部構造を正確に可視化できる。

3.5.2 実験方法

3.5.2.1 イメージング

光顕・大気圧 SEM 複合システムを用いて、モビレの蛍光像と電顕像を順番に観察した。光顕と大気圧 SEM の両方で、薄膜に付着しているマイコプラズマ細胞の深さ方向の全てを観察できる。マイコプラズマの厚さが $1\ \mu\text{m}$ 以下であるのに対し、倒立 SEM の観察深さは 30 KV において 2–3 μm 以上だからである。ただし、SiN 薄膜から 0.5 μm 以上離れた部分の観察では、空間分解能が大きく劣化する。

標準の直径 35 mm の薄膜ディッシュをモビレの培養と観察に用いた。この容量 3 ml のペトリディッシュの底には、厚さ 100 nm、大きさ $0.25 \times 0.25\ \text{mm}$ の SiN 薄膜窓がある。固定の後にラベルあるいは染色した細胞を、LUMFLN 60XW/NA 1.10 対物レンズ(オリンパス)と Neo CMOS カメラ(アンドール)を用いて蛍光観察した。これらを 10 mg/ml (W/V) のアスコルビン酸を加えた PBS 中で、ランディングエネルギーが 30 keV の大気圧 SEM で観察した。

3.5.2.2 膜のコーティングとマイコプラズマの培養

滑らかな動作のスピード (gliding speed) の遅いモビレの変位株である G1i521(P476R)163 K(ATCC43663)を、薄膜ディッシュの SiN 膜の上で直接培養した (Uenoyama et al., 2009) (Uenoyama and Miyata, 2005)。薄膜ディッシュは、培養前に 0.5 mg/ml のフェチイン(シグマ)で 2 時間コートし、1 mg/ml のフィブロネクチン(BD バイオサイエンス)で 1 時間、0.1 mg/ml のコラーゲン(Koken)で 10 分、あるいは、1 mg/ml のポリ L リジン(シグマ)で 1 時間コートした。全て、室温で行った。モビレはフェチインのコーティングに良く付着するので、全ての画像でフェチインコートしたディッシュを用いた。細胞は最初最適な密度である OD 600 の 0.07 倍($7 \times 10^8\ \text{cfu/ml}$)になるまでアリユオット培養液(Aluotto medium)内で培養した(Aluotto et al., 1970)。ここで OD600 は微生物を含む培養液の濁度を示し、cfu (colony forming unit)は培養液中の微生物のコロニー数を示す単位である。これらを薄膜ディッシュの中に植えつけた後、 $25^\circ\ \text{C}$ で 1 時間培養した。生細胞の吸着に対するネガティブコントロールのために、細胞は 0.1 M のリン酸塩バッファー(PH 7.2)中の 1%グルタルアルデヒドを用いて室温で 15 分間固定した。

3.5.2.3 金属染色

上記固定の後で、PBS 中 0.5 %のトリトン X100 で室温にて 1 分間穿孔した。これらを DDW 中の 0.6 %プラチナブルーで 1 時間染色し、PBS 中の 2 %タンニン酸で 20 分、1 %オスミウム酸で 5 分、2 %酢酸ウランで 20 分、そして最後に 0.4 %の水酸化ナトリウム中

の 0.4 %のクエン酸鉛で 5 分間染色した。細胞は、それぞれの染色の後で、PBS あるいは DDW で洗浄した。

3.5.2.4 免疫染色

マイコプラズマの細胞は、PBS 中の 3%パラホルムアルデヒドを用いて室温で 5 分間固定した。核は、25 ng/ml の DAPI で 15 分間染色した。細胞は、PBS 中の 3%パラホルムアルデヒドと 0.1 %グルタルアルデヒドを用いて室温で 10 分間固定した。PBS 中の 1%スキムミルクと 5%ヤギ血清 (goat serum) でブロッキングした後、細胞をブロッキングバッファーの中で、一次抗体(マウスの抗可変表面タンパク質 (MMOB3340: Mvspl))、あるいは、抗 Gli349 モノクローナル抗体)でラベルした(Kusumoto et al., 2004)。これらはさらに、直径 1.4 nm のナノゴールドと蛍光 Alexa Fluor 594 の両方を結合したマウス IgG に対するヤギの Fab' (Nanoprobes 社、ブロッキングバッファーで 1/200 に希釈)でラベルした(Powell et al., 1997)。結合した抗体は、PBS 中の 1 %グルタルアルデヒドで室温にて 5 分間固定した。洗浄した後、ナノゴールドを Gold Enhance EM (Nanoprobes)を用いて室温で 5 分間増感した(Powell and Heinfeld)。

エピトープの周囲を可視化するために、タンニン酸、酢酸ウラン、および、クエン酸鉛を用いて対比染色した。

3.5.3 結果および考察

3.5.3.1 溶液中における M. モビレの染色

細胞を、白金ブルー、タンニン酸、オスミウム酸、酢酸ウラン、および、クエン酸鉛など、通常のエポキシ薄膜に対する電顕用染色液で処理した。モビレは、一つの極に突起を持つバルブ形状で、幅が約 200 nm、長さが約 800 nm であった(図 3.5.1)。強く染色される部分があるが、酢酸ウランが核酸を強く染めることから、これは DNA に起因すると考えられる(Miyata and Ogaki, 2006)。もう一つ濃度が高い領域が突起の先端に明瞭に見えて、細胞の方向に依存してリング状の形態となる。これは、キャップ的な密度(ゼリーフィッシュの形をした細胞骨格構造のベル形状のトップ)に対応している(Nakane and Miyata, 2007)。これは、マイコプラズマの突起先端に特徴的に観察される。2つの密度の間にはかすかに見える様々な構造があり、これは「足」構造を含む膜の構成要素、あるいは、細胞骨格を示唆するものと思われる(Uenoyama et al., 2004) (Nakane and Miyata, 2007)。大気圧 SEM 像から、特徴的で簡単に認識できるモビレの絵が得られる。

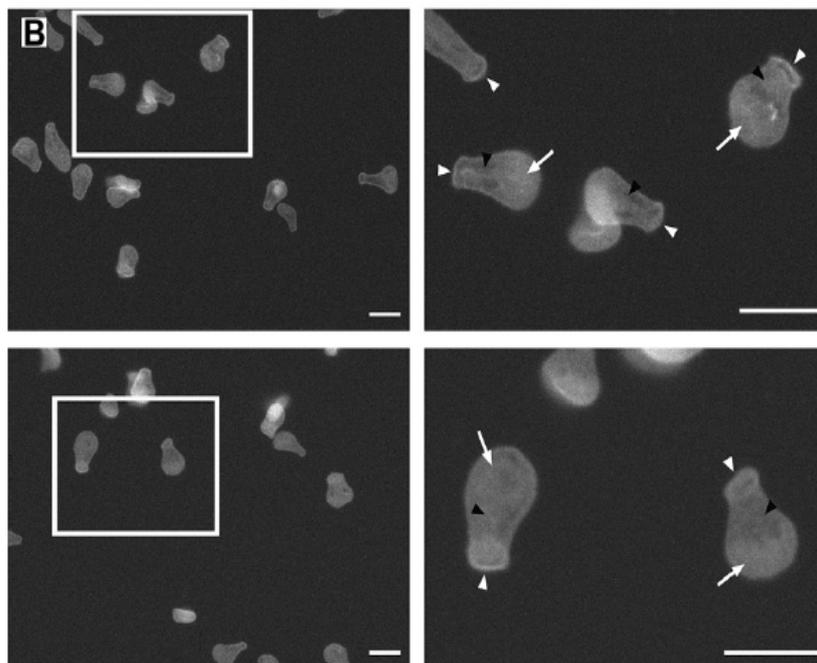


図 3.5.1 溶液中のマイコプラズマの大気圧 SEM 像。マイコプラズマモビレの細胞を固定し、穿孔し、そして白金ブルー、タンニン酸、酢酸ウラン、オスミウム酸、および鉛を用いて染色した。バルブ状の領域に、DNA に起因する密度が観察された(白の矢印)。リング的な構造が、反対側の領域で観察された(白の矢印頭)。首の領域には、様々な形態を有する別の構造が観察され(黒の矢印頭)、足タンパク質あるいは細胞骨格に対応すると考えられる。スケールバーは 1 μm 。図は許可を得た上で転載: ref (Sato et al., 2012), copyright 2012 Elsevier。

3.5.3.2 表面抗原に対する免疫電子顕微鏡

マイコプラズマ表面の抗原タンパク質は、宿主免疫システムのキーとなるターゲットであり、血液の免疫検査に重要であるため広く研究されてきた。モビレにおいて特徴的な分布を持ち、豊富にある表面抗原 MvspI の可視化を試みた。固定した細胞を、マウスモノクロナール IgG MAb14 (Kusumoto et al., 2004)、および蛍光と 1.4 nm のナノゴールドを結合した 2 次抗体でラベルした (Powell et al., 1997)。ナノゴールドは、金増感によって大きくした (Powell and Heinfeld)。薄膜ディッシュは大気に開放された構造であるため、効率的なラベリングと洗浄が可能であり、これら全ての工程を数時間以内に完了できる。光学顕微鏡では、アレクサフルオロ 594 (赤) はぼんやりとした点として観察されるが、DAPI の信号 (青) は小さな領域に局在していた。また、アレクサフルオロ 594 と DAPI の信号は、一部重なっていた (図 3.5.2 (a))。大気圧 SEM での観察は、2 つのクラスターがペアとなって存在していることを示した。ここで、ペアの中に小さなクラスターと大きなクラスター

があり、それぞれモビレの「頭」と「体」に対応する(図 3.5.2 (b))。クラスターは、直径約 20 nm の増感した金粒子から成り、それぞれの金粒子はエピトープの位置を示す。また、対比染色により細胞の外形も明瞭に観察されるため、細胞内のエピトープの局在を確認できるが(図 3.5.2 (c))、局在は従来の報告と良く一致する(Kusumoto et al., 2004) 。平均的な局在は、図 3.5.2 (d)に示される。

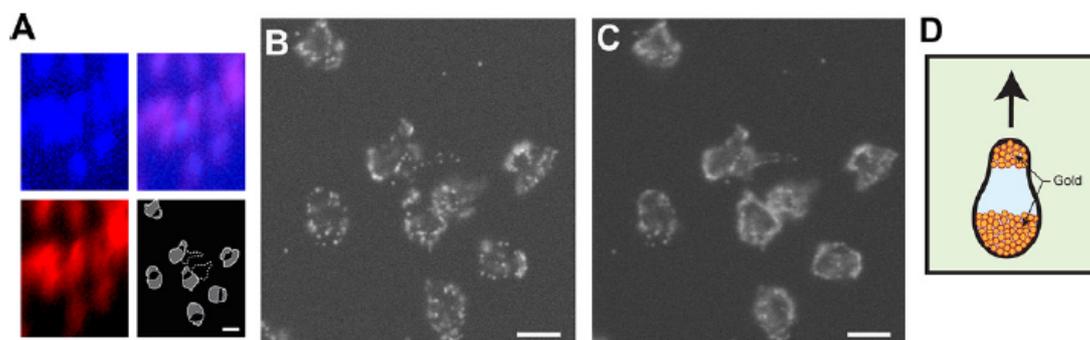


図 3.5.2 溶液中で観察したマイコプラズマモビレの免疫顕微鏡像。(a) 光顕像。固定した細胞を、核酸を染める DAPI(青)で染色した。MvspI をマウスモノクローナル抗体である MAb14 でラベルし、さらにアレクサ 594(赤)とナノゴールドを結合した二次抗体でラベルした(Powell et al., 1997) 。DAPIによる染色は、部分的に抗体によるラベルと重なった。マージした像(右上)では、それぞれの細胞がどの位置にかかるかがわかる。右下に、電顕観察から得られた細胞の位置を図示する。光顕と大気圧 SEM 像の食い違いは、細胞と SiN 膜の距離に分布があるためと考えられる。(b) 金増感した後の大気圧 SEM 像。直径約 20 nm の金の粒子としてエピトープが観察される。バックグラウンドノイズは低い。(c) (b)の試料をタンニン酸、酢酸ウラン、クエン酸鉛で対比染色した後観察した大気圧 SEM 像。細胞の端をクリアに観察できる。(d) MvspI 分布の模式図。矢印は、なめらかな動きの方向を示す。スケールバーは 0.5 μm 。図は許可を得た上で転載: ref (Sato et al., 2012), copyright 2012 Elsevier。

次に、Gli349 タンパク質を用いてモビレのなめらかな移動機構(gliding machinery)の「足」を可視化することを試みた(図 3.5.3)。これらをモノクローナル抗体 MAb7 でラベルした(Kusumoto et al., 2004) 。この抗体が結合すると、なめらかな移動と細胞付着が抑制される(Nagai and Miyata, 2006) (Uenoyama et al., 2004) 。Gli349 は、「首」に局在した(図 3.5.3 (b))。これは、外形を可視化するための対比染色により明らかとなった(図 3.5.3 (c))。これらは、過去の報告と良く一致した(Kusumoto et al., 2004) (Uenoyama et al., 2004) 。図 3.5.3 (d)は、平均的な局在を示す。

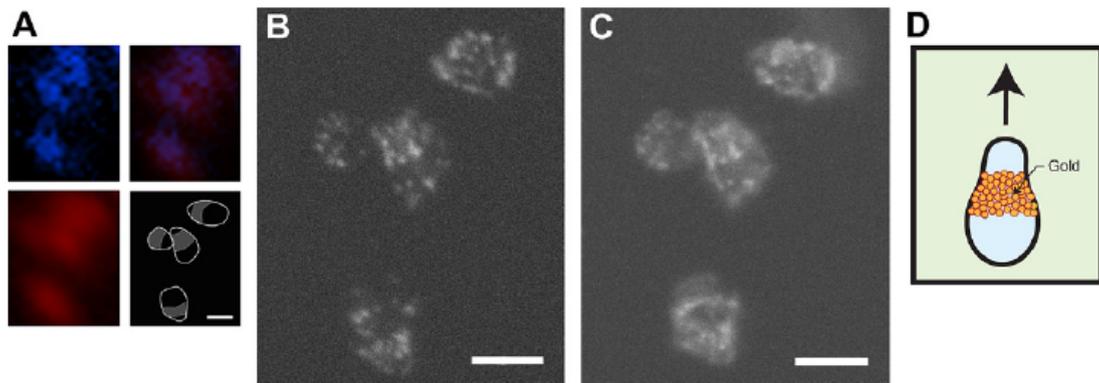


図 3.5.3 足タンパクである Gli349 の局在。細胞を抗 Gli349 である Mab7 でラベルした後、2重タグがついた二次抗体でラベルした。(a) 光顕像。左上は DAPI(青)染色。左下は Gli349(赤)。右上はマージ像。右下は、電顕観察から得られた細胞の位置。(b) 細胞の首をラベルした金の大気圧 SEM 像。局在は、図 3.5.2 の MvspI とほぼ反対である。(c) (b) の試料をタンニン酸、酢酸ウラン、クエン酸鉛で対比染色した後観察した大気圧 SEM 像。細胞の首と胴体が顕在化された。(d) Gli349 局在の模式図。スケールバーは 0.5 μm 。図は許可を得た上で転載: ref (Sato et al., 2012), copyright 2012 Elsevier。

3.5.3.3 SiN 薄膜への付着によるマイコプラズマの密度増加

SiN 薄膜ウインドウ上のモビレを繰り返して観察するうちに、観察できる細胞数が光吸収から予測されるよりもかなり多いことがわかった(図 3.5.4)。そして、それらは薄膜に付着していた(図 3.5.4)。能動的な細胞付着を評価するために、生細胞と固定細胞の両方を用いて観察できる細胞数を比較した(図 3.5.4 (b))。生細胞の密度は固定細胞のものより約 2 桁高く、能動的な細胞の結合が示唆された。シアル酸がモビレの「足」(Gli349)の足場になるため、ガラス基板の場合に示されたように、能動的な付着は SiN 膜に結合したシアル酸に対するものと考えられる(Waites and Talkington, 2004) (Lesoil et al., 2010) (Nagai and Miyata, 2006)。

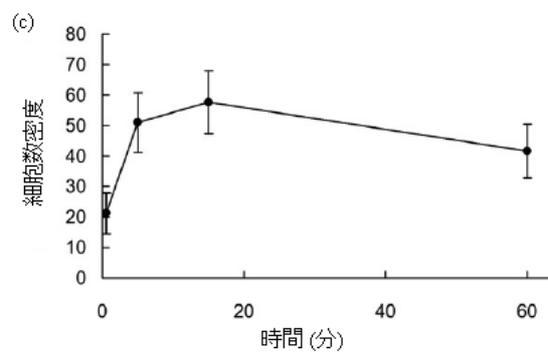
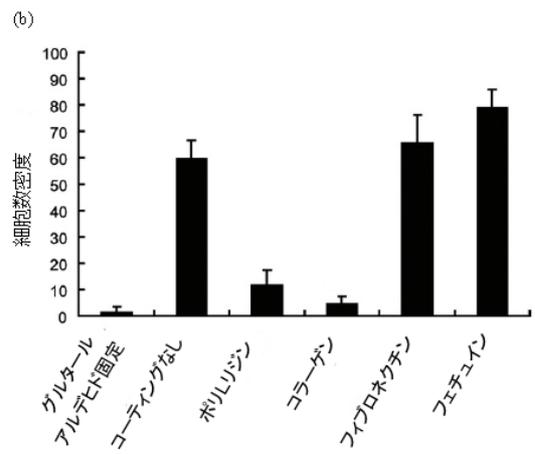
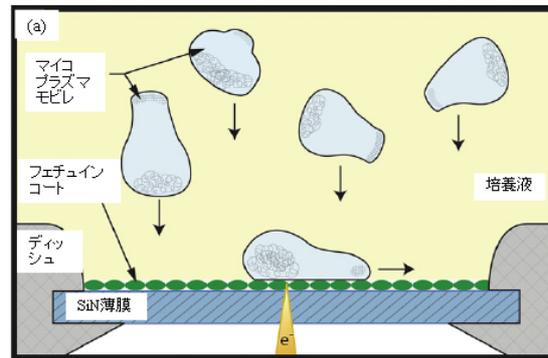


図 3.5.4 マイコプラズマモビレの SiN 膜への付着。(a) 培養液の中に懸濁した細胞が SiN 薄膜に付着する際の模式図。(b) 細胞付着量の基板依存性。様々なコーティングの中で、シアル酸を含むフェチュインでコートした場合に最も良く付着した(n = 5)。(c) フェチュインでコートした SiN 膜に付着する細胞量の時間依存性(n = 5)。細胞は、わずか 5 分で付着する。全てのデータは、標準偏差とともに示した。図は許可を得た上で転載: ref (Sato et al., 2012), copyright 2012 Elsevier。

これを確認するために、細胞が様々なタンパク質をコートした SiN に結合するレートを比較した(図 3.5.4 (b))。シアル酸を含むフェチュイン (血液中のタンパク質) のコートが最も

高い結合レートを示した。他のシアル酸を含むタンパク質であるフィブロネクチンも、コートをしていない膜と同程度の高い結合レートを示した。シアル酸を含まないポリ L リジンは、かなり低い結合レートを示した。低い結合レートは、コラーゲンコートした SiN 膜への細胞結合の時間依存性を調べた(図 3.5.4 (c))。バッファ中に浮いている細胞は 5 分以内に結合し、SEM 観察が容易になった。

3.5.3.4. 各種応用の可能性

マイコプラズマは厚さが 1 μm 以下であり、ランディングエネルギーが 30 keV の場合、全ての生体組織を簡単にある程度の空間分解能で観察できる。また、SiN 膜から 500 nm 以下の領域は、特に高い空間分解能で観察できる。染色したモビレでは、クライオ電顕で明らかにされたマイコプラズマ肺炎菌の内部構造と類似の詳細な内部構造が観察された(Henderson and Jensen, 2006)。これは、これらの細胞の様々な構造と機能の関係を理解するために役立つだろう。通常の SEM では、基本的には真空中において(一般的には試料を金属コートした上で)試料表面を観察する。通常の TEM 観察では、真空中で切片試料を観察するため疎水的な薬品を用いた処理を含む様々な試料前処理が必要であり、試料の細部をあいまいにする可能性がある。これに対し、大気圧 SEM は、より自然な水溶液中において細胞内の構造を観察できる。

さらに、大気圧 SEM は液中試料のイメージングができるため、バクテリアの認識に必要な特徴的な像を、通常の電顕と比較して簡単かつ短時間に得られる。親水的な環境により抗原性が保たれるため、蛍光ラベルに匹敵するほどの高いスループットで、様々な抗体でのラベルが可能である(Murai et al., 2011a)。これは、マイコプラズマ肺炎や他のマイコプラズマにより引き起こされる病気について、画像に基づく研究や検査を行うのに好都合である。大気圧 SEM は、研究室で良く問題となる培養細胞のマイコプラズマによるコンタミネーションの迅速な確認にも使うことができるだろう。

水溶液中に分散しているモビレの多くは、5 分以内に能動的にフェチインでコートした薄膜ディッシュの SiN 膜に集まる。ガラス表面に結合したシアル酸はマイコプラズマの足場として働くために、この細胞の結合選択性はマイコプラズマのシアル酸に対する足場理論に一致する。これは、SiN 膜の表面がガラス的になっていることで説明できる。すなわち、SiN 膜の表面は、製造工程の中で酸化されて SiO_x(すなわちガラス)になると推定される。マイコプラズマ肺炎菌は、モビレよりも強くシアル酸に付着すると信じられている(Nagai and Miyata, 2006) (Kenri et al., 2004) ため、基板の上に早く集まると思われる。

大気圧 SEM で重金属染色した細胞を観察する方法は、能動的に細胞が結合することから、検体中の細胞数が少ない感染初期のマイコプラズマ肺炎の検査技術として有効だろう。この方法は、近年開発されつつある他の検査手法による評価とのクロスチェックにも有効と予測される。より広い観察領域を持つ光顕画像との相関は、マイコプラズマを様々な夾雑

物、痰、あるいは血清などと区別するのに役立つであろう。

近年開発された超解像光顕は、蛍光ラベルが必要であるが、光の波長限界を超えた空間分解能を達成するとともに生きた細胞の可視化も実現した(Hell and Wichmann, 1994)(Rust et al., 2006)。これらの顕微鏡は、基本的には反射型の蛍光顕微鏡であるため、倒立型の大気圧 SEM と組み合わせることができるだろう。重金属染色を用いた大気圧 SEM 像は、タンパク質や脂質を含む様々な分子を可視化するため、超解像光学顕微鏡と組み合わせることにより様々な高空間分解能観察に有効と考えられる。

現在は免疫と染色の工程全てを行うと数時間必要であるが、マイコプラズマの洗浄効率はその体積が小さい(大腸菌の体積の 1/25 程度(Henderson and Jensen, 2006))ので非常に高いはずであり、この時間を 1 時間あるいはそれ以下にできると予測される。時間短縮のために、染色の回数も減らせるだろう。光顕による観察位置のナビゲーションを含め、大気圧 SEM による観察時間は各試料に対して 30 分以下にできると考えられるので、効率の高いハイスループットモニタリングが可能になると思われる。大気圧 SEM は、薄膜ディッシュの SiN 薄膜の高さが常にほぼ同じであるため焦点位置がいつも大きく変わらないこともあり、通常の電顕よりも操作が容易である。また、複雑で技術が必要な試料前処理が不要であるため、検査のためのオペレーターのトレーニングも比較的単純である。

3.5.4 本節の結論

大気圧 SEM がガンの術中検査に役立つとともに(Nishiyama et al., 2010)、マイコプラズマの研究や検査にも有益になると結論する(Sato et al., 2012)。大気圧 SEM は、バクテリアや大きなウイルスに関する画像に基づいた解析に広く応用出来ると予測される。

