

## 新装置紹介

## 低真空対応分析走査電子顕微鏡

物質分子科学研究領域 中尾 聡、極端紫外光研究施設 酒井 雅弘

走査電子顕微鏡(SEM、Scanning Electron Microscope)は、光学顕微鏡では解像できない小さな表面構造を観察する手段として広く利用されており、上位クラスの機種では分解能は1 nm以下に達している。分子研においても、平成14年度に最高分解能1 nmの電界放射型SEM (FE-SEM、Field Emission SEM)である日本電子(株)製JSM-6700Fを導入し、共同利用機器として公開してきた。これに加えて、平成25年度、文部科学省ナノテクノロジープラットフォームプログラムの平成24年度補正予算で「低真空対応分析走査電子顕微鏡」を導入し、平成26年度から公開を始めている。本装置は、低真空SEMの(株)日立ハイテクノロジーズ製SU6600に、エネルギー分散X線スペクトル(EDSまたはEDX、Energy Dispersive X-ray Spectroscopy)測定分析装置であるブルカー・エイエックスエス(株)製QUANTAXシステムを組み込んだ機器である(図1)。

SU6600はW/Zrショットキーエミッション形の電子銃を有し、加速電圧は

0.5 ~ 30 kVを0.1 kV刻みで設定可能である。ステージは、xyz方向の移動、回転、傾斜の5軸をモーターで駆動し、対応可能な試料サイズは最大150 mmφ、高さ40 mm、重量は試料台を含めて300 gである。ただし、現時点で用意している試料台は10、25、150 mmφで後者2つの中間がない。150 mmφの試料台を使用すると、乗せられる試料は高さ約6 mm、重さ約50 gまでになり、更に一部機能が使用不可になるので、大きめの試料については注意が必要である。

SU6600は低真空SEMと称する通り、試料室を低真空と高真空に切り替えて観察できることが特徴である。一般に高分解能観察を目的とするFE-SEMでは、入射電子線の散乱を避けたり低エネルギーの2次電子を効率よく検出したりするために試料室を高真空にするが、帯電しやすい絶縁試料を導電処理なしで観察することは困難であるし、ガスや水分などを放出するような高真空中で維持できない試料は測定室に導入できない。測定室を低真空対応にす

ることで、高真空対応SEMに比べて分解能などは悪くなるものの、絶縁体試料の観察がある程度まで可能となる。SU6600の低真空は10 ~ 300 Paを10 Pa刻みで設定可能であり、外から気体を導入して設定値に制御される。高真空では気体を導入せず $10^{-3}$  Pa以下となる。導入する気体については、特に雰囲気制限がない場合は部屋の空気を取り込むが、今回導入の機体は必要に応じて高純度窒素に切り替えられるようにしてある。なお、近年では観察対象を更に広げるため測定室が大気圧でもSEM観察可能な機種が市販され始めていて、これらは大気圧SEM (ASEM、Atmospheric SEM)、環境SEM (ESEM、Environmental SEM)などと称されている。本機は大気圧には対応していないので、どの程度の試料までなら対応可能かは事前の確認が必要である。

搭載される検出器の選択により、高真空では2次電子像、反射電子像、明視野透過電子像、一方、低真空では2次電子像、反射電子像に対応している。主として用いられる2次電子像の仕様



図1 低真空対応分析走査電子顕微鏡の外観。低真空対応SEMの(株)日立ハイテクノロジーズ製SU6600とエネルギー分散X線スペクトル測定装置であるブルカー・エイエックスエス(株)製QUANTAXシステムを組み込んだ機器である。