3.6 たんぱく質微結晶の液中観察

本節では、X線回折用のたんぱく質微結晶を大気圧 SEM で検出することについて記載する(Maruyama et al., 2012b)。

3.6.1 本研究の背景と目的

たんぱく質の機能的なメカニズムを理解するため、あるいは、戦略的な薬のデザインのために、たんぱく質あるいはその複合体の3次元的な構造を決定することが必須である。X線結晶学(X-ray crystallography)(Branden and Tooze, 1991)(Kato et al., 2012)(Maeda et al., 2009)、核磁気共鳴(Wuthrich, 1986)、電子顕微鏡を用いた単粒子解析(Frank, 1996)(Ogura et al., 2010)(Sato et al., 2001)などがこの目的のために用いられてきた。X線結晶学では、ひとたび大きな(典型的には50–100 μm以上)品質の良い結晶が得られれば、結晶構造はシンクロトロン放射光を用いて比較的簡単に決定できる。しかしながら、結晶化がたんぱく質の濃度、塩と沈殿剤、pH、そして温度などの複数のパラメーターに依存するために、適当な条件を決定することがボトルネックになっている。顕微鏡が結晶化条件をスクリーニングするために広く用いられているが、光の波長限界により空間分解能は限定される。さらに、顕微鏡を用いた詳細な観察では、複屈折を利用するためにプラスチックのスクリーニングプレート内の結晶溶液をより光学的に均一なガラスのサポートの上に移す必要がある。また、通常顕微鏡では、たんぱく質と塩の結晶を区別することは容易でない。もし目的たんぱく質のマイクロ結晶を溶液中で検出できれば、結晶化条件をスクリーニングの初期段階において最適化できる。マイクロ結晶の観察を用いたハイスループットなスクリーニング方法が開発されれば、結晶構造を解析するために適当な結晶を得るための時間を短縮できると予測される。さらに、マイクロフォーカスX線ビーム(Riekkel et al., 2005)により、10 μm程度の小さなクリスタルを用いてたんぱく質の結晶構造を決定できるようになってきた(Coulibaly et al., 2007)。そして、X線自由電子レーザーにより、ナノクリスタルを用いた結晶構造解析を実現できると期待されている(Chapman et al., 2011)。このため、溶液中でたんぱく質のマイクロ結晶を高分解能で観察するためのニーズは高まっている。

古典的な顕微鏡では、試料を真空中に配置する必要があり、フリーゼッチングやレプリカ法などを用いてたんぱく質の結晶を観察できる(Bachmann et al., 1985)(Durbin and Feher, 1990)。しかしながら、デリケートな結晶をハンドリングすることは容易ではなく、かつ、時間がかかるために、顕微鏡がたんぱく質結晶化条件の最適化に用いられることはあまりなかった。

大気圧 SEM を用いることにより、迅速かつ高分解能な液中観察をできることから、たんぱく質の微結晶を観察できると考えられる。そこで、本研究では溶液中における硫酸銅の結晶化を、大気に開放されたサンプルホルダを有する大気圧 SEM を用いてビデオに記録し

た。BSE の量は試料を構成する原子の原子番号や密度に関係しているため、光顕では観察することが容易でないリゾチームのマイクロ結晶(2 x 2.5 μm)を重金属で染色して観察した。最後にバッファー中で染色していない3種類のクリスタルを直接観察した(Maruyama et al., 2012b)。

3.6.2 実験方法

3.6.2.1 硫酸銅の結晶化

大気圧 SEM で液中の結晶を観察できるか確認するため、最初に硫酸銅の結晶成長を観察した。硫酸銅結晶は重金属を多く含んでいるために十分なコントラストが得られると予測されるので、大気圧 SEM で最初に観察する結晶として適していると考えられた。硫酸銅は、大気に開放された薄膜ディッシュを用いて、10 μl の硫酸銅水溶液 (173 mg/ml, 45 °C)から蒸発と温度低減により結晶化した。

3.6.2.2 タンパク質の結晶化

大気圧 SEM を用いて、3種類のタンパク質結晶の観察を試みた。観察を容易にするため、最初に重金属で染色をしたタンパク質を観察した。次に、無染色のタンパク質を観察した。

タンパク質の結晶化条件は、以下のとおりである。Chicken egg-white の リゾチーム (lysozyme (シグマ))をバッチ法(the batch method)で結晶化した。タンパク質の溶液(90 mg/ml, 200 mM の酢酸ナトリウムバッファー, pH 4.7)を 1.5–1.3 M の塩化ナトリウムを含む酢酸ナトリウムバッファー(200 mM, pH 4.7)と体積で同量混合し、26 °C で保持した。リパーゼ B (Lipase B (Hampton Research)) は、提供者のマニュアルに記載された方法に従いシッティングドロップ方式を用いた蒸気拡散法(the sitting drop vapor diffusion method)で結晶化した。リパーゼ B のタンパク質溶液(10 mg/ml)と 1 M の硫酸アンモニウム (ammonium sulfate)を含む 100 mM のクエン酸-クエン酸ナトリウム (citric acid-sodium citrate buffer (pH 4.0))をタンパク質結晶化のためにディッシュの上において体積で同量混合し、26 °C で保持した。シッティングドロップ方式を用いた蒸気拡散法で、TAF-1B タンパク質を結晶化した(Muto et al., 2004) 。液滴を、体積で同量のタンパク質溶液(32 mg/ml, 20 mM のトリス塩酸バッファー, 100 mM の塩化ナトリウム, 10 mM の 2-メルカプトエタノール, pH 7.9)と結晶化バッファー(2.85 M の硫酸アンモニウム, 0.1 M のクエン酸ナトリウム, 0.2 M の 酒石酸カリウムナトリウム, 30 mM の塩化マグネシウム, pH 5.4)を混合した。

3.6.2.3 タンパク質結晶の重金属染色

洗浄バッファー (Washing buffer, 1.5 M の塩化ナトリウム, 200 mM の酢酸ナトリウムバッファー, pH 4.7)で洗浄した後、リゾチームの結晶を2倍に希釈した洗浄バッファー中の

1% PTA あるいは 0.3% の白金ブルー (TI-Blue, $\text{Pt}_4(\text{NH}_3)_8(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_5)_4$, (Nisshin-EM Ltd.)) で 5 分間染色し、その後洗浄バッファで洗浄した。マイクロ結晶は、結晶の溶解を防ぐために、1% PTA を含む洗浄バッファで染色した。

3.6.2.4 タンパク質を結晶化させるための特殊薄膜ディッシュ

タンパク質の結晶化は、通常直径と高さがそれぞれ 16 mm のウェルの中で検討する。通常の薄膜ディッシュを用いて大気圧 SEM で観察する場合、このウェルからディッシュに結晶を移動する必要がある。しかしながら、タンパク質の結晶は転移などによっても簡単に溶解するため、結晶化直後にそのまま同じウェルの中で観察することが望ましい。

そこで、タンパク質の結晶化を検討するための特殊薄膜ディッシュを開発した (Maruyama et al., 2012b)。標準の薄膜ディッシュとタンパク質結晶化用の薄膜ディッシュを図 3.6.1 に示す。上にガラスバーのある円筒形のプラスチックチューブ(直径 16 mm、高さ 16 mm)を、標準の薄膜ディッシュに接着した(図 3.6.1 (a))。通常のウェルとサイズを同じにすることにより、共通の結晶化条件を用いることができる。

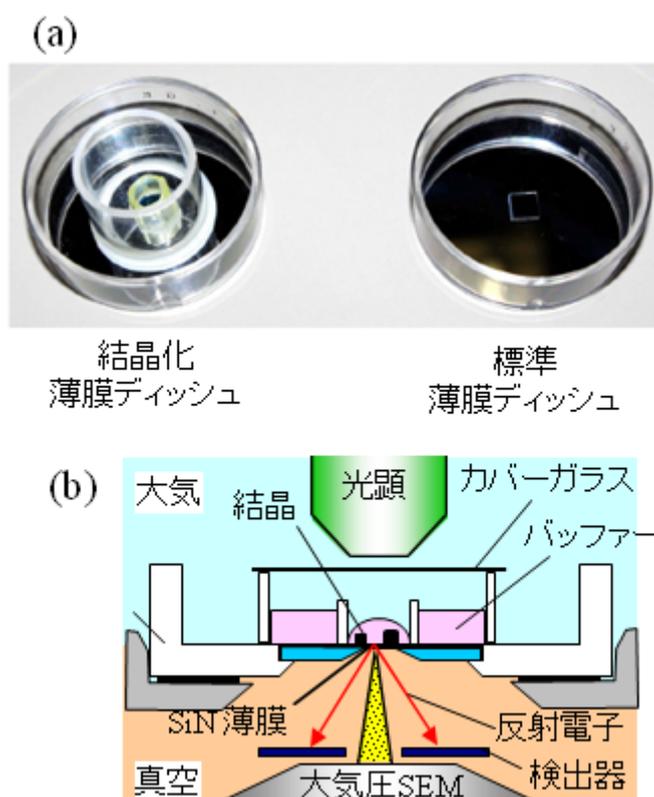


図 3.6.1 大気圧 SEM 用の薄膜ディッシュと大気圧 SEM による結晶観察の様子。(a) 標準の薄膜ディッシュ(右)と結晶化ウェルのついたタンパク質結晶化用の特殊薄膜ディッシュ(左)。ウェルの容量は、タンパク質結晶学のために用いられる標準的な結晶化プレートと同

じである。(b) 結晶化ウェルのついた薄膜ディッシュを用いて大気圧 SEM 観察をする様子。

3.6.3.5 タンパク質結晶を沈降させるための薄膜ディッシュアダプター

タンパク質結晶化の際には、結晶は結晶化液滴の上部か中央部に形成される。結晶あるいは析出物を大気圧 SEM で観察するためには、試料を SiN 薄膜の極近傍に配置する必要がある(Nishiyama et al., 2010)。このために、市販の遠心分離器(Tomy, B407 12 rotor)用の薄膜ディッシュアダプター(Tomy, B407GA)も開発した(図 3.6.2)。

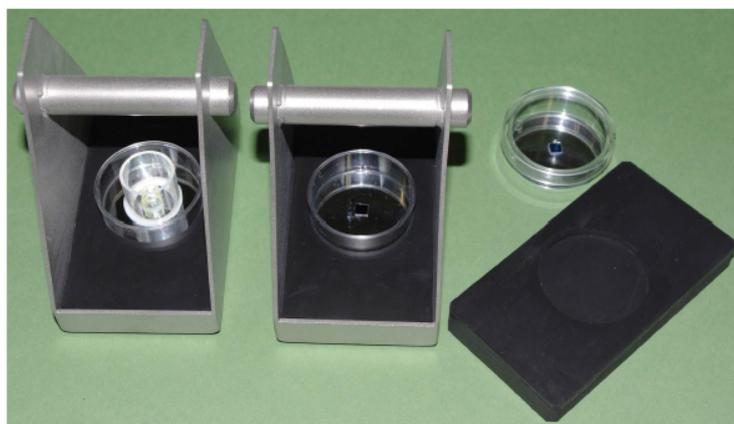


図 3.6.2 結晶化ウェルの薄膜ディッシュ用の遠心分離システム。浮かんでいるあるいは懸濁している結晶や析出物を SEM 観察用に沈降させる。中央に穴の開いたラバーが薄膜ディッシュ用のアダプターである。

3.6.2.6 塩化ナトリウムの結晶化

上記したように、顕微鏡ではタンパク質結晶と塩結晶の区別をすることは容易でない。そこで、大気圧 SEM で両者を区別できるか検討するため、タンパク質結晶と塩化ナトリウム結晶を観察し比較した。塩化ナトリウムは、10 μ l の 5 M 塩化ナトリウム溶液と 200 mM の酢酸ナトリウムバッファー(pH 4.7)から同様に結晶化させた。

3.6.2.7 観察条件

一部の顕微鏡観察を除いて、全ての顕微鏡・電顕観察には顕微鏡・大気圧 SEM 複合システムを用いた。TAF-18 結晶の顕微鏡観察には、ZEISS の Discovery V8 を用いた。大気圧 SEM 観察には、標準の薄膜ディッシュ、あるいは、上記したタンパク質結晶化用の特殊ディッシュを用いた。大気圧 SEM 観察には、20 あるいは 30 keV のランディングエネルギーを用いた。一枚の画像をスロー撮像するのに 80 秒必要であるが、図 3.6.7, 3.6.8, 3.6.9 のように

数 μm の結晶を観察するのに十分な2,000倍の倍率で薄膜ディッシュのウインドウ内全面を観察するのに28分必要であった。観察時の電子線照射ドーズは、3 electrons/ \AA^2 あるいはそれ以下であり、ナトリウムチャンネルタンパク質の単粒子解析を行った際の1/7である(Sato et al., 2001)。硫酸銅結晶化の大気圧SEM観察では、フレームレート0.15秒で4回の積算を行い、連続撮像した結果をビデオに記録した。

3.6.3 結果および考察

3.6.3.1 塩結晶とその成長の観察

薄膜ディッシュが大気に開放されている特徴を活用して、大気圧SEMを用いて5,000倍で観察をしながら、ディッシュ上で暖めた硫酸銅溶液の一部を蒸発させるとともに冷却した(図3.6.3)。60秒ごとにキャプチャーした画像を図3.6.3(a)-(c)に示す。互いに対辺が平行な明るい六角形が、観察の最中に成長した。これは、後に顕微鏡による観察から、ブルーの硫酸銅5水和物であることが明らかになった。結晶成長を明瞭に示すために、図3.6.3(d)-(f)に差分画像を示す。図3.6.3(d)は図3.6.3(b)から図3.6.3(a)を差し引いた画像であり、図3.6.3(e)は図3.6.3(c)から図3.6.3(a)を差し引いた画像である。矢印は、主に成長した部分を示す。最大の外方向への成長は図3.6.3(d)にて約2 μm であり、3.6.3(e)にて3.9 μm であった。その他の領域では120sの間の成長は0.5 μm 以下であり、異方的な成長であることが示された。3.6.3(f)は、3.6.3(a)の後216秒から8秒間の結晶成長を示す。この8秒間に、結晶は矢印で示すように0.84 μm 急速に成長した。これは、後者の成長がそれまでの成長よりも早いことを示す。オリジナルのビデオ画像は、文献(Maruyama et al., 2012b)のサプレメンタリーFigure S1とS2に示されている。

顕微鏡と大気圧SEMの比較、および、大気圧SEMによる結晶成長の観察は、大気圧SEMが溶液中の結晶観察に適していることを示す。

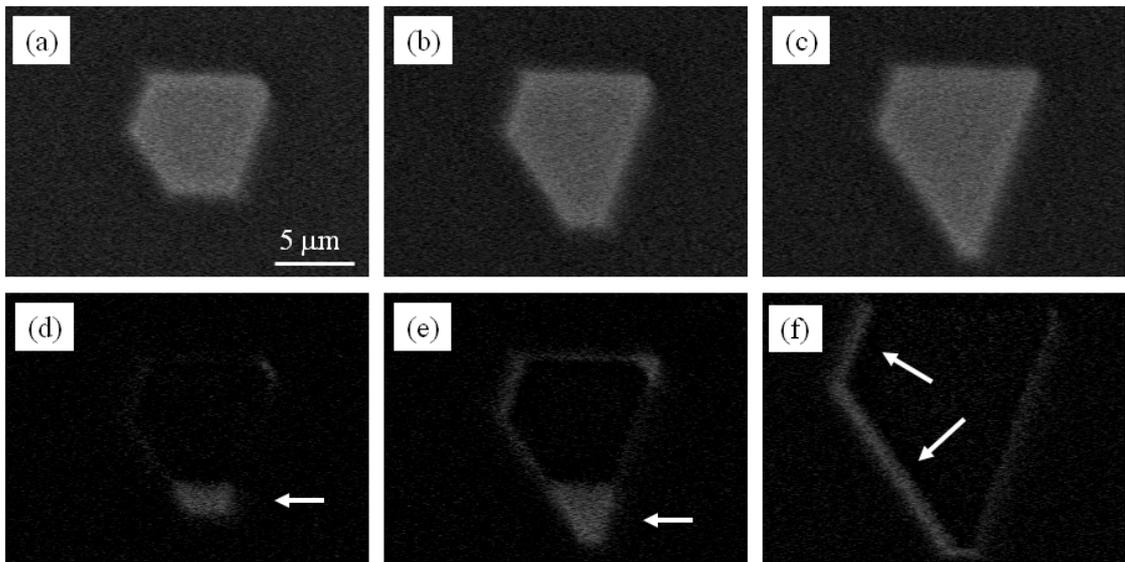


図 3.6.3 大気圧 SEM で観察した硫酸銅の結晶成長。(a-c) 飽和硫酸銅溶液中の結晶化を大気圧 SEM で連続的に観察しビデオ記録したものからキャプチャーした画像。明るい領域は、蒸発と温度低下に伴い徐々に成長した硫酸銅 5 水和物結晶と解釈された。時間間隔は 60 秒である。(d-f) 硫酸銅の結晶成長。(d) 図(b)から図(a)を引いた差分画像。(e) 図(c)から図(a)を引いた差分画像。(d)と(e)の矢印の明るい部分は、異方的な成長を示す。(f) 図(a)から 224s 後の画像から 216s 後の画像を引いた差分画像は、8 秒間の急速な結晶成長を示す。オリジナルのビデオ画像は、文献(Maruyama et al., 2012b) のサプレメンタリーFigure S1 と S2 に示されている。

次に、光顕では観察が困難な小さな硫酸銅結晶の観察を試みた(図 3.6.4 上段左)。大きさが 300 nm の結晶が異方的に成長し、32 分の間に約 5 倍の大きさになった(図 3.6.4 下段右)。硫酸銅結晶成長の観察により、それぞれの結晶面の成長速度が異なること、および、結晶成長速度が一定でないことがわかった。これらの特徴は、結晶欠陥、ランダムな表面の吸着、結晶の歪、変形、あるいは、不純物の混入などに起因すると考えられている(Mullin, 2001)。

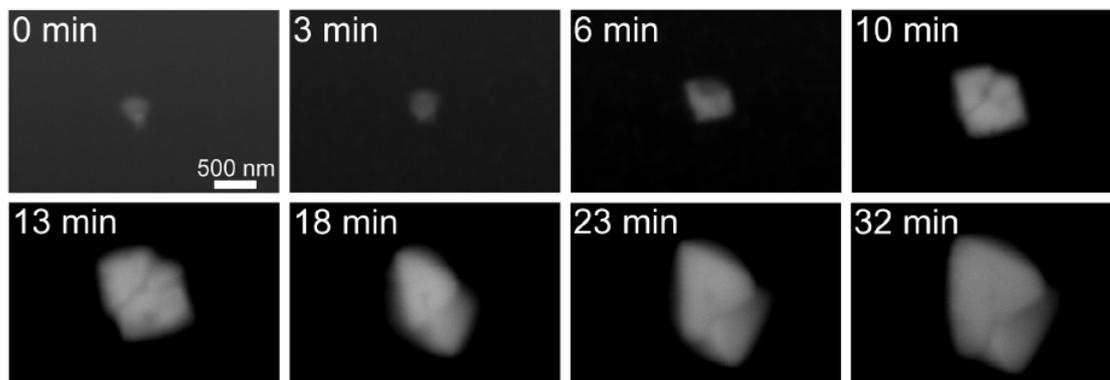


図 3.6.4 光の波長よりも小さな硫酸銅結晶の成長。300 nm の硫酸銅結晶をタイムラプスイメージングでモニターした。左上の数字は、経過時間である。

3.6.3.2 タンパク質結晶の金属染色

次に、溶液中のタンパク質結晶の観察を試みた。正方晶のリゾチーム結晶を薄膜ディッシュ上で形成し、光顕で観察した(図 3.6.5 (a), (d))。2.2.2 項に記載したように、BSE の量は試料の原子番号と密度に関係している。原子番号が大きく密度が高い場合、明るく観察される。タンパク質を構成する原子の平均原子番号や密度を考えると、タンパク質の結晶は水溶液によるバックグラウンドの中で若干明るく観察されると予測された。コントラストを高くするために、リンタングステン酸(PTA)によるリゾチーム結晶の染色を実施した。洗浄した後、洗浄バッファー中の結晶は大気圧 SEM で明るい多角形として観察された(図 3.6.5 (b), (c))。その外形は、光顕像に良く対応した(図 3.6.5 (a))。正方晶のリゾチーム結晶には、4つの六角形面 $\{110\}$ と8つの四角形面 $\{101\}$ がある。4つの $\{101\}$ 面は互いに隣り合っており、結晶内でピラミッド構造を形成する。ピラミッドの横は、4つの六角形面 $\{110\}$ である(Li et al., 1999)。

従って、図 3.6.5 (c)の画像は $\{101\}$ 方向からの視野である。その他の画像は、五角形の外形である(図 3.6.5 (e))。ただし、光顕では空間分解能限界のために不明瞭な六角形状の外形である(図 3.6.5 (d))。厚い結晶の中心部は白くみえるが、周辺部は暗く見える。結晶のエッジが不明瞭なのは、これらがアモルファス窒化シリコン(SiN)面から離れているためと考えられる(Nishiyama et al., 2010)。より高い倍率で結晶の左側のエッジを観察(x10,000倍)したところ、標準的なパーティション構造が観察された(図 3.6.5 (f))。PTAでの染色により、一部のリゾチーム結晶は薄膜から洗い流されてしまった(図 3.6.5 (b)を(a)と比較のこと)。

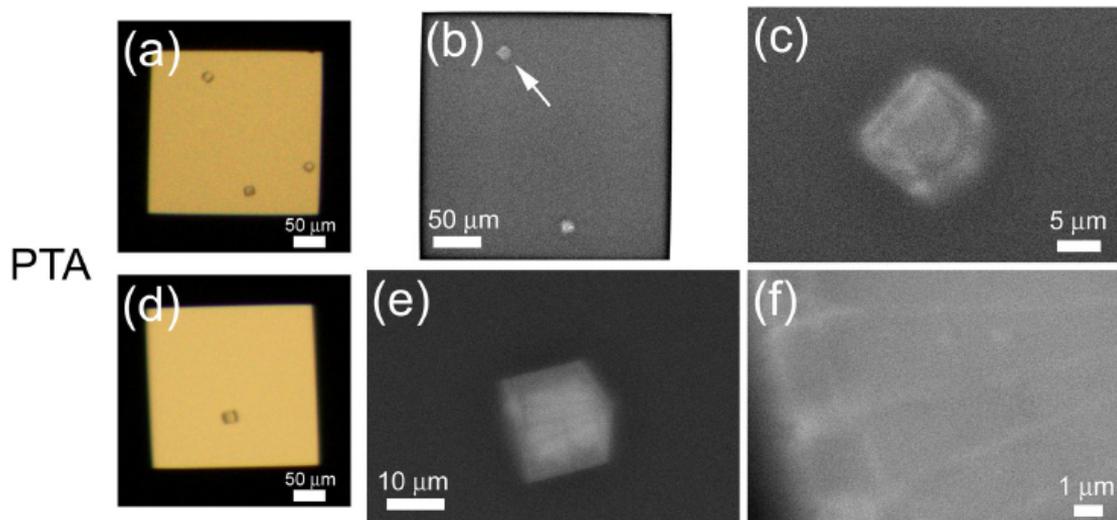


図 3.6.5 リンタングステン酸で染色したリゾチーム結晶。(a, d) 光顕像。(b) 光顕像(a)に対応する低倍率の液中大気圧 SEM 像。ただし、(b)の右側にある結晶は洗浄により消失した。(c) (b)の矢印で示した結晶の拡大像。(e) 光顕像(d)に対応する低倍率の液中大気圧 SEM 像。(f) (e)の拡大像。結晶内部の構造を確認できた。全ての大気圧 SEM 像は、結晶を 1 % リンタングステン酸(PTA)で染色した上で撮像した。

3.6.3.3 リゾチームマイクロ結晶の染色

タンパク質のマイクロ結晶を大気圧 SEM で観察できるか検討するため、次に 1 μm 程度のリゾチームマイクロ結晶の観察を試みた。光顕でマイクロ結晶を検出した直後(図 3.6.6 (a))に、洗浄バッファーにより結晶成長をストップさせた。染色した後、正方晶の 2 x 2.5 μm の結晶を大気圧 SEM で、20,000 倍(図 3.6.6 (b))あるいは 60,000 万倍(図 3.6.6 (c))で観察した。結晶には密度の高い中心部があり、白く染色された。

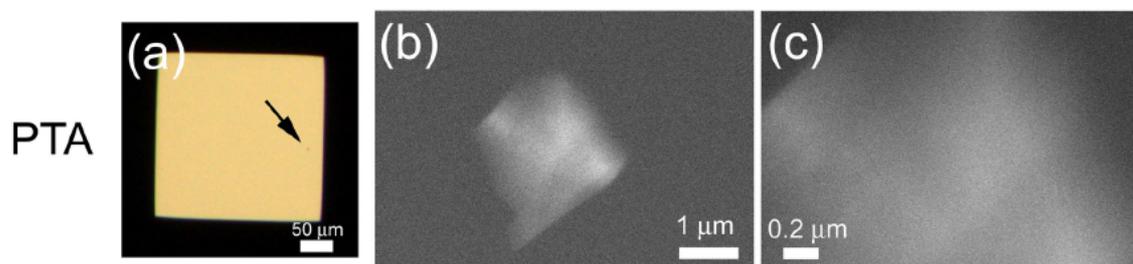


図 3.6.6 PTA で染色したリゾチームのマイクロ結晶。(a) 光顕像。(b) (a)の観察後、1 % PTA で染色した大気圧 SEM 像。(c) (b)の高倍率像。(b), (c)では、マイクロ結晶(大きさ約 2 x 2.5 μm, (a)の矢印部分)が明瞭に観察された。

PTA による染色に対して白金ブルーを用いた染色では、低倍率(x330)で結晶は暗く観察された(図 3.6.7 (b))。より高い倍率(x2,000)では、結晶の周囲は白いが(図 3.6.7 (c))、PTA で染色した場合と比較して画像のコントラストは低かった。白金ブルーがあまりタンパク質を染色しないことを反映したと考えられる。従って、タンパク質の染色には PTA の方が適している。

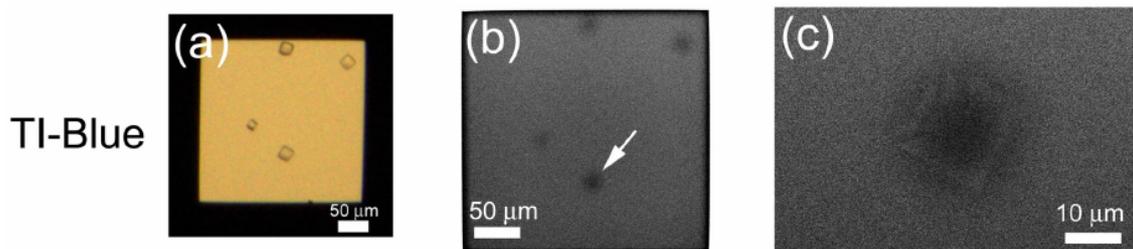


図 3.6.7 白金ブルーで染色したリゾチーム結晶。(a) 0.3%白金ブルーで染色したリゾチーム結晶の光顕像。(b) (a)に対応する大気圧 SEM 像。(c) (b)の矢印の結晶の高倍率大気圧 SEM 像。白金ブルーは、あまりタンパク質を染色しなかった(図 3.6.8 の染色していない画像と比較のこと)。

3.6.3.4 結晶化バッファー中の染色していないリゾチームタンパク質結晶

PTA による染色でコントラストは増加するが、染色は実験のスループットを低下するとともにタンパク質結晶を溶解させるかもしれない。迅速に自然な状態を観察するため、染色していないタンパク質結晶の *in situ* 観察を試みた。リゾチーム結晶を光顕で確認した(図 3.6.8 (a))後、結晶を大気圧 SEM を用いて異なる倍率で観察した(図 3.6.8 (b)-(d))。結晶は、周辺が明るく中心が暗く観察された(図 3.6.8 (d))。大気圧 SEM 像はノイズが多くコントラストは低い、結晶が平行四辺形の形状なことは明瞭であり、光顕の像に一致していた。

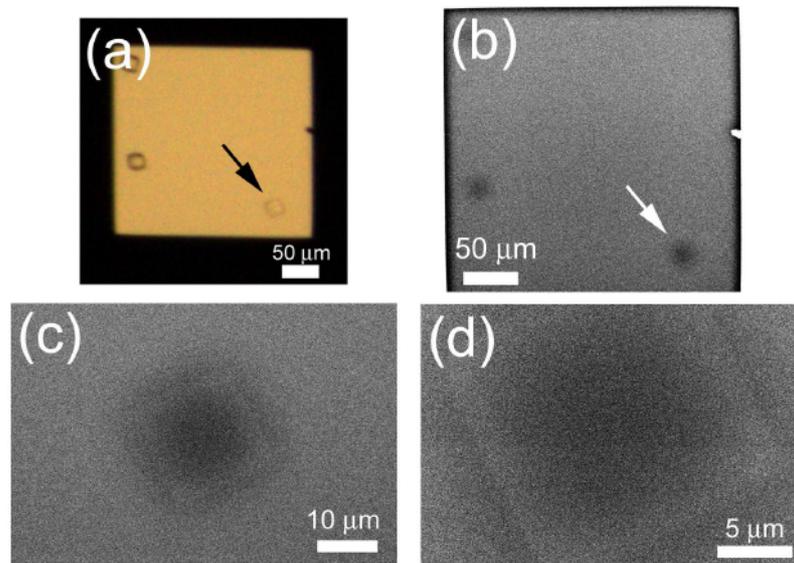


図 3.6.8 結晶化溶液中の染色していないリゾチーム結晶。(a) リゾチームの結晶の光顕像。(b) (a)に対応する大気圧 SEM 像。(c) (b)の矢印の結晶の拡大像。(d) (c)の拡大像。結晶の形状はクリアであるが、画像はノイズが多くかつコントラストは低い。

3.6.3.5 染色していない TAF-1 β 結晶の観察

次に、他のタンパク質結晶の無染色観察を試みた。シッティングドロップ方式を用いた蒸気拡散法で、ヒストンシャペロンである TAF-1 β を結晶化した(Muto et al., 2004)。薄膜ディッシュの SiN 膜の上に、少量(4 μ l)の溶液をのせて、10 μ l の結晶化バッファーを添加した後カバースリップでカバーした。そして、液滴の中のマイクロ結晶を染色せずに大気圧 SEM で観察した(図 3.6.9)。結晶は再び暗く観察され、外形が台形あるいは三角形の複数の層からなる薄膜結晶が観察された(図 3.6.9 (a))。いくつかの結晶は、単結晶であった(図 3.6.9 (b))。大気圧 SEM で観察できる最小の大きさは、数 μ m であった。形状とマイクロ結晶の多層構造は、光顕で観察された大きな TAF-1 β の結晶と類似であった(図 3.6.10)。可視光の波長よりも大きな寸法であっても、光顕でこのような構造を観察するのは容易でない。

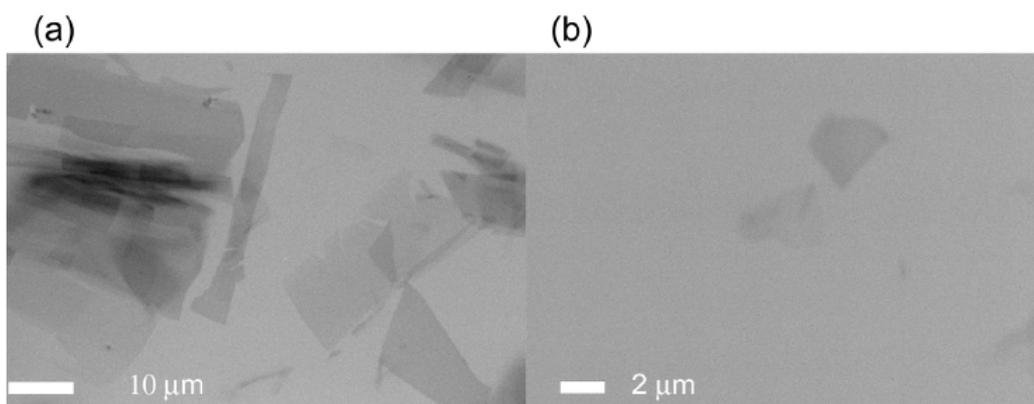


図 3.6.9 液滴溶液中の染色していない TAF-IB 結晶。(a, b) 大気圧 SEM で観察した TAF-IB 結晶。大きさ数 μm の結晶を観察できた。(a) の画像では、外形が台形あるいは三角形の多層の薄い結晶であった。また、(b)に示すように、いくつかの結晶は単層であった。画像にはノイズが多く、またコントラストは低かった。大気圧 SEM で観察できる最も小さな結晶は、大きさが数 μm であった(図 3.6.10 の光顕像と比較のこと)。

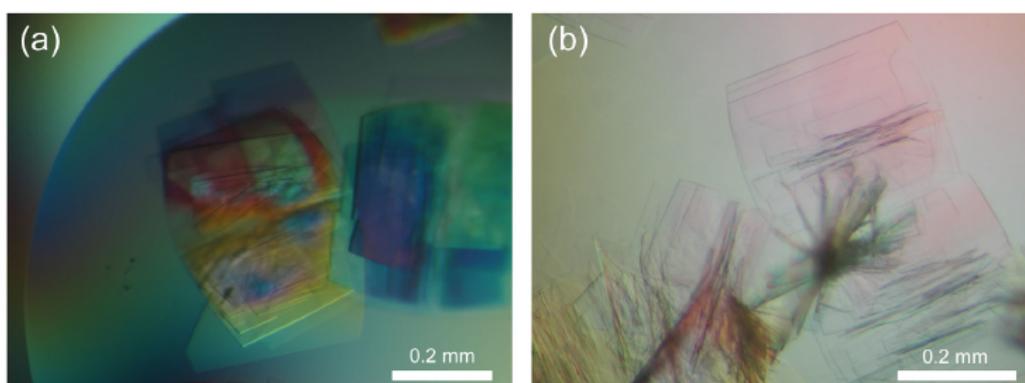


図 3.6.10 結晶化溶液中の染色していない TAF-IB 結晶。(a), (b) 光顕像。光顕により、大きさが約 0.4 mm x 0.4 mm の台形あるいは三角形の多層結晶であることがわかった。

3.6.3.6 染色していないリパーゼ B 結晶の *in situ* 観察

リパーゼ B タンパク質を、タンパク質結晶化薄膜ディッシュの結晶化ウェル中で蒸気拡散法により結晶化した。結晶化を光顕(図 3.6.11 (a))で確認した後、染色せずに大気圧 SEM で観察した(図 3.6.11 (b)-(d))。リパーゼ B の結晶は、光顕像に対応して、大気圧 SEM では低倍率で黒い四角として観察された(図 3.6.11 (b))。高い倍率では、結晶は周囲が明るく中心が暗い四角形として観察され(図 3.6.11 (c), (d))、その姿は染色していないリゾチーム結晶と類似であった。

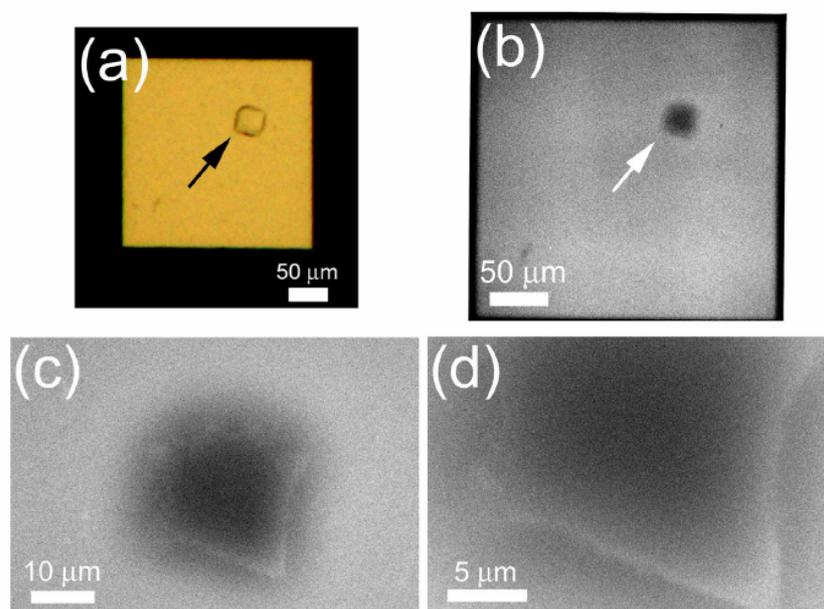


図 3.6.11 結晶化バッファー中の染色していないリパーゼ B の結晶。結晶化薄膜ディッシュ上でリパーゼ B を結晶化し、結晶を(a) 光顕と(b-d) SEM で観察した。矢印は、高倍率で観察した結晶である。

3.6.3.7 塩とタンパク質結晶の違い

タンパク質結晶化スクリーニングの際に、塩の結晶が結晶化液滴の中に時々現れて、光顕ではこれらをタンパク質結晶と区別できないことがある。これに対し、大気圧 SEM を用いることにより、塩化ナトリウムの結晶はタンパク質の結晶よりもはるかに明るくかつクリアに見える(図 3.6.12 (a))ので、タンパク質の結晶(図 3.6.8, 図 3.6.9)と簡単に区別できる。これは、大気圧 SEM の優位点である。TAF-IB を結晶化するための液滴内の硫酸アンモニウムは、明るさが大きく異なるために、大気圧 SEM 画像にて TAF-IB と簡単に区別ができた。

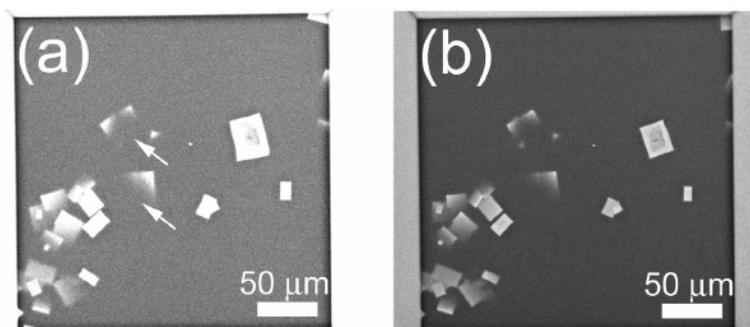


図 3.6.12 結晶化バッファー中の NaCl 結晶。(a) 図 3.6.11 (b)と類似条件で電顕観察した。NaCl 結晶はリゾチーム結晶よりもずっと明るく観察された。ただし、大気圧 SEM で観察できる深さを超えている領域(矢印)は例外である。(b) (a)の飽和していない画像。

タンパク質と塩の結晶は、光顕では基本的には区別できず、通常は光顕で見える 0.05 - 1 mm の結晶が暫定的な回折の実験に用いられる。紫外光に基づく方法もタンパク質を認識するために用いられる(Judge et al., 2005) が、結晶からの蛍光強度はトリプトファン含有量に依存する。さらに、これらの方法でマイクロ結晶を解析するのは容易でない。タンパク質のマイクロ結晶を検出するために、2つの光学的な手法が開発された。動的光散乱(DLS: Dynamic light scattering)では、溶液中における光散乱の周波数ゆらぎを計測することにより粒子系を調べるが、Betzel のグループにより結晶化スクリーニングに用いられた(Dierks et al., 2008) 。これにより、核形成の段階から、タンパク質粒子のサイズを調べることができる。しかしながら、これは結晶を可視化するわけではなく、形態に関する情報が欠如している。キラル結晶の2次の非線形光学(SONICC : Second-order non-linear optical imaging of chiral crystal)により、懸濁液中にて選択的にタンパク質結晶を可視化することが可能であり、5 μm のタンパク質結晶の可視化に成功した(Kissick et al., 2010) 。これらに対し、大気圧 SEM では塩化ナトリウム結晶をタンパク質と簡単に区別することができた。塩化ナトリウム結晶は、タンパク質結晶よりもはるかに明るかった。電子の反射は試料の原子番号と密度に依存するため、より強い塩からの信号は典型的なタンパク質を構成する元素(H, 1; C, 6; N, 7; O, 8; S, 16)よりも塩の元素 (Na, 11; Cl, 17)が大きいこと、および、典型的なタンパク質の密度(1.37 g/cm³)よりも塩の密度(2.18 g/cm³)が高いことに起因する(Matthews, 1968) 。これは、大気圧 SEM に塩とタンパク質結晶を区別できる優位点があることを意味する。このようなタンパク質と塩の区別は、低倍率の大気圧 SEM でウインドウ全体を観察することが可能であるため、大きな結晶に対してはとても迅速に行うことが可能である。さらに、大気圧 SEM では透明でない試料を観察できるので、キュービックフェーズ法(cubic phase crystallization)に適用できる。

ここでタンパク質の結晶は、特に中央が取り囲むバッファーより暗く見えることがある。中央が暗いのに対しエッジが明るいのは、検出器までの BSE の経路によると思われる。すなわち、周辺部では結晶を介してだけでなくまわりのメディウムを介して BSE が検出器に戻るが、メディウムを介する場合は結晶を介するよりも散乱が少ないために多くの電子が反射されると考えられる。TAF-IB の暗いコントラストは、バッファーに高い濃度(1.43 - 2.85 M)で硫酸アンモニウムが含まれること、リパーゼ B あるいは塩化ナトリウムの場合バッファーに中程度の濃度(0.5 - 1 M)で硫酸アンモニウムが含まれること、および、リゾチームの場合低い濃度(0.65 - 0.75 M)であることに起因すると思われる。

3.6.3.8 他的高分解能顕微鏡技術と大気圧 SEM の比較

古典的な電顕を用いて *in situ* で結晶を観察することは、試料を真空チャンバーの中に配置しなければならないために困難であった。環境セルは試料を湿った状態に保つが、通常は容量が 15 μl 以下であり、蒸気拡散法を用いるには少なすぎる。20 μl の容量を持つ SEM 用環境セル(Thiberge et al., 2004b) を用いて、カプセル上部の薄膜にぶら下がっている液滴を観察することが可能であり、薄膜から大気圧 SEM と同程度の距離にあるものを観察できる。しかしながら、タンパク質結晶が液滴の底側に形成された場合、観察は困難である。原子間力顕微鏡(AFM)は高分解能で液中試料の表面形状を観察可能で(Engel, 1991)、動的にタンパク質結晶の形成を明らかにした(Durbin and Carlson, 1992) (Durbin et al., 1993)。しかしながら、結晶の近くにある AFM の探針が結晶化に与える影響はよくわかっていない。大気圧 SEM は観察レート(0.15s/frame)が早いため、AFM と相補的に用いることができるだろう。大気圧 SEM は、薄膜ディッシュの薄膜の高さが常にほぼ同じであることから、フォーカスの位置がいつもほぼ同じであるため操作が容易である。その能力と形態的な優位性から、大気圧 SEM はタンパク質結晶化のスクリーニングツールに用いることができるだろう。

3.6.4 本節の結論

倒立 SEM と通常の光顕から成る光顕・大気圧 SEM 複合システムは、最初は細胞や組織を観察するために開発されたが、新しく開発した底に電子線を透過する薄膜を持つ結晶化薄膜ディッシュを用いることにより、結晶化バッファーの中でマイクロ結晶を観察することができる。大気圧 SEM は、染色なしに数 μm のマイクロ結晶を観察できるので、タンパク質結晶の最初のスクリーニングに有効であろう。これにより、スクリーニングの初期段階から結晶化条件を最適化することができる。さらに、コントラストの違いにより、塩の結晶とタンパク質を区別できる。

3.7 本章の総合的な議論

大気に解放された試料室を持つ大気圧 SEM の開発により、バイオ系試料については液中の試料を簡単かつ迅速に観察できるようになった。これにより、基礎的な研究だけでなく、検査や術中診断を含め様々な可能性が示された。また、タンパク質の結晶化など、バイオ機能の直接観察以外の可能性も示された。材料系試料については、動的な観察ができるようになった。これにより、様々な物理・化学的な現象を観察できるようになると予測される。サイエンスだけでなく、広く産業分野にも応用されていくものと予測される。

4. 高分解能 SEM

本章では、最新の高分解能 SEM でナノ材料をどのように評価できるか記載する。

4.1 本章の背景と目的

近年の低加速高分解能 SEM の性能向上により、ナノ材料をどのように評価できるようになったかを調べるため、5つのナノ材料を観察した。第一の材料は、ヨークシェル材である(Galeano et al., 2011)。ヨークシェル材は、中空の殻を有することにより、その表面積を大きくできることが最大の特徴である。また、殻の内側に別の材料を付与することができるために、例えば効率的な触媒を形成できる。しかしながら、その性能を最適化するためには、殻と内部に付与する材料を分離して評価することが必須であった。本研究では TiO_2 から成る殻の内側に金のナノ粒子を配置したヨークシェル材(Au@TiO_2)を用いて、エネルギーフィルタ付きの TTL 検出システムを有する高分解能 SEM で、SE 成分と BSE 成分をそれぞれ検出することにより、それぞれの材料を特定した観察ができることを示す。

第二から第四の材料は、ポーラス材料である。ポーラス材料は、緒言にも記載したように、多数の空孔を有するためにガスの吸蔵、分離、触媒として用いられると期待されている。しかしながら、これらの空孔が外部に接続されているかが性能に大きな影響を与える。そこで、SEM で表面構造を評価し、構造を最適化することが極めて重要である。ただし、ポーラス材料には絶縁体が多く、かつ、電子線照射によりダメージを受けるものも多い。電子線照射によるチャージやダメージを抑制するため、低ランディングエネルギーでの観察が必須である。本研究では、第二の材料としてメソポーラスシリカである LTA(Cho et al., 2011)、第三の材料として IRMOF(Deng et al., 2012)、第四の材料としてメソポーラスシリカである SBA-15(Kjellman et al., 2013)を評価した。これらはいずれもポーラス材料として大きく期待されているが、絶縁体であり、かつ、電子線の照射でダメージを受けやすい。ランディングエネルギーを小さくした観察でチャージとダメージを抑制できるとともに、電場と磁場を組み合わせた対物レンズを用いることにより、低ランディングエネルギーでも高分解能観察が可能なことを示す。

第五の材料は、螺旋状の構造を有する TiO_2 である(Liu et al., 2012)。この材料は、その特殊な構造により、電子遷移に基づく光学活性を有する。その特性を改善するためには構造の最適化が必要であるが、アニールしていない試料は電子線照射によりダメージを受けるために SEM 観察が困難であった。また、その構造は微細であり、これまでの SEM で観察することは容易でなかった。電場と磁場を組み合わせたレンズを用いることにより、低ランディングエネルギーでこのような材料の構造を観察できることを示す。

4.2 ヨークシェル材

ヨークシェル材は、中空の TiO_2 , ZrO_2 およびカーボンから成る多孔質の殻（あるいはサポート）に金のナノ粒子をキャストすることにより合成した(Galeano et al., 2011)。これらを Au@TiO_2 , Au@ZrO_2 および Au@C と呼ぶ。シリカを使った方法では、最初に $\text{Au@SiO}_2\text{@X}$ (X は TiO_2 , ZrO_2 あるいは カーボン)をつくり、次に SiO_2 のコアを水酸化ナトリウム水溶液で選択的に取り除いた。これらの材料は、多孔質の壁の触媒作用と金ナノ粒子固有の触媒作用を有する。また、このヨークシェル材は、高温においても構造的・組成的に安定であり、支持体による効果と粒子サイズによる効果を分離できるため、異成分から成る触媒の調査に理想的である(Galeano et al., 2011)。電子線回折(ED: Electron Diffraction)および明視野高分解能 TEM(BF-HRTEM)像(図 4.2.1 (a)-(c))より、 TiO_2 は規則正しく切り取った正方晶系のピラミッドを組み合わせた形態を持つアナターゼ構造であることがわかった。金粒子は直径が約 17 nm の球状で、時々双晶であった。

フィルターのバイアス電圧を-500 Vとした TTL 検出により、USD と UED でエネルギーの低い電子と高い電子を同時に検出できた。これらの電子は、それぞれ主に形態情報を持つ SE と組成情報を持つ BSE である(図 4.2.1d, e)。UED で得られた BSE 像の空間分解能は、予測されたように、試料バイアスを高くすることにより改善された(図 4.2.1f-h)。ただし、ランディングエネルギーとビーム電流は一定とした。

図 4.2.1 (d)の USD 像からは、主に詳細な形態の情報が得られる。また、図 4.2.1 (e)では、コントラストの高い金粒子の部分と TiO_2 の部分を分離できる。このようにして、2つの材料を分離するとともに、両者の形態を詳細に観察することができた。今後、様々な条件で試料を作製し、それぞれに対する観察を行うことにより、材料の構造を最適化できると期待される。

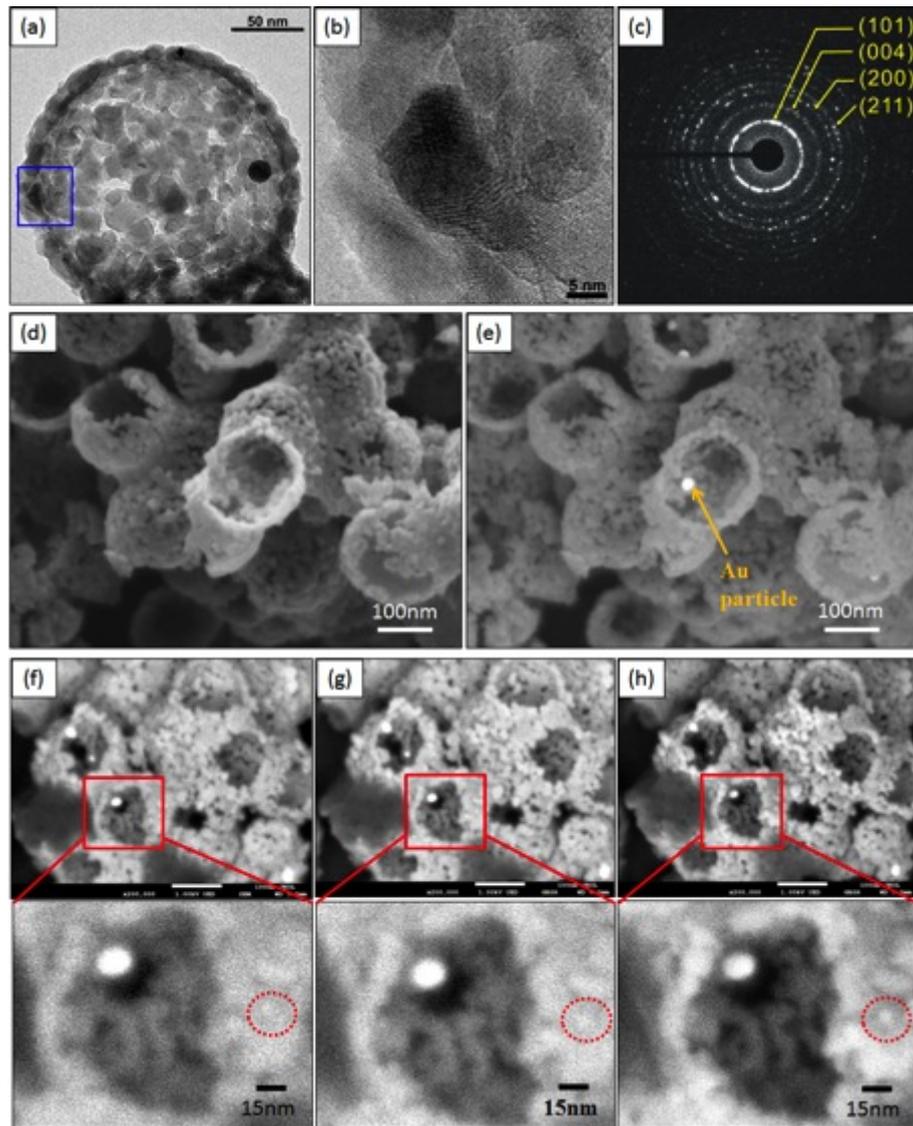


図 4.2.1 ヨークシェル材(Au@TiO₂)の電顕写真。(a-c) TEM (ARM-200F)を用いた Au@TiO₂のナノ構造解析。(d,e) 検出信号をエネルギーフィルタした SEM の像。ランディングエネルギー = 2 keV。UED フィルターバイアス = -0.5 kV。(d) 主に SE より成る USD 像。(e) 主に BSE より成る UED 像。(f-h) ランディングエネルギーを一定 (1 keV)にした場合の主に BSE から成る像。ビーム電流 = 50 pA。(f) 基板バイアス電圧 = 0 V, UED フィルターバイアス = -900 V。(g) 基板バイアス電圧 = -500 V, UED フィルターバイアス = -1400 V。(h) 基板バイアス電圧 = -1000 V, UED フィルターバイアス = -1900 V。図は許可を得た上で転載: ref (Suga et al., 2014), copyright 2014 Elsevier.

4.3 メソポーラス LTA

メソポーラス LTA は、Ryong Ryoo のグループにより 4 元系アンモニアタイプの有機シランの界面活性剤を含む熱水生成条件の下で合成された(Cho et al., 2011)。クロスセクションポリッシャー(CP: *cross section polishing*)で形成したメソポーラス LTA の断面を、高分解能 SEM (HRSEM: *A high resolution SEM*)で観察した。マイクロポーラスなゼオライト結晶に入るメソポーラスなチャンネルの無秩序なネットワークの存在が示された(Cho et al., 2011)。

ランディングエネルギーが 80 eV の画像では、相互作用する領域が小さいためにあまりエッジ効果が見られなかった(Joy and Joy, 1996)。ランディングエネルギーが 1 keV あるいはそれ以上の場合には、ビームダメージが見られた(図 4.3.1)。

上記したように、80 eV の極低ランディングエネルギーで観察をすることにより、ダメージとチャージを回避した測定を行うことができた。また、電場と磁場を組み合わせた対物レンズを用いることにより、低ランディングエネルギーでも高い空間分解能の観察を実現できた。これらにより、チャンネルが表面に到達していることを確認できた。これらのチャンネルは、試料内部のミクロな孔に接続されていると考えられる。従って、本材料を吸蔵・分離・触媒に使えることが示唆された。一方で、図 4.3.1 (a)では、表面にチャンネルが存在しない領域も多かった。吸蔵・分離・触媒の効率を高めるためには、これらの領域を増やすことが有効である。今後様々な条件下で試料を形成し、本 SEM 技術を用いて表面におけるチャンネル領域を定量的に評価することにより、材料を最適化できると期待される。

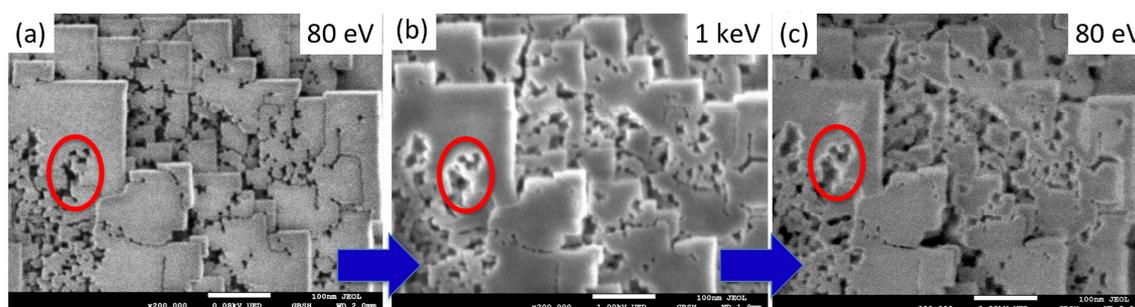


図 4.3.1 ビームダメージを低減するために、低ランディングエネルギーで取得したメソポーラス LTA の SEM 像。試料バイアス電圧を-5 kV として測定した。図は許可を得た上で転載: ref (Suga et al., 2014), copyright 2014 Elsevier.

4.4 IRMOF

Omar Yaghi のグループにより、細孔の開口が 1.4 から 9.8 nm の MOF-74 構造の等網目状シリーズ(isoreticular series; IRMOF-74-I から XI と名付けられている)が合成された(Deng et al., 2012)。図 4.4.1(b)に、球面収差補正した高分解能 TEM (HRTEM: *High*

Resolution TEM)で取得した TEM 像を示す。

電子線の密度を低減し、かつ、これに伴う S/N(信号対雑音比)劣化を複数回の撮像結果を重ねることにより補うことで、電子線照射によるダメージをできる限り小さくした(それぞれの露光時間が0.5秒の7枚の HRTEM 像を、ドリフト補正の後に重ねあわせた)。図4.4.1(c)は、GBSH (Gentle Beam Super High)のオプションを搭載した JSM-7800F を用いて、ランディングエネルギーが 300 eV の条件で取得した SEM 像である。六角形に並んだ径が約 3.5 nm の細孔が明瞭に観察された。

このように、TEM と SEM の両方を用いることにより、細孔がどのような形態であるかを明らかにできた。特に、SEM 観察により、上記の細孔が試料表面まで到達しているのを確認できた。これらの結果は、本研究で観察した IRMOF を吸蔵、分離、触媒に使えることを示唆する。

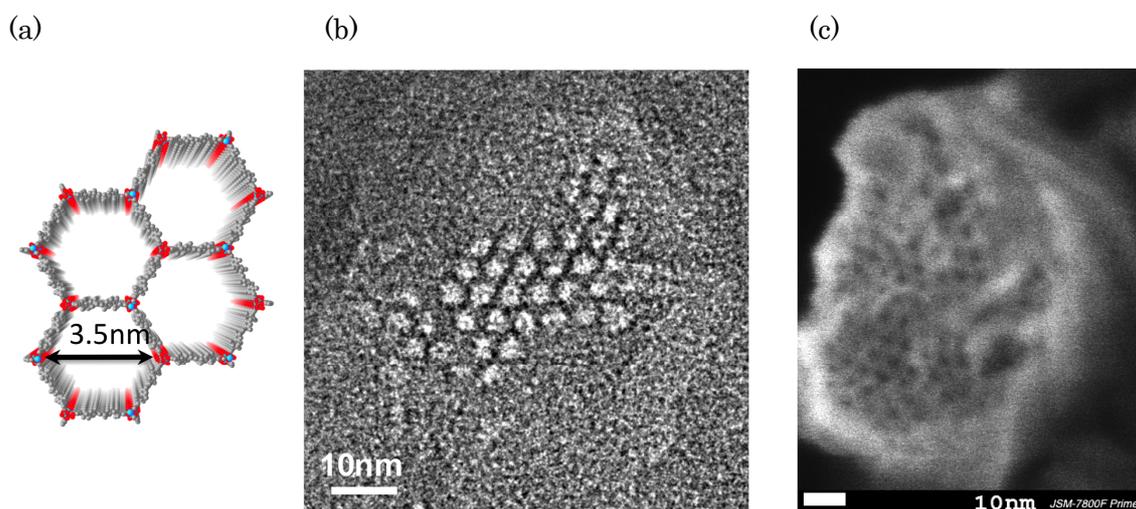


図 4.4.1 左: IRMOF-74-VII の模式図、中: TEM 像、右: SEM 像。直径 3.5 nm の細孔が明瞭に観察されている。TEM 像は、CEOS 社の球面収差補正装置を搭載した電界放出型 TEM JEM-2010F を用いて、加速電圧が 120 kV の条件で取得した。電子線密度は、50 - 130 electrons/nm²とした。SEM 像は、電子線電流 2.0 pA, ランディングエネルギー300 eV、基板電圧- 5kV (GBSH 利用)で測定した。図は許可を得た上で転載: ref (Suga et al., 2014), copyright 2014 Elsevier。

4.5 メソポーラスシリカ結晶(SBA-15)

メソポーラスシリカの結晶 SBA-15 は、*p6mm* の空間群を持った 2 次元の六方晶系に配列したメソサイズの穴(チャンネル)を有する。結晶は、メインのメソサイズの穴に加えて、アモルファスのシリカ壁を貫く無秩序な穴からなる複雑な多孔性を有する(Kjellman et al.,

2013)。作製方法を変更することでメソサイズの穴にあるプラグの割合を変えることができるが、プラグがないとメソサイズの穴は外部から遮断されるので、メソサイズの穴は外部の化学的な試薬やガス分子にアクセスできない。一般的に窒素の吸着によりメソ多孔質の多孔性に関する価値ある情報が得られるが、多孔性に関する詳細な情報は直接的な観察によってのみ得られる。

SBA-15 の高分解能観察では、特にチャージの影響が問題となる。これを解決するために、ランディングエネルギーを 300 eV にして電子のイールドを高くした。ランディングエネルギーとビーム電流を一定にしたままで、カラム内の電子エネルギーを高くし、かつ、基板バイアス電圧を大きくした(例えば図 4.5.1 (a)と(b)を比較のこと)。これにより、空間分解能と S/N の両方が改善された。チャンネル間のマイクロ穴とチャンネル内のプラグの両方が観察された (図 4.5.1c)。

このように表面のプラグとマイクロポアを明瞭に観察できたため、今後様々な条件で試料を作製した際に、これらの形態を最適化するのに有効と予測される。

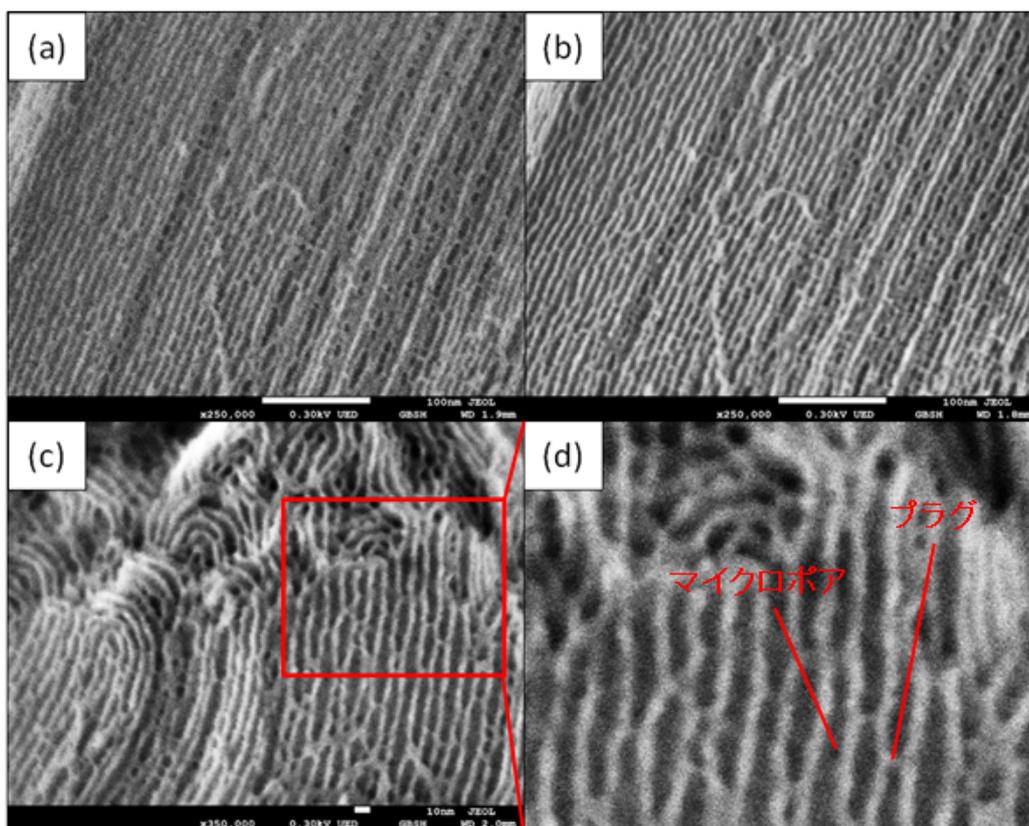


図 4.5.1 SBA-15 の高分解能 SEM 像。ランディングエネルギー = 300 eV。ビーム電流 = 5.5 pA。(a) 試料バイアス = -2 kV。(b, c) 試料バイアス = -5 kV。試料は観察前に 300 eV のアルゴンビームで 10 分間クリーニングした。(d) (c)の四角領域のデジタルズーム像。マイクロポアとプラグが明瞭に観察された。図は許可を得た上で転載: ref (Suga et al., 2014),

4.6 螺旋状の TiO₂

Shunai Che のグループにより、配位結合力を用いてアミノ酸により得られた両親媒性の脂質の光学異性体のヘリカルな構造を転写することにより、電子遷移に基づく光学活性を有するキラルな TiO₂ のナノファイバーが合成された(Liu et al., 2012)。キラル状のファイバーは、ファイバーの軸方向に対して幅が 25 nm 程度で長さが 100 nm 程度であった。サイズが小さいために、通常の SEM ではヘリカルな形態を詳細に観察にすることは困難であった。カラム内での電子のエネルギーを高くし、かつ、基板にバイアス電圧を印加することにより、ランディングエネルギーが低くても細い電子線を形成することによりファイバーの観察を実現した(図 4.6.1 (a), (b))。対応する HRTEM とモデルを図 4.6.1 (c)と図 4.6.1 (d)にそれぞれ示すが、中心軸に沿って内径 12 nm のチューブ状の構造が観察される。形成された直後のアモルファスの hybrids は、焼結(calcine)により 20 nm 程度のアナターゼ微結晶が積層した TiO₂ 結晶に変化する(図 4.6.1 (f), (g))。

焼結した試料は電子線照射に対して安定であったために、より高い空間分解能を得るために高めのランディングエネルギーで観察した(図 4.6.1 (e))。これに伴うチャージの増加は、ワーキング長を短くすることにより対応した。図 4.6.1 (f)に、アナターゼ構造の<111>ゾーンに近い方向に電子線を照射した際の高分解能 TEM 像を示す。隣り合うナノ結晶は、回転方向に少しずつずれて配置されており、ひとつの<111>軸を共通に有したまま、ひとつの{101}ファセットを共有して積み重なっており、ほぼ<111>軸に平行なナノ結晶のヘリカルな配列となっている(図 4.6.1 (g))。これらの結果から全てのナノ結晶の構造的な関係を決定するのは、結晶が重なっておりかつ結晶サイズが小さいことから困難である。結晶化のプロセスは、中空のチューブ状の構造は消滅するが、形成されたままの試料で最初に形成された二重のヘリカルな形状の特徴を保ったまま、局所的に起こると考えられる。

ヘリカルな TiO₂ ファイバーは、アモルファス、および、焼結によりアナターゼ結晶になったもののそれぞれが、円偏光の光に対して~350 nm に吸収エッジを有する。これは、非対称な電場のもとで、半導体的な特性を有する TiO₂ にて価電子帯から伝導帯に電子遷移することによると考えられる。

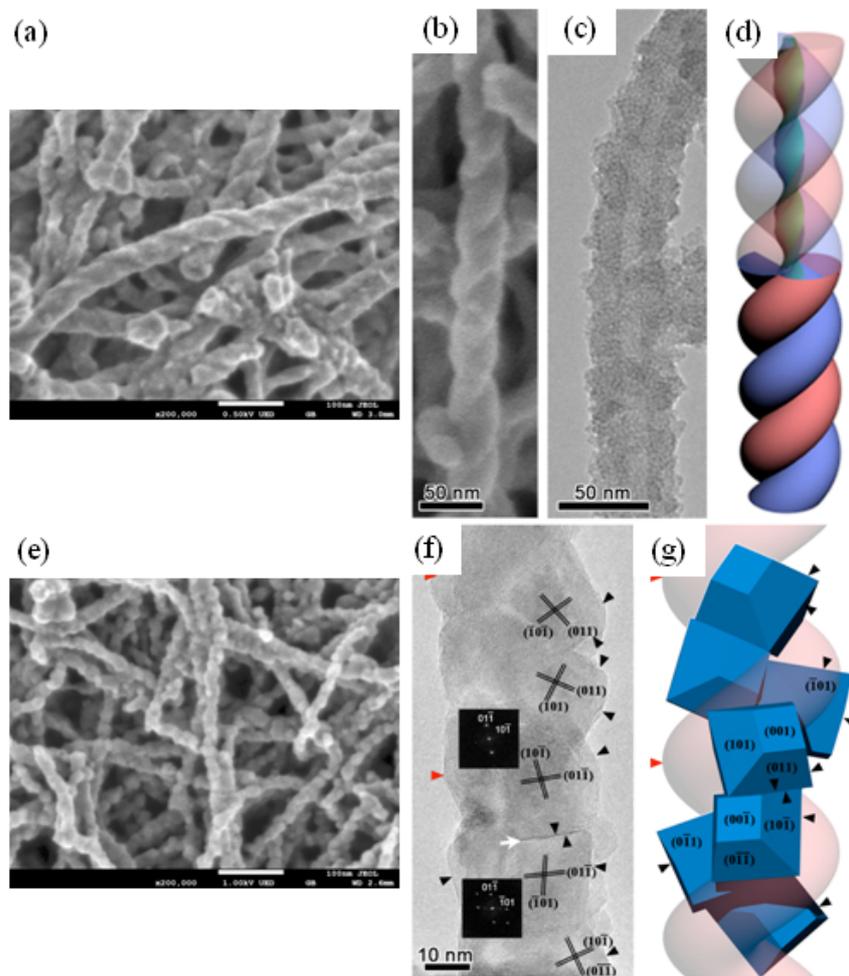


図 4.6.1 (a-d) 有機脂質から得られた焼結していないヘリカルな TiO_2 。(a,b) 高分解能 SEM 像。ランディングエネルギー = 500 eV。基板バイアス = -2 kV。ワーキング長 = 3 mm。(c) TEM 像。加速電圧 = 200 kV。(d) 試料の模式図。(e-g) 焼結により結晶化した TiO_2 ファイバー。(e) 高分解能 SEM 像。ランディングエネルギー = 1 keV。基板バイアス = -2 kV。ワーキング長 = 2.2 mm。(f) TEM 像。加速電圧 = 200 kV。(g) 試料の模式図。図は許可を得た上で転載: ref (Suga et al., 2014), copyright 2014 Elsevier。

4.7 本章の総合的な議論

FE 電子源、および、電場と磁場を組み合わせた対物レンズを用いることにより、低ランディングエネルギーでも電子線を集束できるようになった。これらを採用した SEM を用いることにより、チャージングや電子線照射ダメージを検出できないレベルにすることが可能となり、ナノ材料の表面構造を調べることができるようになった。また、エネルギーフィルタを有する TTL 検出システムを用いることにより、構成する複数の材料を分けて検出できるようになった。これらは、ナノ材料の最適化に寄与していくと予測される。

5. 特性X線を用いた組成分析

本章では、SEMを用いた特性X線検出について記載する。5.1節では、高精度に組成を分析することによるデバイスの検査技術について記載する。5.2節では、特性X線検出のエネルギー分解能を飛躍的に向上させるための超電導デバイスを用いた素子についての基礎的な研究について記載する。5.3節では、シリコンドリフト検出器 (SDD)を用いたナノ粒子のEDS分析について記載する。

5.1 デバイスの組成検査技術

本節では、SEM/EDSの測定精度を向上し、強誘電体メモリーの開発や検査に応用することについて記載する(Suga et al., 2000)。

5.1.1 本研究の背景と目的

近年、高密度不揮発メモリーを実現するために、強誘電体を用いたキャパシターの研究が盛んに行われている(Kinney et al., 1987) (Sumi et al., 1994) (Tanabe et al., 1995) (Onishi et al., 1994) (Torii et al., 1997b)。これらのキャパシターに用いられる強誘電体材料の中で、 $\text{Pb}(\text{Zr}, \text{Ti})\text{O}_3$ (PZT)は残留分極が大きいために有力な候補のひとつである。しかしながら、PZTキャパシターの電気特性はカチオンの組成に敏感であることが報告されている(Torii et al., 1994)。このため、PZTの組成を評価し、かつ、制御することが重要である。

通常PZTのカチオン組成を評価するためには、高精度であることから誘導プラズマ発光(ICP)法が用いられることが多い。しかしながら、ICP法は破壊分析であり、かつ、測定に時間がかかる。さらには、複雑で手間のかかる試料の前処理が必要である。このため、非破壊、短時間、かつ、簡便なカチオン組成分析方法が求められていた。さらには、組成分析の空間分解能向上も求められている。なぜならば、メモリー内の強誘電体キャパシターの大きさが μm のオーダーであるのに対し、ICP法の空間分解能は mm のオーダーだからである。

SEM/EDSは、組成を評価するための手段として広く用いられている。2.5節で説明したように、試料に電子線を照射した際に、試料より発生する特性X線の強度を比較することにより組成を評価できる。SEM/EDS法は、非破壊、短時間、かつ、簡便な組成分析方法である。さらには、SEM/EDS法の空間分解能は μm のオーダーであり、メモリー用のPZTキャパシターと同程度である。しかしながら、通常のSEM/EDSの評価精度は数%程度であり、キャパシター中のPZT組成を評価するためには不十分であった。

本研究では、高精度なSEM/EDS法を検討した。試料からの信号発生深さを制御するこ

とにより、PZT からの信号を選択的に得た。これは、ランディングエネルギーの異なる2種類の電子線を用いることにより実現する。さらに、測定時間を増加させることにより、量子ノイズを低減した。これらの手法により、SEM/EDS の精度を±1 %まで高めた。

5.1.2 原理

図 5.1.1 に、上部電極のない PZT キャパシターの構造、および、同構造に収束電子線を照射した際の試料中における電子線の広がりを示す。電子線が広がる大きさは、2.2.1 項、および、2.4.1 項で説明したように、電子線のランディングエネルギーに依存する。電子ビームが広がる領域は、ランディングエネルギーが低い場合、例えば 8 keV の場合に図 5.1.1 の A 的な範囲となる。これに対し、ランディングエネルギーが大きい場合、例えば 25 keV の場合に図 5.1.1 の B 的な範囲となる。キャパシターには、白金の下部電極や Ti を含む拡散バリア層(TiN 等)が用いられることが多い(Tanabe et al., 1995) (Onishi et al., 1994) (Torii et al., 1997b)。バルクの PZT に SEM/EDS を適用する場合、Zr の組成評価には Zr からの X 線の中で最も強度が高い Zr L α (2.048 keV)を用いる。しかしながら、キャパシターの場合、Pt M α (2.048 keV)が Zr L α に重なるため、Zr の組成を評価するためには、Zr K α (15.744 keV)を検出する必要がある。この場合、Zr の K 殻電子を励起するため、入射電子のランディングエネルギーを大きくしなければならず、25 keV 以上とするのが現実的である。しかしながら、ランディングエネルギーが 25 keV 以上の電子線を試料に入射させると、電子は下部電極の下の拡散バリア層まで達する(図 5.1.1)。このため、拡散バリア層の Ti からの信号が PZT からの Ti の信号に重なるために、組成の評価精度が悪化する。さらに、Zr K α の信号は弱いために、通常の評価時間(数分)では、量子ノイズの寄与が大きく高精度な測定は困難である。

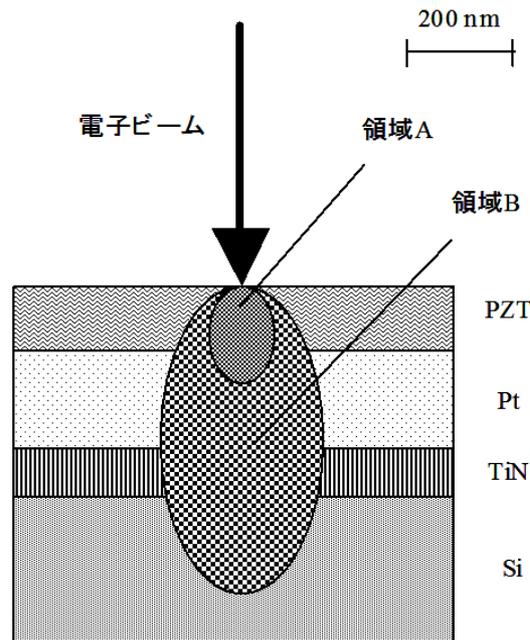


図 5.1.1 典型的な試料の断面図、および、電子線の試料内部での広がり。
 図は ref (Suga et al., 2000)より修正して転載, copyright 2000 JSAP。

SEM/EDS で PZT の組成を高精度に測定するためには、次に述べるように、

- (1) 電子線の加速電圧を変えた 2 種類の測定
- (2) 測定時間の増加

が有効である。第 1 にランディングエネルギーが 25 keV 以上の電子線を試料に照射し、Zr $K\alpha$ (15.744 keV) と Pb $L\alpha$ (10.550 keV) の信号を検出することにより Zr と Pb の組成比を求める。第 2 に、電子が拡散バリア層に到達しないような低ランディングエネルギーの電子線を試料に照射する。この測定では、PZT からの Ti 信号を選択的に得ることができる。このため、Ti $K\alpha$ (4.508 keV) と Pb $M\alpha$ (2.342 keV) の信号を検出することにより、Ti と Pb の組成比を正確に測定できる。

量子ノイズの寄与は、量子ノイズが信号量の平方根に比例し、かつ、信号量が測定時間に比例することから、測定時間を増加することにより低減できる。

5.1.3 実験方法

PZT(150 nm)/Pt(200 nm)/TiN(50 nm)構造を有する A-F の 6 個の試料を Si 基板上に作製した。PZT 薄膜は、オゾン蒸着(Ozon Jet Evaporation: OJE)法により堆積した(Torii et al.,

1997a)。鉛の蒸発速度を制御することにより、各試料の鉛含有量を制御した。Pt と TiN は、通常のスパッタリング法で堆積した。ランディングエネルギー8 keV の電子線が拡散バリア層に到達しないことを確認するため、Si 基板上に PZT を成膜しない Pt(200 nm)/TiN(50 nm)構造の試料も作製した。

日立製 S-4160 SEM と Kevex 製 model 3600-0650 EDS を測定に用いた。電子線のランディングエネルギーは、8 keV と 30 keV とした。EDS スペクトルにおけるそれぞれのピーク強度は、スペクトルからバックグラウンドを差し引くことにより求めた。また、Ti/Pb の EDS ピーク強度比をランディングエネルギーが 8 keV の電子線を用いた測定で求め、Zr/Pb の EDS ピーク強度比をランディングエネルギーが 30 keV の電子線を用いた測定で求めた。測定時間は、8, 30 keV のランディングエネルギーの電子線を用いた場合、それぞれ 10, 20 分とした。これらの長時間測定により、量子ノイズは十分に低下した。EDS のピーク強度比から組成比を求めるために、これらの 6 個の試料に対して ICP(誘導プラズマ発光)分析を実施した。ICP 法により求めた Ti/Pb, Zr/Pb の組成比を ICP 組成比と呼ぶことにする。これらの ICP 組成比は、EDS のピーク強度比を校正するのに用いた。

5.1.4 結果および考察

ランディングエネルギーが 8 keV の電子線を PZT が無い試料に照射した際に得られる EDS スペクトルを図 5.1.2 の挿入図に示す。この挿入図にて Ti K α のエネルギー4.508 keV 近傍にピークが観察されないことから、ランディングエネルギーが 8keV の電子線が TiN 拡散バリア層に到達しないことを確認できた。従って、8 keV のランディングエネルギーの電子線を PZT(150 nm)/Pt(200 nm)/TiN(50 nm)の試料に対して用いた場合、PZT からの信号を選択的に取り出せることがわかった。

図 5.1.2 に、PZT/Pt/TiN 構造の試料にランディングエネルギーが 8 keV の電子線を照射した際の EDS スペクトルを示す。4つのピークがそれぞれ 0.525, 2.048, 2.342, 4.508 keV 付近に検出された。これらは、それぞれ O K α , Pt M α , Pb M α , および Ti K α のエネルギーである。Zr K α の信号は、前記したように Pt M α の信号の上に重なっている。図 5.1.2 のスペクトルからバックグラウンドを差し引くことにより Ti K α と Pb M α のピーク強度を求め、さらに(Ti K α)/(Pb M α)の EDS ピーク強度比を計算した。

図 5.1.3 に、PZT/Pt/TiN 構造の試料にランディングエネルギーが 30 keV の電子線を照射した際の EDS スペクトルを示す。ただし図 5.1.3 では、E > 14 keV の領域は見やすくするためにスペクトルの強度を 10 倍にして示した。8つのピークがそれぞれ 8.267, 9.441, 10.550, 11.069, 12.612, 12.940, 14.762, 15.744 keV 付近に検出された。これらは、それぞれ Pt L1, Pt L α , Pb L α , Pt L β , Pb L β , Pt L γ , Pb L γ , および Zr K α のエネルギーである。8 keV のランディングエネルギーの測定と同様に、これらのピークから(Zr K α)/(Pb L α)の EDS ピーク強度比を求めた。

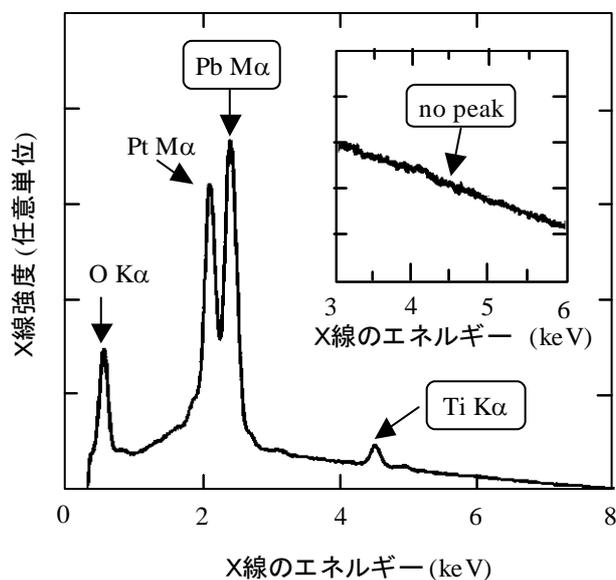


図 5.1.2 ランディングエネルギーが 8keV の電子線を用いて測定した、PZT/Pt/TiN/Si 試料の EDS スペクトル。組成を求めるために、Pb M α と Ti K α のピークを用いる。挿入図は、ランディングエネルギーが 8keV の電子線を用いて測定した、Pt/TiN/Si 試料の EDS スペクトル。Ti K α のピークは、4.508 keV 近傍に検出されなかった。図は ref (Suga et al., 2000) より修正して転載, copyright 2000 JSAP。

図 5.1.4 に、(a) Ti/Pb, (b) Zr/Pb について、EDS ピーク強度比と ICP 組成比の関係を示す。Ti/Pb と Zr/Pb のいずれについても、EDS ピーク強度比は ICP 組成比に対して良く比例していることがわかった(図 5.1.4)。組成比は、最小 2 乗法を用いてフィッティングした直線と EDS ピーク強度比から求められる(図 5.1.4)。これにより、EDS 測定から 2 つの組成比 Ti/Pb と Zr/Pb を得られるので、PZT の組成を求めることができる。このようにして求めた組成を EDS 組成と呼ぶ。

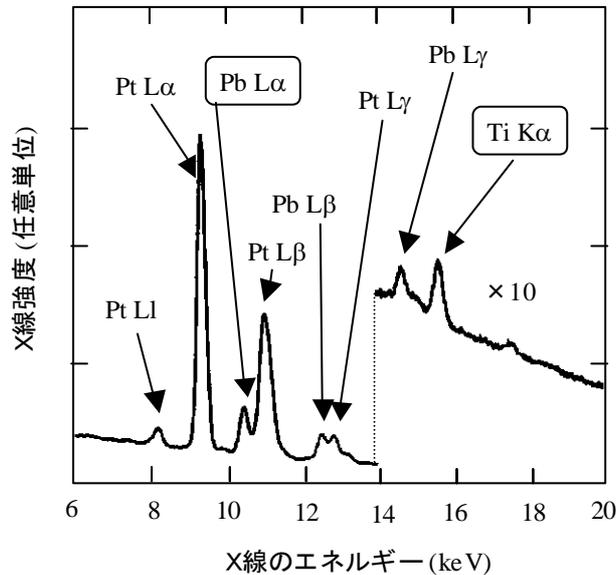


図 5.1.3 ランディングエネルギーが 30keV の電子線を用いて測定した、PZT/Pt/TiN/Si 試料の EDS スペクトル。14 keV 以上のエネルギー領域では、見やすくするためにスペクトルの強度を 10 倍にして示した。組成を求めるために、Pb L α と Zr K α ピークを用いる。図は ref (Suga et al., 2000) より修正して転載, copyright 2000 JSAP。

図 5.1.5 に、各試料に対する EDS 組成と ICP 組成の差を示す。組成の差の絶対値は 0.4 % 以下であり、ICP 測定の標準偏差が 1 % 以下であることから、EDS の組成評価精度は $\pm 1 %$ 以下であることがわかった。

ゾルゲル法、スパッタリング法、オゾン蒸着法などを用いて最初にアモルファスの PZT 薄膜を形成した後に熱処理により結晶化をさせるプロセスにおいては、膜の特性はアモルファス膜の品質により大きく異なる。ただし、アモルファス膜の品質を測定するのは困難であった。これに対し、本手法は、熱処理前と後の膜組成を測定することにより、アモルファス膜を評価できる。例えば、本手法は Pb の酸化不足による熱処理中の Pb 蒸発を評価できる。これは、特に製造工程における品質管理に本手法が有効であることを示す。

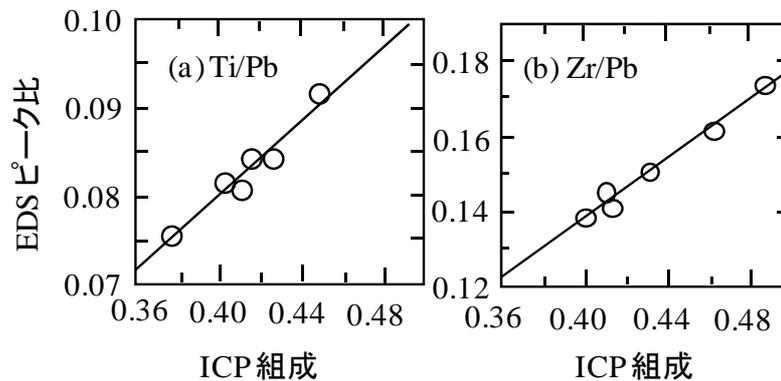


図 5.1.4 (a) Ti/Pb, (b) Zr/Pb に関する EDS ピーク強度比と ICP 組成比の関係。白丸は実験結果であり、実線は最小 2 乗法を用いてフィッティングした直線。(a)は、(Ti K α)/(Pb M α) の EDS ピーク強度比が(Ti/Pb) の ICP 組成比に良く比例することを示す。(b)は、(Zr K α)/(Pb L α) の EDS ピーク強度比が(Zr/Pb) の ICP 組成比に良く比例することを示す。図は ref (Suga et al., 2000)より修正して転載, copyright 2000 JSAP。

高精度 SEM/EDS を、いくつかの PZT キャパシターの不具合解析に適用した。図 5.1.6 に、高精度 SEM/EDS で測定した Pb 含有量の関数として、キャパシターの残留分極とリーク電流密度を示す。Pb 量が 50 - 52 % の範囲では、残留分極 Pr は 15 μ C/cm² 程度で 1.8 V におけるリーク電流密度は 10⁻⁶A/cm² 以下であり、良好な電気特性を示した。これに対し、Pb 含有量が 50 % 以下の場合 Pr が 0 となり、Pb 含有量が 54 % 以上の場合 1.8 V におけるリーク電流密度が 10⁻⁵A/cm² 以上となる。このような電気特性の組成依存性は、以前に報告されたものと同じである(Torii et al., 1994)。従って、この場合不良の要因は PZT の組成ずれであることがわかる。このように、高精度 SEM/EDS は不良要因を明らかにできた。

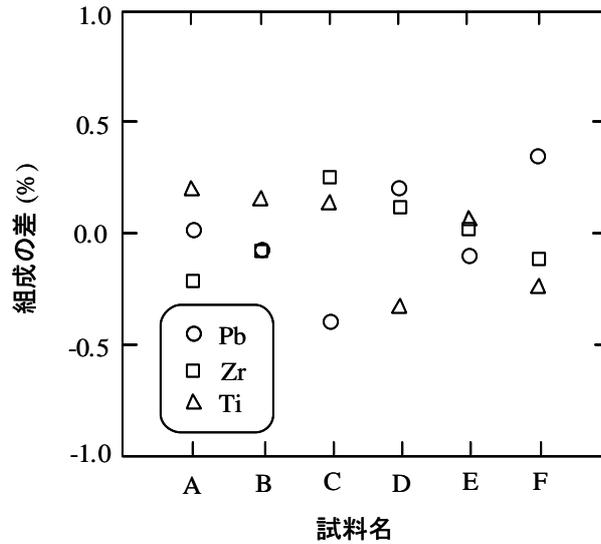


図 5.1.5 各試料についての EDS 組成と ICP 組成の差。組成差の絶対値は 0.4 % よりも小さい。図は ref (Suga et al., 2000) より修正して転載, copyright 2000 JSAP。

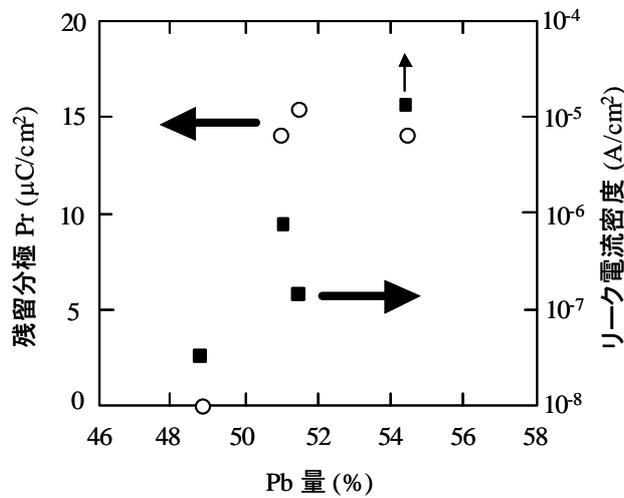


図 5.1.6 高精度 SEM/EDS 法で測定した Pb 量の関数としてのキャパシタの残留分極とリーク電流密度。図は ref (Suga et al., 2000) より修正して転載, copyright 2000 JSAP。

高精度 SEM/EDS を用いて、4 インチウエハ内の組成分布を評価した。PZT/Pt/TiN/Si 構造の試料を、2つの方法で作製した。ひとつは、PZT 薄膜をオゾン蒸着法により堆積したものであり、もうひとつはゾルゲル法を用いて作製したものである。総測定時間を短くするため、ランディングエネルギーが 8 keV の電子線を用いた測定のみを実施した。そし

て、規格化した Ti/Pb の EDS ピーク強度比を互いに比較した。

図 5.1.7 に、4 インチウェハの中心からの距離の関数として、規格化した Ti/Pb の EDS ピーク強度比を示す。オゾン蒸着法で作製した PZT については、Ti/Pb のピーク強度比のばらつきは±1.1 %以下であった。この値±1.1 %は、高精度 SEM/EDS の評価精度と同程度である。これに対し、ゾルゲル法で作製した PZT については、Ti/Pb の EDS ピーク強度比は±2.0 %以上であった。この値±2.0 %は、高精度 SEM/EDS の評価精度±1 %よりも明らかに大きかった。これらの結果は、ゾルゲル法を用いた場合、組成の面内分布制御がオゾン蒸着法を用いた場合よりも難しいことを示唆する。このため、ゾルゲル法を用いた場合、組成ずれに起因する不良が発生する可能性があると考えられる。

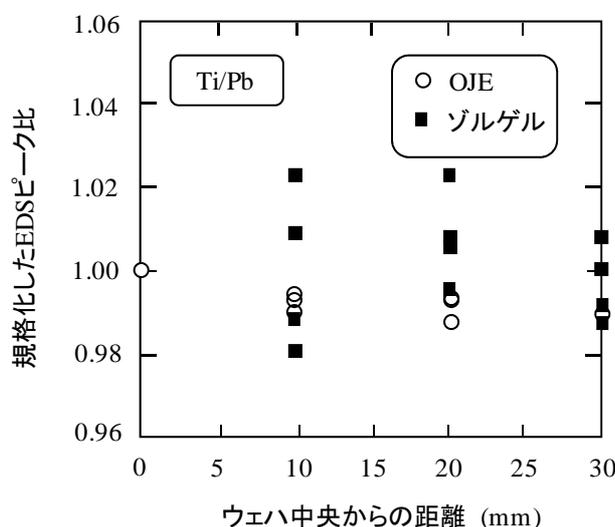


図 5.1.7 4 インチウェハ中央からの距離の関数としての Ti/Pb の EDS ピーク強度比。白丸はオゾン蒸着法により形成した試料。黒四角は、ゾルゲル法で形成した試料。図は ref (Suga et al., 2000)より修正して転載, copyright 2000 JSAP。

5.1.5 まとめ

PZT キャパシターの組成を分析するため、高精度の SEM/EDS 法を検討した。高精度 SEM/EDS 法の精度は±1 %であり、PZT キャパシターについて電気特性と組成の関係を調べるのに十分である。高精度 SEM/EDS を PZT キャパシターの不良解析に適用し、PZT の組成が定比からずれていることが電氣的不良の要因であることを明らかにした。高精度 SEM/EDS は、空間分解能が μm のオーダーであるため不良解析に適する。高精度 SEM/EDS を 4 インチウェハ上の PZT 組成分布の評価に適用した。オゾン蒸着法で形成した PZT につ

いては、組成分布は±1.1%以下であった。これに対し、ゾルゲル法で形成した PZT の組成分布は、±2%以上であった。高精度 SEM/EDS は簡単に測定できるために、このような繰り返し測定に適している。さらに、高精度 SEM/EDS は非破壊分析であるため、メモリー作製工程におけるインライン分析にも適用できる。

5.2 超電導 X 線検出器

本節では、超電導体を用いた X 線検出器を実現するための第 1 歩として、超電導体-絶縁体-超電導体接合のリーク電流を低減する方法について検討した結果を記載する(Suga and Kominami, 1995)。

5.2.1 本研究の背景と目的

超電導体-絶縁体-超電導体接合(S-I-S 接合)は、エネルギー分解能が数 eV 以下の放射線検出器になると考えられている(Kurakado, 1982)。検出器のエネルギー分解能は、放射線の入射によって検出器内部に励起されるキャリア数の統計的なゆらぎに依存する。超電導体のエネルギーギャップは半導体のエネルギーギャップよりも 3 桁小さいために、放射線の入射によって検出器内部に励起されるキャリアの数も超電導体の方が半導体よりも 3 桁多い。このため、超電導体では、励起されたキャリアの統計揺らぎが、半導体の場合よりも大幅に小さい。

Nb-Al-AlO_x-Nb 接合が、放射線検出器に用いられている(Kurakado and Matsumura, 1989) (Ishibashi et al., 1991) (Rando et al., 1992) (Cristiano et al., 1993) (Matsumura et al., 1994)。検出器用の接合では、接合のリーク電流を小さくする必要がある。リーク電流が、電気的なノイズの要因となり検出器のエネルギー分解能を悪化させるためである(Kurakado and Matsumura, 1989)。このため、Kurakado, Matsushima らは、接合の陽極酸化を含む選択ニオブエッチングプロセス(SNEP)を採用した(Kurakado and Matsumura, 1989) (Matsumura et al., 1994) (Kurakado et al., 1991)。他の報告者らも、多くは陽極酸化した接合を用いている(Ishibashi et al., 1991) (Rando et al., 1992) (Cristiano et al., 1993)。陽極酸化は接合の側面を酸化し、接合の側面を流れるリーク電流を抑制する働きがある。

接合の側面を酸化する方法として、酸素プラズマ処理が有効な可能性がある。酸素プラズマ処理は、ドライプロセスであるため、ウェット工程である陽極酸化処理よりも高い歩留まりが得られると期待される。歩留まりの向上は、特に検出面積を増加させるための直列 S-I-S 接合を形成する際に重要である(Kurakado et al., 1991)。

本研究では、接合を流れるリーク電流低減に対する酸素プラズマ処理の効果を検討した。酸素プラズマ処理した接合のサブギャップ電流を 0.35 K まで測定した。接合のエッジを流れる可能性のある最大のエッジリーク電流を見積もり、陽極酸化した接合を流れるリーク電流と比較した。

5.2.2 実験方法

S-I-S 接合の断面を図 5.2.1 に示す。厚さ 300 nm の SiO 絶縁層を Si 基板上に堆積した。Nb/AlO_x/Al/Nb 3 層膜をスパッタリング法により SiO 絶縁膜上に堆積した。下部 Nb 膜、

Al 膜、および、上部 Nb 膜の厚さは、それぞれ、80、7、160 nm である。Al 膜堆積後、Al 表面を酸化するため、チャンバー内に 26.6 Pa の酸素を 30 分間導入した。フォトレジストのパターンをマスクとして、Nb 膜は反応性イオンエッチングでパターンニングし、Al 膜はイオンビームエッチングによりパターンニングした。上部 Nb 電極は、もうひとつのフォトレジストをマスクとして、反応性イオンエッチングによりパターンニングした。これらのプロセスにより、S-I-S 接合を形成した。次に、これらの接合を、66.5 Pa の酸素プラズマ雰囲気中にて 9 分間酸化処理をした。酸素プラズマは、ガラス製の円筒形チャンバーの中に生成した。

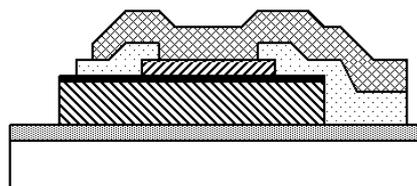
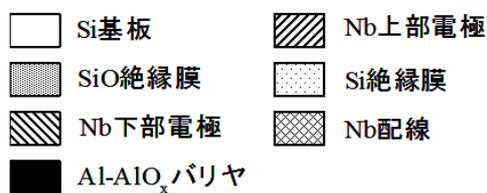


図 5.2.1 酸素プラズマ処理をした S-I-S 接合の断面の模式図。図は ref (Suga et al., 1995) より修正して転載, copyright 1995 JSAP。

酸素プラズマを生成する際の高周波のパワーは 300 W とした。配線と下部電極の間の絶縁を確保するために、厚さ 360 nm の Si を成膜した。上部電極用の配線として、厚さ 360 nm の Nb を堆積した。接合の超電導臨界電流密度は、 $1,350 \text{ A/cm}^2$ であった。接合の大きさは、試料 A の場合 $1.8 \times 1.8 \mu\text{m}$ 、試料 B の場合 $1.7 \times 1.7 \mu\text{m}$ とした。

S-I-S 接合のサブギャップ電流の温度依存性を測定した。測定は、0.5 mV のバイアス電圧を印加して実施した。1.8 - 4.2 K の温度における測定には、液体ヘリウムの減圧システムを用いた。0.35 K における測定には、希釈冷凍器を用いた。ジョセフソントンネル電流をなくすために、AlO_x 層に対して平行に磁場を印加した。

5.2.3 結果および考察

図 5.2.2 に、S-I-S 接合のサブギャップ電流の温度依存性を示す。図 5.2.2 にて、サブギ

ギャップ電流は 4.2 K での値に規格化した。図 5.2.2 に、理論的に計算した熱励起のサブギャップ電流を、4.2 K での値で規格化し実線で示した(Van Duzer and Turner, 1981)。1.8 K 以上の温度領域にて、測定したサブギャップ電流は、理論的に計算した熱励起電流に良く一致した(図 5.2.2)。これに対し、0.35 K におけるサブギャップ電流の測定結果は、理論的に計算した熱励起電流よりも 2 桁以上大きかった。これらの値を、接合のリーク電流を見積もるのに用いた。

接合のリーク電流低減に対する酸素プラズマ処理の効果を示すために、本研究におけるエッジリーク電流の大きさを報告されている陽極酸化した接合のリーク電流と比較した。ただし、リーク電流はエッジリーク電流と接合面を流れるリーク電流の和であるため、本研究においてエッジリーク電流を直接的に求める事はできない。ここで、接合面を流れるリーク電流は、Nb 下部電極上の AlO_x/Al 層のカバレッジが不完全であることに起因する電流である。このため、エッジリーク電流のとりうる最大値、すなわち、最大エッジリーク電流を陽極酸化した接合のリーク電流と比較した。最大エッジリーク電流は、接合面を流れるリーク電流が 0 であることを仮定して求めた。

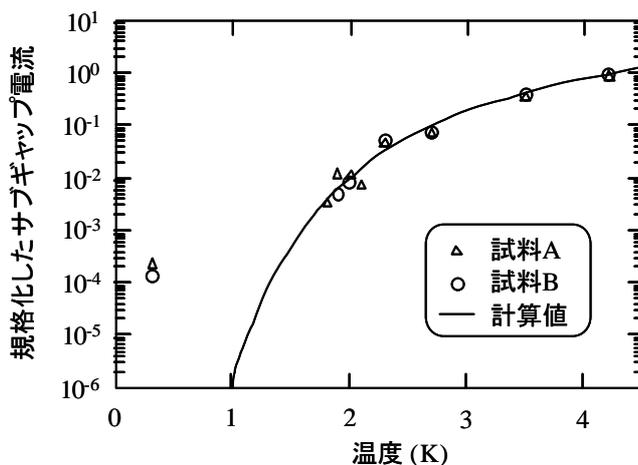


図 5.1.2 酸素プラズマで処理をした S-I-S 接合のリーク電流の温度依存性。図は ref (Suga et al., 1995)より修正して転載, copyright 1995 JSAP。

本研究における接合のリーク電流密度を、次のように見積もった。サブギャップリーク電流は、熱励起電流とリーク電流の和である。熱励起電流の温度依存性は指数関数的であるが、リーク電流の温度依存性は小さいと考えられる。1.8 K 以上の温度領域にて測定したサブギャップ電流が熱励起電流の理論的な計算値に一致する(図 5.2.2)ことは、この温度領域にて熱励起電流が支配的なことを示す。これに対し、0.35 K においては、測定したサブギャップ電流が熱励起電流の理論的な計算値よりも 2 桁以上大きかった。これは、0.35 K

では、熱励起電流の寄与は無視できる程度に小さい事を示す。すなわち、0.35 Kでのサブギャップ電流はリーク電流である。

本研究での最大エッジリーク電流を報告されている陽極酸化された接合のリーク電流と比較するためには、さらに2つのことを考慮する必要がある。第1は、報告間でバイアス電圧が異なることである。第2は、S-I-S接合の大きさが報告間で異なることである。従って、本研究における接合の抵抗を、報告されている陽極酸化された接合の大きさに対して計算し、これらを報告値と比較した。ただし、接合抵抗は、バイアス電圧をリーク電流値で割った値である。エッジリーク電流の大きさは接合の周辺長に比例するため、接合抵抗は接合の周辺長に反比例する。本研究の接合では、単位長さあたりのエッジリーク電流は、試料Aで $2.78 \times 10^{-5} \text{ A/m}$ であり、試料Bで $1.47 \times 10^{-5} \text{ A/m}$ であった。これらはそれぞれ 18 Ωm , 34 Ωm の接合抵抗に対応する。本研究で作製した接合について、接合抵抗を計算した結果を表 5.2.1 に示す。

陽極酸化した接合の抵抗もあわせて表 5.2.1 に示す。参考文献(Ishibashi et al., 1991)では、 $100 \times 100 \mu\text{m}$ の大きさの接合について、バイアス電圧 1 mV におけるリーク電流が 2.0 μA なことが報告されている。このため、接合抵抗は $5 \times 10^2 \Omega$ と計算される。また、参考文献(Rando et al., 1992)にてリーク電流は、接合の大きさが $20 \times 20 \mu\text{m}$ の際に 1.4 nA であり、 $10 \times 10 \mu\text{m}$ の際に 0.6 nA である。接合のバイアス電圧が 0.5 mV であることから、接合抵抗は、大きさが $20 \times 20 \mu\text{m}$ の接合では $3.57 \times 10^5 \Omega$ であり、 $10 \times 10 \mu\text{m}$ の接合では $8.33 \times 10^5 \Omega$ と計算される。

表 5.2.1 S-I-S 接合のエッジリーク電流を比較するための接合抵抗。

試料AとBの接合抵抗値は見積もった値である。表は ref (Suga et al., 1995)より修正して転載, copyright 1995 JSAP。

接合の大きさ (μm)	10 x 10	20 x 20	100 x 100
試料 A (Ω)	4.5×10^5	2.25×10^5	4.5×10^4
試料 B (Ω)	8.5×10^5	4.25×10^5	8.5×10^4
参考文献[Ishibashi et al., 1991] (Ω)			5×10^2
参考文献[Rando et al., 1992] (Ω)	8.33×10^5	3.57×10^5	

表 5.2.1 より、本研究における接合抵抗の計算値は、参考文献(Ishibashi et al., 1991)の値と比較して圧倒的に大きく、参考文献(Rando et al., 1992)の値と比較して同程度であることがわかった。これらの結果は、酸素プラズマ処理した接合の最大エッジリーク電流が陽極酸化した接合のリーク電流の最小値と同程度であることを示す。従って、放射線検出器用の S-I-S 接合を形成する際に、酸素プラズマを用いた方法が陽極酸化法を用いる方法のかわりに有効であると結論した。

エッジリーク電流の原因は、接合の周辺にあるマイクロショートだと思われる。このマイクロショートは、Nb、あるいは、導電性の Nb 酸化物だと考えられる。酸素プラズマ処理した接合の周辺リーク電流が陽極酸化した接合のエッジリーク電流の最小値と同程度であることは、処理により接合周辺のマイクロショートが絶縁体である Nb₂O₅ になったことを示唆する。

本研究の接合について、電気的なノイズが検出器のエネルギー分解能に与える影響を考察した。電気的ノイズに起因するエネルギー分解能の半値幅 ΔE_{noise} は、

$$\Delta E_{\text{noise}} = 2.35 E Q_n / Q_t \quad \dots \text{式 5.2.1}$$

で与えられる。ただし、 E は入射粒子のエネルギー、 Q_n は電荷等価ノイズ、 Q_t は接合をトンネルする電荷量である (Twerenbold, 1987)。

Jochum らは、抵抗が 50 k Ω の接合に対して Q_n を計算した (Jochum et al., 1994)。彼らは、 $Q_n = (5432 + 9062)^{1/2} = 1056$ electrons と報告している。酸素プラズマ処理をした大きさ 100 \times 100 μm の接合の抵抗は、表 5.2.1 に示すように、4.5 – 8.5 \times 10⁴ Ω と計算されるため、この接合に対する Q_n は 1056 electrons に近いと考えられる。

放射線の入射により 1 つの準粒子が励起されるエネルギーは 1.7 Δ であるため、Nb に対する E/Q_t は 2.55 meV/electrons と見積もられる。ただし、 Δ は超電導エネルギーギャップである。このため、 ΔE_{noise} は、6.3 eV と見積もられる。この値は、これまでに報告されている S-I-S 接合の最良のエネルギー分解能 36 eV よりも大幅に小さい (Mears et al., 1993)。したがって、本研究の接合の抵抗値は、現在の放射線検出器用 S-I-S 接合に対して十分に大きいといえる。

5.2.4 まとめ

酸素プラズマ処理した S-I-S 接合について、接合側面を流れる可能性がある最大のリーク電流を、サブギャップ電流の温度依存性から見積もった。最大エッジリーク電流は、陽極酸化された接合の中で最小のリーク電流と同程度であった。最大エッジリーク電流から、エネルギー分解能 ΔE_{noise} に対するリーク電流の寄与が 6.3 eV であると計算された。これは、S-I-S 接合に関してこれまでに報告されているエネルギー分解能の最小値よりも大幅に小さい。このため、放射線検出器用の S-I-S 接合を形成する際に、リーク電流抑制のために、酸素プラズマ処理が有効であると結論した。

5.3 SDD を用いたナノ材料評価

EDS の分野では、シリコンドリフト検出器(SDD: Silicon Drift Detector)と呼ばれる革命的な進歩があった。この素子を用いることにより、ナノ材料の組成分析が可能となった。本節では、古典的な EDS 検出器に対する SDD の優位性、および、SDD を用いたナノ材料評価について記載する(Suga et al., 2014)。

5.3.1 本研究の背景と目的

ナノ材料を評価するためには、形態だけでなく、材料を構成する元素を調べることが大切である。しかしながら、電子線を照射した際にナノ材料のナノ領域から発生する X 線信号は微弱である。これを検出するためには検出立体角の増加が有効であり、それは検出素子の面積を大きくすることにより実現できる。また、電子線電流を大きくしてナノ領域からの微弱な X 線を増やすと、他の領域から発生する X 線量も増える。これに対応するためには、高速に X 線を検出する必要がある。本論文では、SDD によりこれらの条件が満たされることを示すとともに、SDD をナノ材料評価に適用することによりナノ領域の元素分析ができることを示す。

5.3.2 SDD の特徴

2.5 節に記載したように、EDS 検出器の電気ノイズは式 2.5.5 で与えられる。通常の平行平板型の pn 接合から成る EDS 検出器(図 5.3.1 (a))では、検出面積の増加に伴い、p 領域と n 領域間のキャパシタンスと熱励起によるリーク電流の両方が増加した。式 2.5.5 からわかるように、キャパシタンス増加はシリーズノイズを増やすが、このノイズを減らすためには τ を長くする必要がある。このため、検出システムのスピードが制限されて、高速に X 線を検出することができない。さらに、 τ を大きくすることにより、熱キャリアによる接合リーク電流の影響を受けるパラレルノイズの寄与が大きくなる(式 2.5.5)。このため、素子を液体窒素温度近くまで冷却する必要があった(Lechner et al., 1996)。

SDD の実現により、素子のキャパシタンスとリーク電流を小さくすることができた。前者は主に検出スピードとダイナミックレンジを高くすることに寄与し、後者はリーク電流を低減することにより液体窒素温度での冷却を不要にした。

SDD は、最初 X 線天文学や高エネルギー物理学の分野で開発された(Gatti and Rehak, 1984)。その後、蛍光 X 線や特性 X 線を検出するために SDD のデザインは変更された(Lechner et al., 1996) (Fiorini et al., 1997) (Strüder et al., 1998)。典型的な構造を、図 5.3.1 (b)に示す(Lechner et al., 2001)。シリコンの n 型基板の X 線入射面側(図 5.3.1 (b)の下側)に p 型領域を形成する。反対側(図 5.3.1 (b)の上側)に、中心付近に n 型領域があり、その周囲に同心状にいくつかの p 型領域が形成される。X 線入射側の p 型領域と n 型領域の間に逆バイアスが印加されるが、より高い逆バイアス電圧が外側の p 型領域に印加される。こ

れにより、素子内の全ての領域が空乏化し、かつ、図 5.3.1 (c)のようなポテンシャル分布が形成される。そこでは、電子のポテンシャルがX線の入射面から n 型領域に向かって減少し、かつ、外側から中心の n 型領域に向かって減少する。その結果、X線入射により生成された電子は、生成された位置にかかわらず n 型領域で収集される。

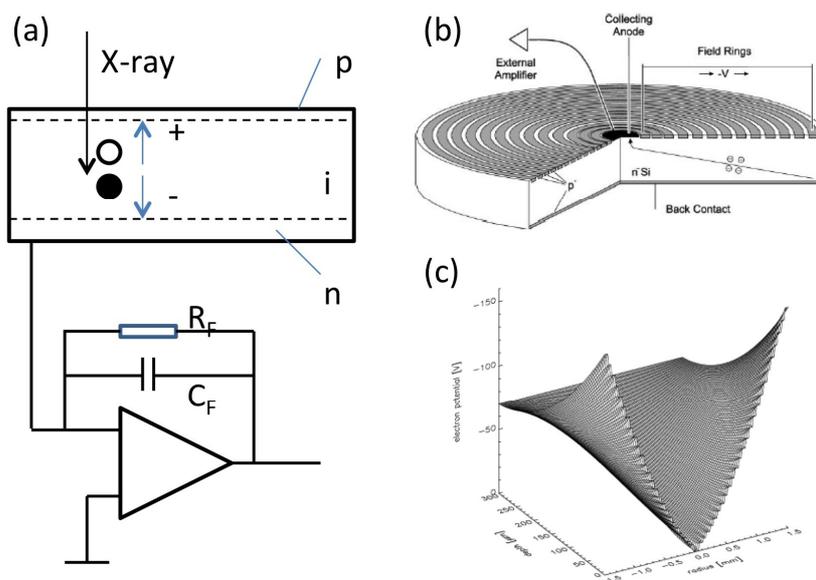


図 5.3.1 エネルギー分散型X線分光 (EDS) に用いられる X 線検出素子の構造とその中のポテンシャル分布。(a) 古典的な EDS デバイスの断面模式図と電荷有感型プリアンプ。(b) シリコンドリフト検出器 (SDD) の断面模式図。(c) SDD 内部のポテンシャル図。図(b), (c) は ref (Lechner et al., 2001)より修正して転載, copyright 2001 Elsevier。

SDD では、平行平板型の EDS 素子と比較して、収集アノードが小さいためにキャパシタンス全体を小さくできる。これにより、検出面積の大きな素子を実現可能であり、古典的な平行平板型の EDS 素子の検出面積が $10\text{-}30\text{ mm}^2$ であるのに対し、SDD では 150 mm^2 の検出面積を持つ素子も実用化されている(Terasaki et al., 2013)。また、式 2.5.5 からわかるように、キャパシタンスが小さければ整形時間 τ を短くすることが可能であるため、高速な X 線検出が可能となる(Newbury, 2006)。 τ を短くすることによりノイズに対するリーク電流の影響を小さくすることが可能であること(式 2.5.5)、および、接合面積を小さくしたことによりリーク電流を低減できたことから、液体窒素による冷却が不要となり、ペルチェ素子による冷却で十分なエネルギー分解能が得られるようになった(Fiorini et al., 1997)。さらに、通常の EDS では低エネルギー領域において電気ノイズの寄与によりエネルギー分解能が劣化していたが、SDD では上記理由で電気ノイズ全体を減らすことが可能

なため、低エネルギーのX線に対するエネルギー分解能を向上させることができた。

SDDの実現に加えて、デジタルパルスプロセッサ(DSP: Digital Pulse Processor)がEDSシステムに用いられるようになった。パルス整形方法と整形時間 τ がEDSのエネルギー分解能に影響を与えるが(Gatti et al., 1990)、これらをDSPで最適化できる。近年のDSPについては、McCarthyがまとめている(McCarthy et al., 2009)。

SDDは、取り扱いが容易であるとともに、EDSの性能を大きく向上させた。特に、大面積のEDS検出器により、ナノ材料の組成分析は大きく改善された。

5.3.3 結果および考察

SDDでナノ材料をどのように観察できるか確認するため、Au@TiO₂のBSE像とEDSマッピング像を取得した(図5.3.2)。BSE像(図5.3.2(a))では、4.2節に記載したように、金粒子はTiO₂の殻の中で明るく観察された。また、図5.3.2(b)のEDSマッピング像でも、金粒子は観察された。ここでは、SDDの検出面積は150 mm²であり、検出立体角0.049 sradである。また、一次電子の電流は440 pA、ランディングエネルギーは4 keVであり、基板バイアス電圧は0Vである(図5.3.2(b))。大きな検出面積のおかげで、ナノ材料からの微弱なX線信号を検出可能であるため、EDSマッピング像にて金粒子を見ることができた。

大面積のEDS検出器の効果は、基板バイアスと組み合わせることによりさらに高くなる。図5.3.2(c)では、図5.3.2(b)と検出面積は同じ150 mm²であるが、基板バイアスは-5 kVである。照射電子のランディングエネルギーと電流は、図5.3.2(b)と図5.3.2(c)で同じである。EDSマッピング像の空間分解能は通常試料内部でのビームの広がりによって決まるが、この場合は基板バイアス印加によるビームの先鋭化により改善される。4 keVというEDS測定としては比較的低いランディングエネルギーを用いたことにより、大面積のSDDと基板バイアスの印加で、SEMを用いたナノ材料の組成分析が改善された。

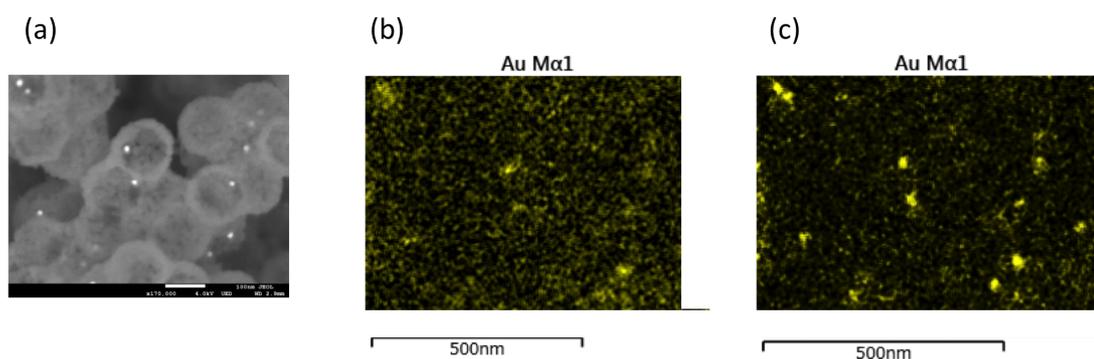


図 5.3.2 ヨークシェル材(Au@TiO₂)のBSE像とEDSマッピング像。(a) BSE像。(b), (c) AuMa α 線のEDSマッピング像。検出面積150mm²のEDS検出器を利用。(b), (c)では、ランディングエネルギーは4 keV、ビーム電流は440 pA、マッピング時間は50分。(b)基板バイアス0V。(c)基板バイアス-5 kV。図はref (Suga et al., 2014)より修正して転載、

copyright 2014 Elsevier。

5.4 本章の総合的な議論

SEM/EDS を用いた特性X線検出は、簡単に使うことが可能であるとともに、迅速な測定ができるために広く用いられている。本章では、その使い方を工夫することにより、各種の検査に適用できることを示した。また、素子そのものを改良することにより、SEM/EDS の性能を大きく向上できる。今後、さらに SEM/EDS の使い方の工夫や素子性能の改善により、SEM/EDS は様々に応用されていくものと予測される。

6. まとめ

6.1 本研究のまとめ

(1) 形態観察

- ・ 大気圧 SEM を開発した。試料室が大気に開放されているため、1 気圧下の試料を観察できるだけでなく、観察の途中で試料に試薬を滴下するなど、従来困難であった外部から試料を操作しながら動的に観察できるようになった。また、蒸発現象などの試料の体積が急速に変化する現象の観察に、世界で初めて成功した。
- ・ 大気圧 SEM では電子線を下側から試料に照射するため、これまで困難であった液体の中に沈む試料を観察できるようになった。
- ・ 大気圧 SEM 用に、電気化学薄膜ディッシュを開発した。これにより、世界で初めて電解液中の電気化学反応を SEM で観察した。また、温度制御ディッシュを開発した。これにより、これまで困難であったハンダの融解や凝固など大気圧下における試料の温度変化を観察できるようになった。今後、様々な分野に適用できると期待される。
- ・ ナノ材料を用いて、最新の高分解能 SEM の性能を確認した。低着地電圧での観察により、観察時のダメージやチャージを低減するとともに、表面近傍の観察を実現できた。また、電場と磁場を組み合わせた対物レンズの利用により、低着地電圧でも高い空間分解能の観察を実現できた。さらに、エネルギーフィルタを備えたスルーザレンズ検出システム (TTL 検出システム) により、原子番号が異なる 2 つの化合物の形態をそれぞれ観察できた。

(2) 元素分析

- ・ ナノ材料を用いて、素子面積が大きい最新のシリコンドリフト検出器 (SDD) の性能を確認した。検出面積が大きくなることにより、ヨークシェル材中の金ナノ粒子の元素分析に成功した。
- ・ X線検出器に用いることが期待されている超電導接合のリーク電流を低減する方法を開発した。これにより、超電導接合検出器の電気ノイズを低減できると予測され、SEM/EDS への適用が期待される。
- ・ 半導体デバイスに用いられる PZT の組成を、デバイス構造のまま調べる方法を開発した。これにより、開発時の組成最適化、生産時の組成モニタリング、および、故障発生時の組成解析をできるようになったので、それぞれの工程を効率化できた。

(3) 観察や分析の効率の向上

- ・ 大気圧 SEM の開発により、試料室である薄膜ディッシュの上で様々な細胞を安定に培養できるようにした。また、通常の電顕観察に必要な試料の脱水・乾燥などの煩雑な試料

前処理なしに、簡単な薬液の入れ替えだけで、これらの様々な細胞を「簡単かつ迅速」に液体に入れたままで電顕観察できるようにした。従来バイオ試料の電顕観察には前処理を含めて1日以上の方が必要であったが、本開発により最短 20 分程度で観察が可能となり、バイオ試料の観察効率を飛躍的に向上させた。

- ・ 上記の「飛躍的な迅速化」により、大気圧 SEM でバクテリアの形態を調べることにより、マイコプラズマ肺炎菌の検査に適用できる可能性を示された。これにより、従来良い方法がなかった感染初期段階でのマイコプラズマ肺炎検査ができる可能性を示した。また、ガンの術中検査への適用の可能性も示し、従来の検査では熟練が必要であったのに対し、本技術により誰にでも簡単に検査ができると期待されている。
- ・ 大気圧 SEM と光学顕微鏡を組み合わせた「光顕・大気圧 SEM 複合システム」を開発した。これにより、一台の装置で簡単に相関顕微法を実現できるようにしたので、観察を効率化することができた。特に、蛍光ラベルによる免疫染色を行った上で光顕により観察位置を特定し、その後大気圧 SEM で目的部位を高い空間分解能で観察することが簡単にできるようになった。また、上部にある光顕を用いたライブセル観察によりタイミングを選んで試料を固定し、その後大気圧 SEM で観察を行うことにより、時間的に変化する現象をタイミングを選んで高分解能観察することが簡単にできるようになった。これらにより、バイオ分野の研究開発効率を向上させることができた。

6.2 今後の課題

(1) 形態観察

- ・ これまで観察が困難であった大気圧下の様々な試料を大気圧 SEM で観察し、その有効性をさらに検証していく必要がある。
- ・ 高分解能 SEM でより高い空間分解能での観察を実現するために、TEM の分野で用いられている収差補正技術を導入することが必要である。
- ・ 本報告では高分解能 SEM で2次電子と反射電子に分けて電子を検出する方法について記載したが、さらに角度を分けて検出することにより、より多くの情報が得られると期待される。このような検証が必要である。

(2) 元素分析

- ・ 大きな検出面積を有する、高エネルギー分解能 EDS 検出素子の開発が必要である。特に、超電導接合や超電導トランジションエッジセンサーなどをアレイ状に配置し、検出面積を大きくすることが有効と考えられる。

(3) 観察や分析の効率の向上

- ・ 大気圧 SEM を、マイコプラズマ肺炎菌検査、あるいは、ガンの術中診断にどのように使

えるかさらに検討する必要がある。

- ・ 大気圧 SEM で迅速な観察ができる特徴を活用して、創薬開発への適用を検討する必要がある。
- ・ 大気圧 SEM を、工業用のモニタリング等に使えないかさらに検討する必要がある。

(4) 結晶性分析

- ・ 反射電子を検出することにより、試料の結晶欠陥などを観察できることが報告されている。これらの観察条件を最適化すること、および、その理論的な解釈が求められている。

6.3 今後の展望

SEM が最初に開発された頃、あまり使われる技術にならないと考えられていた。形態を調べるツールとして既に TEM が商品化されており、SEM に対するニーズが少ないと考えられていたからである。しかしながら、SEM が市場に導入されると、TEM と比較して圧倒的に簡単に使えるために爆発的に普及した。その SEM は、本研究で記載したように、大気圧下の試料の観察ができるようになり、低ランディングエネルギーでの観察でチャージとダメージが少ない観察が可能となり、かつ、特性 X 線検出による組成分析の性能が向上した。このように SEM の性能は年々向上し、より広く用いられるようになっている。

緒言にも記載したが、電子線のドブロイ波長は電子線のエネルギーが 100 eV の場合に 1.24 Å である。これは、原理的にはランディングエネルギーが 100 eV の観察で、原子分解能の観察が可能であることを示す。このように、SEM には大きな可能性が残されている。このため、今後も SEM の性能は大きく改善されていくと予測される。

謝辞

高分解能 SEM 関係の研究・開発について、懇切丁寧なご指導と多大なるご助言をいただきました、KAIST/Stockholm 大の寺崎治教授、千葉大学の坂本一之准教授に心より感謝の意を表します。先生との議論によって、高分解能 SEM についての理解が深まるとともに、新たな可能性を見出すことができました。また、本論文の審査の労もお取りいただきました。

大気圧 SEM に関する全ての研究について、懇切丁寧なご指導をいただきました独立行政法人産業技術研究所の佐藤主税博士に感謝いたします。同氏には、研究の進め方だけでなく、高度な論文を執筆する方法についても丁寧にご指導いただきました。

本論文をまとめるにあたり、審査の労をお取り下さり、ご指導、ご助言をいただきました千葉大学の石井久夫教授、奥平幸司准教授に深く感謝いたします。先生方のご指導により、本研究の新たな一面を見出すことができ、研究の視野を広げることができました。

大気圧 SEM に関する研究を一緒にしていただいた方々に感謝いたします。特に、日本電子の西山英利氏、産業技術総合研究所の丸山雄介博士(当時)、三尾和弘博士、海老原達彦博士には、多くの研究を一緒にしていただき、大変お世話になりました。

大気圧 SEM を一緒に開発いただいた、産業技術研究所の小椋俊彦博士、および、日本電子グループ関係の皆様感謝いたします。特に、日本電子の北村真一博士、日本電子テクニクスの露木誠氏(当時)、石森能夫氏、佐藤猛氏、小川康司氏、小泉充氏には、開発初期より大変お世話になりました。また、日本電子の原田嘉晏社長(当時)、日本電子テクニクスの本田敏和社長(当時)、成瀬幹夫社長(当時)には、開発に多大なるご支援をいただきました。

大気圧 SEM の薄膜ディッシュを一緒に開発いただいた、山形県工業技術センターの渡部善幸博士、岩松新之輔氏、日本電子の小入羽祐治氏に感謝いたします。ディッシュ開発の初期から、特殊ディッシュの開発まで、大変にお世話になりました。

高分解能 SEM 関係の研究を一緒にしていただいた皆様方に、感謝いたします。特に、日本電子の朝比奈俊輔博士には、FE-SEM の素晴らしさを教えていただきました。

研究・開発者としての基本をご指導いただいた東北大学の澤田安樹教授(当時)、日立中央研究所の平谷正彦博士(当時)、西野壽一博士(当時)、高木一正博士(当時)、柿林博司博士(当時)に感謝いたします。

参考文献

- Abrams, I.M., McBain, J.W., 1944. A Closed Cell for Electron Microscopy. *J. Appl. Phys.* 15, 607-609.
- Alan, T., Yokosawa, T., Gaspar, J., Pandraud, G., Paul, O., Creemer, F., Sarro, P.M., Zandbergen, H.W., 2012. Micro-fabricated channel with ultra-thin yet ultra-strong windows enables electron microscopy under 4-bar pressure. *Applied Physics Letters* 100, 081903.
- Aluotto, B.B., WITTLER, R.G., Williams, C.O., FABER, J.E., 1970. Standardized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 20, 35-58.
- Arimoto, S., Oyamatsu, D., Torimoto, T., Kuwabata, S., 2008. Development of in situ electrochemical scanning electron microscopy with ionic liquids as electrolytes. *Chemphyschem* 9, 763-767.
- Asahina, S., Uno, S., Suga, M., Stevens, S.M., Klingstedt, M., Okano, Y., Kudo, M., Schüth, F., Anderson, M.W., Adschiri, T., 2011. A new HRSEM approach to observe fine structures of novel nanostructured materials. *Microporous and Mesoporous Materials* 146, 11-17.
- Baba, Y., Hayashit, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M., Kurosaki, T., 2006. Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 16704-16709.
- Bachmann, L., Becker, R., Leupold, G., Barth, M., Guckenberger, R., Baumeister, W., 1985. Decoration and shadowing of freeze-etched catalase crystals. *Ultramicroscopy* 16, 305-320.
- Barth, J., Kruit, P., 1996. Addition of different contributions to the charged particle probe size. *Optik* 101, 101-109.
- Bell, D.C., Erdman, N., 2012. *Low voltage electron microscopy: Principles and applications* John Wiley & Sons.
- Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., McNeil, J.H., 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light-microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technology* 51, 71-97.
- Bernet, C., Garret, M., Debarbeyrac, B., Bebear, C., Bonnet, J., 1989. Detection of *Mycoplasma-Pneumoniae* by using the polymerase chain-reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 2492-2496.
- Bertuccio, G., Pullia, A., DeGeronimo, G., 1996. Criteria of choice of the front-end

transistor for low-noise preamplification of detector signals at sub-microsecond shaping times for X- and gamma-ray spectroscopy. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section A: Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* 380, 301-307.

Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., Hess, H.F., 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313, 1642-1645.

Bogner, A., Thollet, G., Basset, D., Jouneau, P.H., Gauthier, C., 2005. Wet STEM: A new development in environmental SEM for imaging nano-objects included in a liquid phase. *Ultramicroscopy* 104, 290-301.

Branden, C., Tooze, J., 1991. *Introduction to protein structure* Garland New York.

Butler, E.P., Hale, K.F., 1981. *Dynamic Experiments in the Electron Microscope* North-Holland, New York.

Carlsson, L., Vanessen, C.G., 1974. Efficient apparatus for studying cathodoluminescence in scanning electron-microscope. *Journal of Physics E-Scientific Instruments* 7, 98-100.

Cazaux, J., 1999. Mechanisms of charging in electron spectroscopy. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 105, 155-185.

Chapman, H.N., Fromme, P., Barty, A., White, T.A., Kirian, R.A., Aquila, A., Hunter, M.S., Schulz, J., DePonte, D.P., Weierstall, U., Doak, R.B., Maia, F.R.N.C., Martin, A.V., Schlichting, I., Lomb, L., Coppola, N., Shoeman, R.L., Epp, S.W., Hartmann, R., Rolles, D., Rudenko, A., Foucar, L., Kimmel, N., Weidenspointner, G., Holl, P., Liang, M., Barthelmess, M., Caleman, C., Boutet, S., Bogan, M.J., Krzywinski, J., Bostedt, C., Bajt, S., Gumprecht, L., Rudek, B., Erk, B., Schmidt, C., Hoemke, A., Reich, C., Pietschner, D., Strueder, L., Hauser, G., Gorke, H., Ullrich, J., Herrmann, S., Schaller, G., Schopper, F., Soltau, H., Kuehnel, K.-U., Messerschmidt, M., Bozek, J.D., Hau-Riege, S.P., Frank, M., Hampton, C.Y., Sierra, R.G., Starodub, D., Williams, G.J., Hajdu, J., Timneanu, N., Seibert, M.M., Andreasson, J., Rucker, A., Joensson, O., Svenda, M., Stern, S., Nass, K., Andritschke, R., Schroeter, C.-D., Krasniqi, F., Bott, M., Schmidt, K.E., Wang, X., Grotjohann, I., Holton, J.M., Barends, T.R.M., Neutze, R., Marchesini, S., Fromme, R., Schorb, S., Rupp, D., Adolph, M., Gorkhover, T., Andersson, I., Hirsemann, H., Potdevin, G., Graafsma, H., Nilsson, B., Spence, J.C.H., 2011. Femtosecond X-ray protein nanocrystallography. *Nature* 470, 73-U81.

Cho, K., Ryoo, R., Asahina, S., Xiao, C., Klingstedt, M., Umemura, A., Anderson, M.W., Terasaki, O., 2011. Mesopore generation by organosilane surfactant during LTA zeolite crystallization, investigated by high-resolution SEM and Monte Carlo simulation. *Solid State Sciences* 13, 750-756.

Cobut, V., Frongillo, Y., Patau, J., Goulet, T., Fraser, M., Jay-Gerin, J., 1998. Monte Carlo

simulation of fast electron and proton tracks in liquid water-I. Physical and physicochemical aspects. *Radiation Physics and Chemistry* 51, 229-244.

Colliex, C., Jeanguillaume, C., Mory, C., 1984. Unconventional modes for STEM imaging of biological structures. *Journal of Ultrastructure Research* 88, 177-206.

Coulibaly, F., Chiu, E., Ikeda, K., Gutmann, S., Haebel, P.W., Schulze-Briese, C., Mori, H., Metcalf, P., 2007. The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature* 446, 97-101.

Creemer, J.F., Helveg, S., Hoveling, G.H., Ullmann, S., Molenbroek, A.M., Sarro, P.M., Zandbergen, H.W., 2008. Atomic-scale electron microscopy at ambient pressure. *Ultramicroscopy* 108, 993-998.

Crewe, A.V., Eggenberger, D.N., Wall, J., Welter, L.M., 1968. Electron gun using a field emission source. *Review of Scientific Instruments* 39, 576-583.

Cristiano, R., Esposito, E., Frunzio, L., Pagano, S., Barone, A., Peluso, G., Pepe, G., Akoh, H., Nagakawa, H., Takada, S., 1993. X-RAY-detection by Nb STJS above 1.4 K. *Journal of Low Temperature Physics* 93, 691-696.

Danilatos, G.D., 1981. The examination of fresh or living plant-material in an environmental scanning electron-microscope. *Journal of Microscopy-Oxford* 121, 235-238.

Danilatos, G.D., 1991. Review and outline of environmental SEM at present. *Journal of Microscopy-Oxford* 162, 391-402.

Daulton, T.L., Little, B.J., Lowe, K., Jones-Meehan, J., 2001. In situ environmental cell-transmission electron microscopy study of microbial reduction of chromium(VI) using electron energy loss spectroscopy. *Microscopy and Microanalysis* 7, 470-485.

de Jonge, N., Ross, F.M., 2011. Electron microscopy of specimens in liquid. *Nature Nanotechnology* 6, 695-704.

de Jonge, N., Peckys, D.B., Kremers, G.J., Piston, D.W., 2009. Electron microscopy of whole cells in liquid with nanometer resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 2159-2164.

Deng, H., Grunder, S., Cordova, K.E., Valente, C., Furukawa, H., Hmadeh, M., Gándara, F., Whalley, A.C., Liu, Z., Asahina, S., 2012. Large-pore apertures in a series of metal-organic frameworks. *science* 336, 1018-1023.

Denk, W., Strickler, J.H., Webb, W.W., 1990. 2-Photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76.

Dierks, K., Meyer, A., Einspahr, H., Betzel, C., 2008. Dynamic light scattering in protein crystallization droplets: Adaptations for analysis and optimization of crystallization processes. *Crystal Growth & Design* 8, 1628-1634.

Ding, Z.J., Shimizu, R., 1996. A Monte Carlo modeling of electron interaction with solids including cascade secondary electron production. *Scanning* 18, 92-113.

Donnert, G., Keller, J., Medda, R., Andrei, M.A., Rizzoli, S.O., Luehrmann, R., Jahn, R., Eggeling, C., Hell, S.W., 2006. Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11440-11445.

Draganic, I., Draganic, Z., 1971. *The radiation chemistry of water* Academic Press, New York.

Drouin, D., Hovington, P., Gauvin, R., 1997. CASINO: A new Monte Carlo code in C language for electron beam interactions—part II: Tabulated values of the Mott cross section. *Scanning* 19, 20-28.

Drouin, D., Couture, A.R., Joly, D., Tastet, X., Aimez, V., Gauvin, R., 2007. CASINO V2. 42 – A Fast and easy - to - use modeling tool for scanning electron microscopy and microanalysis users. *Scanning* 29, 92-101.

Dukes, M.J., Peckys, D.B., de Jonge, N., 2010. Correlative Fluorescence Microscopy and Scanning Transmission Electron Microscopy of Quantum-Dot-Labeled Proteins in Whole Cells in Liquid. *Acs Nano* 4, 4110-4116.

Dumke, R., von Baum, H., Lueck, P.C., Jacobs, E., 2010. Occurrence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany. *Clinical Microbiology and Infection* 16, 613-616.

Durbin, S.D., Feher, G., 1990. Studies of crystal-growth mechanisms of proteins by electron-microscopy. *Journal of Molecular Biology* 212, 763-774.

Durbin, S.D., Carlson, W.E., 1992. Lysozyme crystal-growth studied by atomic force microscopy. *Journal of Crystal Growth* 122, 71-79.

Durbin, S.D., Carlson, W.E., Saros, M.T., 1993. In-situ studies of protein crystal-growth by atomic-force microscopy. *Journal of Physics D-Applied Physics* 26, B128-B132.

Ebihara, T., Kawabata, I., Usui, S., Sobue, K., Okabe, S., 2003. Synchronized formation and remodeling of postsynaptic densities: Long-term visualization of hippocampal neurons expressing postsynaptic density proteins tagged with green fluorescent protein. *Journal of Neuroscience* 23, 2170-2181.

Egerton, R.F., 1996. *Electron energy-loss spectroscopy in the electron microscope* Springer.

Engel, A., 1991. Biological applications of scanning probe microscopes. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 20, 79-108.

Everhart, T.E., Thornley, R.F.M., 1960. Wide-band detector for micro-microampere low-energy electron currents. *Journal of Scientific Instruments* 37, 246-248.

Fiorini, C., Kemmer, J., Lechner, P., Kromer, K., Rohde, M., Schulein, T., 1997. A new detection system for x-ray microanalysis based on a silicon drift detector with Peltier cooling. *Review of scientific instruments* 68, 2461-2465.

- Frank, J., 1996. Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies Academic Press.
- Frosien, J., Plies, E., 1987. High performance electron optical column for testing ICs with submicrometer design rules. *Microelectronic Engineering* 7, 163-172.
- Frosien, J., Plies, E., Anger, K., 1989. Compound magnetic and electrostatic lenses for low-voltage applications. *Journal of Vacuum Science & Technology B* 7, 1874-1877.
- Fujiyoshi, Y., 1998. The structural study of membrane proteins by electron crystallography. *Advances in Biophysics*, Vol 35 1998 35, 25-80.
- Fukuma, T., Kimura, M., Kobayashi, K., Matsushige, K., Yamada, H., 2005. Development of low noise cantilever deflection sensor for multienvironment frequency-modulation atomic force microscopy. *Review of Scientific Instruments* 76.
- Fukushima, K., Ishikawa, A., Fukami, A., 1985. Injection of liquid into environmental cell for in situ observations. *Journal of Electron Microscopy* 34, 47-51.
- Fullam, E.F., 1972. Closed wet cell for electron-microscope. *Review of Scientific Instruments* 43, 245-&.
- Gai, P.L., 2002a. Development of wet environmental TEM (Wet-ETEM) for in situ studies of liquid-catalyst reactions on the nanoscale. *Microscopy and Microanalysis* 8, 21-28.
- Gai, P.L., 2002b. Developments in in situ environmental cell high-resolution electron microscopy and applications to catalysis. *Topics in Catalysis* 21, 161-173.
- Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H., 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296, 503-507.
- Galeano, C., Güttel, R., Paul, M., Arnal, P., Lu, A.H., Schüth, F., 2011. Yolk - Shell gold nanoparticles as model materials for support - effect studies in heterogeneous catalysis: Au,@ C and Au,@ ZrO₂ for CO oxidation as an example. *Chemistry-A European Journal* 17, 8434-8439.
- Gasperini, R., Choi-Lundberg, D., Thompson, M., Mitchell, C.B., Foa, L., 2009. Homer regulates calcium signalling in growth cone turning. *Neural Dev* 4, 1-18.
- Gatti, E., Rehak, P., 1984. Semiconductor drift chamber—an application of a novel charge transport scheme. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 225, 608-614.
- Gatti, E., Manfredi, P., Sampietro, M., Speziali, V., 1990. Suboptimal filtering of 1/f-noise in detector charge measurements. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 297, 467-478.
- Giepmans, B.N.G., Deerinck, T.J., Smarr, B.L., Jones, Y.Z., Ellisman, M.H., 2005. Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots. *Nature Methods* 2, 743-749.

Glaeser, R.M., Taylor, K.A., 1978. Radiation damage relative to transmission electron microscopy of biological specimens at low temperature: a review. *Journal of microscopy* 112, 127-138.

Goldstein, J., Newbury, D.E., Joy, D.C., Echlin, P., Lyman, C.E., Lifshin, E., 2003. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis* Springer Us.

Green, E.D., Kino, G.S., 1991. Atmospheric-scanning electron-microscopy using silicon-nitride thin-film windows. *Journal of Vacuum Science & Technology B* 9, 1557-1558.

Grier, D., Benjacob, E., Clarke, R., Sander, L.M., 1986. Morphology and microstructure in electrochemical deposition of zinc. *Physical Review Letters* 56, 1264-1267.

Griffiths, G., Burke, B., Lucocq, J., 1993. *Fine structure immunocytochemistry* Springer-Verlag Berlin:

Gustafsson, M.G.L., 2005. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13081-13086.

Harsanyi, G., 1999. Irregular effect of chloride impurities on migration failure reliability: contradictions or understandable? *Microelectronics Reliability* 39, 1407-1411.

He, C.B., Donald, A.M., 1996. Morphology of core-shell polymer lattices during drying. *Langmuir* 12, 6250-6256.

Hell, S.W., 2007. Far-field optical nanoscopy. *Science* 316, 1153-1158.

Hell, S.W., Wichmann, J., 1994. Breaking the diffraction resolution limit by Stimulated-Emission-Depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters* 19, 780-782.

Henderson, G.P., Jensen, G.J., 2006. Three-dimensional structure of *Mycoplasma pneumoniae*'s attachment organelle and a model for its role in gliding motility. *Molecular Microbiology* 60, 376-385.

Henderson, R., 2004. Realizing the potential of electron cryo-microscopy. *Quarterly Reviews of Biophysics* 37, 3-13.

Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, B.C., Herrmann, R., 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research* 24, 4420-4449.

Hoenger, A., Bouchet-Marquis, C., 2011. Cellular tomography, p. 67-90, in: S. J. Ludtke and B. V. V. Prasad, Eds.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, Vol 82: Recent Advances in Electron Cryomicroscopy, Pt B*.

Hordon, L.S., Huang, Z., Maluf, N., Browning, R., Pease, R.F.W., 1993. Limits of low - energy electron optics. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* 11, 2299-2303.

Hsu, T.R., 2008. *MEMS & Microsystems: Design, Manufacture, and Nanoscale*

Engineering John Wiley & Sons.

Hwang, H.L., Hwu, C.C., Liue, J.C., Lih, H.H., 1982. Analysis of low-pressure chemical vapor-deposited silicon-nitride by rutherford backscattering spectrometry. *Applied Physics Letters* 41, 844-846.

Iancu, C.V., Wright, E.R., Heymann, J.B., Jensen, G.J., 2006. A comparison of liquid nitrogen and liquid helium as cryogens for electron cryotomography. *Journal of Structural Biology* 153, 231-240.

IDSC, <<http://idsc.nih.gov/idwr/kanja/weeklygraph/18myco-e.html>>.

Inaga, S., Katsumoto, T., Tanaka, K., Kameie, T., Nakane, H., Naguro, T., 2007. Platinum blue as an alternative to uranyl acetate for staining in transmission electron microscopy. *Archives of Histology and Cytology* 70, 43-49.

Ishibashi, K., Mori, K., Takeno, K., Nagae, T., Matsumoto, Y., Takada, S., Nakagawa, H., Akoh, H., 1991. Output signal from Nb-based tunnel-junctions by irradiation of 6 keV X-rays. *Ieee Transactions on Magnetics* 27, 2661-2664.

Jaffe, J.D., Stange-Thomann, N., Smith, C., DeCaprio, D., Fisher, S., Butler, J., Calvo, S., Elkins, T., Fitzgerald, M.G., Hafez, N., Kodira, C.D., Major, J., Wang, S.G., Wilkinson, J., Nicol, R., Nusbaum, C., Birren, B., Berg, H.C., Church, G.M., 2004. The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. *Genome Research* 14, 1447-1461.

Jang, K.-J., Kim, M.S., Feltrin, D., Jeon, N.L., Suh, K.-Y., Pertz, O., 2010. Two Distinct Filopodia Populations at the Growth Cone Allow to Sense Nanotopographical Extracellular Matrix Cues to Guide Neurite Outgrowth. *Plos One* 5.

Jochum, J., Kraus, H., Gutsche, M., Kemmather, B., Vonfeilitzsch, F., Mossbauer, R.L., 1994. Electronic noise of superconducting tunnel junction detectors. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* 338, 458-466.

Joy, D., Luo, S., 1989. An empirical stopping power relationship for low - energy electrons. *Scanning* 11, 176-180.

Joy, D.C., 1991. Contrast in high - resolution scanning electron microscope images. *Journal of microscopy* 161, 343-355.

Joy, D.C., Joy, C.S., 1996. Low voltage scanning electron microscopy. *Micron* 27, 247-263.

Judge, R.A., Swift, K., Gonzalez, C., 2005. An ultraviolet fluorescence-based method for identifying and distinguishing protein crystals. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 61, 60-66.

Kaiser, B.K., Yim, D., Chow, I.T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H.H., Strong, R.K., Groh, V., Spies, T., 2007. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 447, 482-U485.

- Kanani, N., 2004. *Electroplating: basic principles, processes and practice* Elsevier.
- Kanaya, K., Okayama, S., 1972. Penetration and energy-loss theory of electrons in solid targets. *Journal of Physics D: Applied Physics* 5, 43-58.
- Kato, H.E., Zhang, F., Yizhar, O., Ramakrishnan, C., Nishizawa, T., Hirata, K., Ito, J., Aita, Y., Tsukazaki, T., Hayashi, S., Hegemann, P., Maturana, A.D., Ishitani, R., Deisseroth, K., Nureki, O., 2012. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature* 482, 369-U115.
- Kenri, T., Seto, S., Horino, A., Sasaki, Y., Sasaki, T., Miyata, M., 2004. Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. *Journal of Bacteriology* 186, 6944-6955.
- Khurshid, A., 2002. Ultimate resolution limits for scanning electron microscope immersion objective lenses. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics* 113, 67-77.
- Kinney, W., Shepherd, W., Miller, W., Evans, J., Womack, R. 1987. A non-volatile memory cell based on ferroelectric storage capacitors, pp. 850-851 *Electron Devices Meeting, 1987 International*, Vol. 33. IEEE.
- Kissick, D.J., Gualtieri, E.J., Simpson, G.J., Cherezov, V., 2010. Nonlinear Optical Imaging of Integral Membrane Protein Crystals in Lipidic Mesophases. *Analytical Chemistry* 82, 491-497.
- Kiyonaka, S., Kato, K., Nishida, M., Mio, K., Numaga, T., Sawaguchi, Y., Yoshida, T., Wakamori, M., Mori, E., Numata, T., Ishii, M., Takemoto, H., Ojida, A., Watanabe, K., Uemura, A., Kurose, H., Morii, T., Kobayashi, T., Sato, Y., Sato, C., Hamachi, I., Mori, Y., 2009. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5400-5405.
- Kjellman, T., Reichhardt, N.V., Sakeye, M., Smått, J.-H., Lindén, M., Alfredsson, V., 2013. Independent fine-tuning of intrawall and primary mesoporosity of SBA-15. *Chemistry of Materials* 25, 1989-1997.
- Kodama, A., Lechler, T., Fuchs, E., 2004. Coordinating cytoskeletal tracks to polarize cellular movements. *Journal of Cell Biology* 167, 203-207.
- Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R., Ando, T., 2010. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* 468, 72-+.
- Kurakado, M., 1982. Possibility of high-resolution detectors using superconducting tunnel-junctions. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research* 196, 275-277.
- Kurakado, M., Matsumura, A., 1989. X-ray-detection with Nb/AlO_x/Nb superconductor

detectors. *Japanese Journal of Applied Physics Part 2-Letters* 28, L459-L461.

Kurakado, M., Matsumura, A., Takahashi, T., Ito, S., Katano, R., Isozumi, Y., 1991. Superconductive radiation detector with large sensitive area (series-connected STJ detector). *Review of Scientific Instruments* 62, 156-162.

Kusumoto, A., Seto, S., Jaffe, J.D., Miyata, M., 2004. Cell surface differentiation of *Mycoplasma mobile* visualized by surface protein localization. *Microbiology-Sgm* 150, 4001-4008.

Lechner, P., Eckbauer, S., Hartmann, R., Krisch, S., Hauff, D., Richter, R., Soltau, H., Strüder, L., Fiorini, C., Gatti, E., 1996. Silicon drift detectors for high resolution room temperature X-ray spectroscopy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 377, 346-351.

Lechner, P., Fiorini, C., Hartmann, R., Kemmer, J., Krause, N., Leutenegger, P., Longoni, A., Soltau, H., Stötter, D., Stötter, R., 2001. Silicon drift detectors for high count rate X-ray spectroscopy at room temperature. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 458, 281-287.

Leis, A., Rockel, B., Andrees, L., Baumeister, W., 2009. Visualizing cells at the nanoscale. *Trends in Biochemical Sciences* 34, 60-70.

Lesoil, C., Nonaka, T., Sekiguchi, H., Osada, T., Miyata, M., Afrin, R., Ikai, A., 2010. Molecular shape and binding force of *Mycoplasma mobile*'s leg protein Gli349 revealed by an AFM study. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391, 1312-1317.

Li, M.R., Nadarajah, A., Pusey, M.L., 1999. Growth of (101) faces of tetragonal lysozyme crystals: determination of the growth mechanism. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 55, 1012-1022.

Lind, K., 1982. Serological cross-reactions between *Mycoplasma-Genitalium* and *Mycoplasma-Neumoniae*. *Lancet* 2, 1158-1159.

Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Meyer, T., 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current Biology* 15, 1235-1241.

Liu, S., Han, L., Duan, Y., Asahina, S., Terasaki, O., Cao, Y., Liu, B., Ma, L., Zhang, J., Che, S., 2012. Synthesis of chiral TiO₂ nanofibre with electron transition-based optical activity. *Nature communications* 3, 1215-1220.

Liu, Z., Fujita, N., Miyasaka, K., Han, L., Stevens, S.M., Suga, M., Asahina, S., Slater, B., Xiao, C., Sakamoto, Y., Anderson, M.W., Ryoo, R., Terasaki, O., 2013. A review of fine structures of nanoporous materials as evidenced by microscopic methods. *Microscopy* 62, 109-146.

Müller-Reichert, T., Verkade, P., 2012. Correlative Light and Electron Microscopy

Academic Press.

Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y., Tsukihara, T., 2009. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 angstrom resolution. *Nature* 458, 597-U561.

Maruyama, Y., Ebihara, T., Nishiyama, H., Suga, M., Sato, C., 2012a. Immuno EM-OM correlative microscopy in solution by atmospheric scanning electron microscopy (ASEM). *Journal of structural biology* 180, 259-270.

Maruyama, Y., Ebihara, T., Nishiyama, H., Konyuba, Y., Senda, M., Numaga-Tomita, T., Senda, T., Suga, M., Sato, C., 2012b. Direct observation of protein microcrystals in crystallization buffer by atmospheric scanning electron microscopy. *International journal of molecular sciences* 13, 10553-10567.

Matsuda, K., Kasama, T., Ishizuka, I., Handa, S., Yamamoto, N., Taki, T., 1994. Structure of a novel phosphocholine-containing glycolipid from *Mycoplasma fermentans*. *Journal of Biological Chemistry* 269, 33123-33128.

Matsumura, A., Takahashi, T., Kurakado, M., 1994. Effect of Al overlayer thickness on the leakage current of radiation detectors using Nb/Al-AlO_x/Nb superconducting tunnel-junctions. *Journal of Applied Physics* 76, 4761-4765.

Matthews, B.W., 1968. Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology* 33, 491-&.

Maunsbach, A.B., Afzelius, B.A., 1998. Immunocytochemistry. In: *Immunocytochemistry. In: Biomedical electron microscopy: Illustrated methods and interpretations* Academic Press.

McCarthy, J., Friel, J., Camus, P., 2009. Impact of 40 years of technology advances on EDS system performance. *Microscopy and Microanalysis* 15, 484-490.

McEwen, B.F., Marko, M., 2001. The emergence of electron tomography as an important tool for investigating cellular ultrastructure. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 49, 553-563.

McPherson, A., 1989. Preparation and analysis of protein crystals Krieger Malabar, FL.

Mears, C.A., Labov, S.E., Barfknecht, A.T., 1993. High-resolution superconducting X-ray detectors with 2 aluminum trapping layers. *Journal of Low Temperature Physics* 93, 561-566.

Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G., Baumeister, W., 2002. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science* 298, 1209-1213.

Melchinger, A., Hofmann, S., 1995. Dynamic double-layer model - Description of time-dependent charging phenomena in insulators under electron-beam irradiation. *Journal*

of Applied Physics 78, 6224-6232.

Mercer, J.C., DeHaven, W.I., Smyth, J.T., Wedel, B., Boyles, R.R., Bird, G.S., Putney, J.W., Jr., 2006. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *Journal of Biological Chemistry* 281, 24979-24990.

Merli, P., Migliori, A., Nacucchi, M., Govoni, D., Mattei, G., 1995. On the resolution of semiconductor multilayers with a scanning electron microscope. *Ultramicroscopy* 60, 229-239.

Miyachi, A., Miyazaki, A., Shingu, Y., Matsuda, K., Dohi, H., Nishida, Y., 2009. Synthesis and absolute structures of *Mycoplasma pneumoniae* beta-glyceroglycolipid antigens. *Carbohydrate Research* 344, 36-43.

Miyata, M., 2008. Centipede and inchworm models to explain *Mycoplasma* gliding. *Trends in Microbiology* 16, 6-12.

Miyata, M., 2010. Unique centipede mechanism of *Mycoplasma* gliding, p. 519-537, in: S. Gottesman and C. S. Harwood, Eds.), *Annual Review of Microbiology*, Vol 64, 2010.

Miyata, M., Ogaki, H., 2006. Cytoskeleton of Mollicutes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 11, 256-264.

Morozumi, M., Takahashi, T., Ubukata, K., 2010. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: characteristics of isolates and clinical aspects of community-acquired pneumonia. *Journal of Infection and Chemotherapy* 16, 78-86.

Mullerova, I., Lenc, M., 1992. Some approaches to low-voltage scanning electron-microscopy. *Ultramicroscopy* 41, 399-410.

Mullin, J.W., 2001. *Crystallization* Butterworth-Heinemann.

Murai, T., Sato, M., Nishiyama, H., Suga, M., Sato, C., 2013a. Ultrastructural Analysis of Nanogold-Labeled Cell Surface Microvilli in Liquid by Atmospheric Scanning Electron Microscopy and Their Relevance in Cell Adhesion. *International journal of molecular sciences* 14, 20809-20819.

Murai, T., Maruyama, Y., Mio, K., Nishiyama, H., Suga, M., Sato, C., 2011a. Low cholesterol triggers membrane microdomain-dependent CD44 shedding and suppresses tumor cell migration. *Journal of Biological Chemistry* 286, 1999-2007.

Murai, T., Maruyama, Y., Mio, K., Nishiyama, H., Suga, M., Sato, C., 2011b. Low Cholesterol Triggers Membrane Microdomain-dependent CD44 Shedding and Suppresses Tumor Cell Migration. *J Biol Chem* 286, 1999-2007.

Murai, T., Sato, C., Sato, M., Nishiyama, H., Suga, M., Mio, K., Kawashima, H., 2013b. Membrane cholesterol modulates the hyaluronan-binding ability of CD44 in T lymphocytes and controls rolling under shear flow. *Journal of cell science* 126, 3284-3294.

Murata, K., Matsukawa, T., Shimizu, R., 1971. Monte Carlo calculations on electron scattering in a solid target. *Japanese Journal of Applied Physics* 10, 678-686.

Muto, S., Senda, M., Adachi, N., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T., Horikoshi, M., 2004. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of human oncoprotein SET/TAF-1 beta. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 60, 712-714.

Nagai, R., Miyata, M., 2006. Gliding motility of *Mycoplasma mobile* can occur by repeated binding to N-acetylneuraminyllactose (sialyllactose) fixed on solid surfaces. *Journal of Bacteriology* 188, 6469-6475.

Nakamae, K., Fujioka, H., Ura, K., 1985. A new hemispherical retarding field energy analyser for quantitative voltage measurements in the SEM. *Journal of Physics E: Scientific Instruments* 18, 437.

Nakane, D., Miyata, M., 2007. Cytoskeletal "jellyfish" structure of *Mycoplasma mobile*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19518-19523.

Newbury, D.E., 2006. The new X-ray mapping: X-ray spectrum imaging above 100 kHz output count rate with the silicon drift detector. *Microscopy and Microanalysis* 12, 26-35.

Nishiyama, H., Teramoto, K., Suga, M., Sato, C., 2014. Positively charged nanogold label allows the observation of fine cell filopodia and flagella in solution by atmospheric scanning electron microscopy. *Microscopy Research and Technique* 77, 153-160.

Nishiyama, H., Suga, M., Ogura, T., Maruyama, Y., Koizumi, M., Mio, K., Kitamura, S., Sato, C., 2010. Atmospheric scanning electron microscope observes cells and tissues in open medium through silicon nitride film. *Journal of Structural Biology* 169, 438-449.

O'Brien, J., Unwin, N., 2006. Organization of spines on the dendrites of Purkinje cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1575-1580.

Ogura, T., Tong, K.I., Mio, K., Maruyama, Y., Kurokawa, H., Sato, C., Yamamoto, M., 2010. Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2842-2847.

Onishi, S., Hamada, K., Ishihara, K., Ito, Y., Yokoyama, S., Kudo, J., Sakiyam, K., Ieee, E.D.S., 1994. A half-micron ferroelectric memory cell technology with stacked capacitor structure.

Ose, Y., Ezumi, M., Todokoro, H. 1999. Improved CD-SEM optics with retarding and boosting electric fields, pp. 930-939 *Proceedings of the Society of Photo-optical Instrumentation Engineers (SPIE), metrology, inspection, and process control for*

microlithography XIII, pts 1 and 2, Vol. 3677.

Parsons, D.F., 1986. The usefulness of the high-voltage electron-microscope in biomedical ultrastructure analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 483, 157-160.

Pease, R.F., 1967. Low voltage scanning electron microscopy. *Proc. of the 9th Symp. on Electron, Ion and Laser Beam Technology*, San Francisco Press, San Francisco, 176-187.

Petersen, N.T., Hoiby, N., Mordhorst, C.H., Lind, K., Flensburg, E.W., Bruun, B., 1981. Respiratory-infections in cystic-fibrosis patients caused by virus, Chlamydia and Mycoplasma- possible synergism with *Pseudomonas-aeruginosa*. *Acta Paediatrica Scandinavica* 70, 623-628.

Pohl, K., Stierhof, Y.D., 1998. Action of cold chloride ("gold toning") on silver-enhanced 1 nm gold markers. *Microscopy Research and Technique* 42, 59-65.

Powell, R.D., Hainfeld, J.F., Silver- and gold-based autometallography of nanogold. In: Hacker, G.W., Gu, J. (Eds.), *Gold and Silver Staining: Techniques in Molecular Morphology*. CRC Press, Boca Raton, FL, 29-46.

Powell, R.D., Halsey, C.M.R., Hainfeld, J.F., 1998. Combined fluorescent and gold immunoprobes: Reagents and methods for correlative light and electron microscopy. *Microscopy Research and Technique* 42, 2-12.

Powell, R.D., Halsey, C.M.R., Spector, D.L., Kaurin, S.L., McCann, J., Hainfeld, J.F., 1997. A covalent fluorescent-gold immunoprobe: Simultaneous detection of a pre-mRNA splicing factor by light and electron microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45, 947-956.

Principi, N., Esposito, S., 2001. Emerging role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in paediatric respiratorytract infections. *The Lancet infectious diseases* 1, 334-344.

Rando, N., Peacock, A., Vandordrecht, A., Foden, C., Engelhardt, R., Taylor, B.G., Gare, P., Lumley, J., Pereira, C., 1992. The properties of niobium superconducting tunnel junctions as X-ray detectors. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* 313, 173-195.

Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 1094-+.

Reed, Stephen, Jarvis, Brent, 1997. Electron microprobe analysis. *Electron Microprobe Analysis*, by SJB Reed, Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Reimer, L., 1998. *Scanning Electron Microscopy*. 2nd ed. Springer-Verlag.

Renoud, R., Mady, F., Ganachaud, J.P., 2002. Monte Carlo simulation of the charge distribution induced by a high-energy electron beam in an insulating target. *Journal of Physics-Condensed Matter* 14, 231-247.

- Reznikov, M., Blackmore, T.K., Finlayjones, J.J., Gordon, D.L., 1995. Comparison of nasopharyngeal aspirates and throat swab specimens in a polymerase chain reaction-based test for *Mycoplasma-Neumoniae*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 14, 58-61.
- Rieder, C.L., 1981. Thick and thin serial sectioning for the three-dimensional reconstruction of biological ultrastructure. *Methods in cell biology* 22, 215.
- Riekkel, C., Burghammer, M., Schertler, G., 2005. Protein crystallography microdiffraction. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 556-562.
- Robinson, J.M., Vandre, D.D., 1997. Efficient immunocytochemical labeling of leukocyte microtubules with FluoroNanogold: An important tool for correlative microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45, 631-642.
- Robinson, V.N.E., 1975. Wet stage modification to a scanning electron-microscope. *Journal of Microscopy-Oxford* 103, 71-77.
- Rosenber.B, Vancamp, L., Krigas, T., 1965. Inhibition of cell division in *Escherichia Coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205, 698-&.
- Rosenthal, P.B., Henderson, R., 2003. Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. *Journal of Molecular Biology* 333, 721-745.
- Rust, M.J., Bates, M., Zhuang, X., 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods* 3, 793-795.
- Sato, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A., Fujiyoshi, Y., 2001. The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* 409, 1047-1051.
- Sato, C., Manaka, S., Nakane, D., Nishiyama, H., Suga, M., Nishizaka, T., Miyata, M., Maruyama, Y., 2012. Rapid imaging of mycoplasma in solution using Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417, 1213-1218.
- Sato, K., Nagoshi, M., Kawano, T., 2007. Application of Low-voltage Scanning Electron Microscopy to the Characterization of Steel Surface. *Tetsu to Hagane-Journal of the Iron and Steel Institute of Japan* 93, 99-104.
- Sato, M., 2008. Resolution. *Handbook of Charged Particle Optics, Second Edition*, ed. by Jon Orloff, CRC Press, 391-435.
- Sato, M., Orloff, J., 1991. A method for calculating the current density of charged particle beams and the effect of finite source size and spherical and chromatic aberrations on the focusing characteristics. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* 9, 2602-2608.

Sawada, Y., Dougherty, A., Gollub, J.P., 1986. Dendritic and fractal patterns in electrolytic metal deposits. *Physical Review Letters* 56, 1260-1263.

Schlosser, D., Lechner, P., Lutz, G., Niculae, A., Soltau, H., Strüder, L., Eckhardt, R., Hermenau, K., Schaller, G., Schopper, F., 2010. Expanding the detection efficiency of silicon drift detectors. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 624, 270-276.

Seiler, H., 1983. Secondary electron emission in the scanning electron microscope. *Journal of Applied Physics* 54, R1-R18.

Shimizu, R., Ze-Jun, D., 1992. Monte Carlo modelling of electron-solid interactions. *Reports on Progress in Physics* 55, 487.

Sjostrand, F.S., 1958. Ultrastructure of retinal rod synapses of the Guinea pig eye as revealed by 3-dimensional reconstructions from serial sections. *Journal of Ultrastructure Research* 2, 122-170.

Smith, A.M., Nie, S., 2009. Next-generation quantum dots. *Nature Biotechnology* 27, 732-733.

Spence, J.C., 2013. *High-resolution electron microscopy* Oxford University Press.

Stevens, S.M., Jansson, K., Xiao, C., Asahina, S., Klingstedt, M., Grüner, D., Sakamoto, Y., Miyasaka, K., Cubillas, P., Brent, R., 2009. An appraisal of high resolution scanning electron microscopy applied to porous materials. *JEOL news* 44, 17-22.

Strüder, L., Meidinger, N., Stotter, D., Kemmer, J., Lechner, P., Leutenegger, P., Soltau, H., Eggert, F., Rohde, M., Schulein, T., 1998. High-resolution X-ray spectroscopy close to room temperature. *Microscopy and Microanalysis* 4, 622-631.

Suga, M., Kominami, S., 1995. Oxygen-plasma-treated superconductor-insulator-superconductor junction for radiation detector. *Japanese journal of applied physics* 34, 4047-4049.

Suga, M., Torii, K., Kumihashi, T., Kakibayashi, H., 2000. Highly accurate composition analysis of (Pb, Zr) TiO₃ using a scanning electron microscope/energy dispersive X-ray spectrometer. *Japanese Journal of Applied Physics* 39, 316.

Suga, M., Nishiyama, H., Ebihara, T., Ogura, T., Sato, C., 2009. Atmospheric electron microscope: Limits of observable depth. *Microscopy and Microanalysis* 15, 924-925.

Suga, M., Nishiyama, H., Konyuba, Y., Iwamatsu, S., Watanabe, Y., Yoshiura, C., Ueda, T., Sato, C., 2011. The atmospheric scanning electron microscope with open sample space observes dynamic phenomena in liquid or gas. *Ultramicroscopy* 111, 1650-1658.

Suga, M., Asahina, S., Sakuda, Y., Kazumori, H., Nishiyama, H., Nokuo, T., Alfredsson, V., Kjellman, T., Stevens, S.M., Cho, H.S., 2014. Recent progress in scanning electron microscopy for characterising fine structural details of nano materials. *Progress in Solid*

State Chemistry 42, 1.

Sumi, T., Moriwaki, N., Nakane, G., Nakakuma, T., Judai, Y., Uemoto, Y., Nagano, Y., Hayashi, S., Azuma, M., Fujii, E. 1994. A 256 kb nonvolatile ferroelectric memory at 3 V and 100 ns, pp. 268-269 Solid-State Circuits Conference, 1994. Digest of Technical Papers. 41st ISSCC., 1994 IEEE International. IEEE.

Swanson, L., Schwind, G., 2008. Review of ZrO/W Schottky Cathode. Handbook of Charged Particle Optics, Second Edition, ed by Jon Orloff, CRC Press, 1-28.

Swanson, L.W., Crouser, L.C., 1969. Angular confinement of field electron and ion emission. Journal of Applied Physics 40, 4741-4749.

Swift, J.A., Brown, A.C., 1970. Environmental cell for examination of wet biological specimens at atmospheric pressure by transmission scanning electron microscopy. Journal of Physics E-Scientific Instruments 3, 924-&.

Sze, S.M., 1998. VLSI technology McGraw-Hill.

Tadmor, R., Hernandez-Zapata, E., Chen, N., Pincus, P., Israelachvili, J.N., 2002. Debye length and double-layer forces in polyelectrolyte solutions. Macromolecules 35, 2380-2388.

Takizawa, T., Suzuki, K., Robinson, J.M., 1998. Correlative microscopy using FluoroNanogold on ultrathin cryosections: Proof of principle. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 46, 1097-1102.

Tanabe, N., Matsuki, T., Saitoh, S., Takeuchi, T., Kobayashi, S., Nakajima, T., Maejima, Y., Hayashi, Y., Amanuma, K., Hase, T. 1995. A ferroelectric capacitor over bit-line (F-COB) cell for high density nonvolatile ferroelectric memories, pp. 123-124 VLSI Technology, 1995. Digest of Technical Papers. 1995 Symposium on. IEEE.

Tanious, F.A., Veal, J.M., Buczak, H., Ratmeyer, L.S., Wilson, W.D., 1992. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA - Minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. Biochemistry 31, 3103-3112.

Terasaki, O., HaeSung, C., Minhyung, C., Asahina, S., Yusuke, S., Suga, M., Hiroyoshi, K., Masato, K., Takeshi, N., Zheng, L., Sam, S., Anderson, M.W., Carolina, G.N.D., Ferdi, S., Tomas, K., Viveka, A., Lu, H., Shunai, C., Hexiang, D., Omar, Y., Cho, K., Ryoo, R., 2013. Novel Structural Characterisations of Insulating and Electron Beam Sensitive Materials Employing Low Voltage High Resolution Scanning Electron Microscopy. JEOL News 48, 21-31.

Thiberge, S., Zik, O., Moses, E., 2004a. An apparatus for imaging liquids, cells, and other wet samples in the scanning electron microscopy. Review of Scientific Instruments 75, 2280-2289.

Thiberge, S., Nechushtan, A., Sprinzak, D., Gileadi, O., Behar, V., Zik, O., Chowers, Y., Michaeli, S., Schlessinger, J., Moses, E., 2004b. Scanning electron microscopy of cells and

tissues under fully hydrated conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3346-3351.

Todokoro, H., Yoneda, S., Yamaguchi, K., Fukuhara, S., Komoda, T., 1985. Stroboscopic testing of LSIs with low voltage scanning electron microscope. *Journal of Microscopy* 140, 313-322.

Toida, K., Kosaka, K., Heizmann, C.W., Kosaka, T., 1996. Electron microscopic serial-sectioning reconstruction study of parvalbumin-containing neurons in the external plexiform layer of the rat olfactory bulb. *Neuroscience* 72, 449-466.

Torii, K., Saitoh, S., Ohji, Y., 1994. Prepatation of lead-zirconate-titanate thin-films by reactive evaporation. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1-Regular Papers Short Notes & Review Papers* 33, 5287-5290.

Torii, K., Kawakami, H., Miki, H., Kushida, K., Fujisaki, Y., 1997a. Properties of ultra-thin lead zirconate titanate thin films prepared by ozone jet reactive evaporation. *Journal of Applied Physics* 81, 2755-2759.

Torii, K., Kawakami, H., Miki, H., Kushida, K., Itoga, T., Goto, Y., Kumihashi, T., Yokoyama, N., Moniwa, M., Shoji, K., Kaga, T., Fujisaki, Y., 1997b. Process and properties of Pt/Pb(Zr,Ti)O₃/Pt integrated ferroelectric capacitors. *Integrated Ferroelectrics* 16, 21-28.

Tully, J.G., Rose, D.L., Whitcomb, R.F., Wenzel, R.P., 1979. Enhanced isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from throat washings with a newly modified culture-medium. *Journal of Infectious Diseases* 139, 478-482.

Twerenbold, D., 1987. The maximal area of superconducting tunneling junction X-ray detectors determined by the required signal-to-noise ratio. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* 260, 430-436.

Uenoyama, A., Miyata, M., 2005. Gliding ghosts of *Mycoplasma mobile*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 12754-12758.

Uenoyama, A., Kusumoto, A., Miyata, M., 2004. Identification of a 349-kilodalton protein (Gli349) responsible for cytoadherence and glass binding during gliding of *Mycoplasma mobile*. *Journal of Bacteriology* 186, 1537-1545.

Uenoyama, A., Seto, S., Nakane, D., Miyata, M., 2009. Regions on Gli349 and Gli521 protein molecules directly involved in movements of *Mycoplasma mobile* Gliding Machinery, suggested by use of inhibitory antibodies and mutants. *Journal of Bacteriology* 191, 1982-1985.

Van Duzer, T., Turner, C.W., 1981. *Principles of superconductive devices and circuits* Elsevier New York.

Waites, K.B., 2001. *Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections* American Society for

Microbiology.

Waites, K.B., Talkington, D.F., 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 697-+.

Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Vanetten, J., Maniloff, J., Woese, C.R., 1989. A phylogenetic analysis of the Mycoplasmas - Basics for their classification. *Journal of Bacteriology* 171, 6455-6467.

Worley, P.F., Zeng, W., Huang, G., Kim, J.Y., Shin, D.M., Kim, M.S., Yuan, J.P., Kiselyov, K., Muallem, S., 2007. Homer proteins in Ca²⁺ signaling by excitable and non-excitable cells. *Cell Calcium* 42, 363-371.

Wuthrich, K., 1986. *NMR of proteins and nucleic acids* Wiley.

Xin, D., Mi, Z., Han, X., Qin, L., Li, J., Wei, T., Chen, X., Ma, S., Hou, A., Li, G., Shi, D., 2009. Molecular mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae* from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 2158-2159.

Yau, Y.W., Pease, R.F.W., Iranmanesh, A.A., Polasko, K.J., 1981. Generation and applications of finely focused beams of low-energy electrons. *Journal of Vacuum Science and Technology* 19, 1048-1052.

Ying, M.H., Thong, J.T.L., 1994. Insulator charging under irradiation with a stationary electron probe. *Measurement Science and Technology* 5, 1089-1095.

Yonezawa, A., Maruo, M., Takeuchi, T., Morita, S., Noguchi, A., Takaoka, O., Sato, M., Wannberg, B., 2002. Single pole-piece objective lens with electrostatic bipotential lens for SEM. *Journal of Electron Microscopy* 51, 149-156.

Yuk, J.M., Park, J., Ercius, P., Kim, K., Hellebusch, D.J., Crommie, M.F., Lee, J.Y., Zettl, A., Alivisatos, A.P., 2012. High-resolution EM of colloidal nanocrystal growth using graphene liquid cells. *Science* 336, 61-64.

Zach, J., 1990. Resolution limits in low voltage scanning electron microscopes using retarding objective lenses. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* 298, 255-259.

Zheng, H., Smith, R.K., Jun, Y.-w., Kisielowski, C., Dahmen, U., Alivisatos, A.P., 2009. Observation of single colloidal platinum nanocrystal growth trajectories. *Science* 324, 1309-1312.

熊谷和博, 2010. 低加速電圧走査型電子顕微鏡法による無機薄膜観察と像形成原理の研究 (博士論文).

須賀三雄, 2012. 大気圧 SEM によるデンドライト成長の in-situ 評価. 信頼性学会誌 34, 1.

須賀三雄, 西山英利, 祐治, 小., 渡部善幸, 岩松新之輔, 佐藤主税, 2011. 大気圧走査電子顕微鏡 ASEM による液体・気体中での動的観察. 顕微鏡 46, 137.

日本分光学会編, 1989. エネルギー分散型X線分析, 学会出版センター,.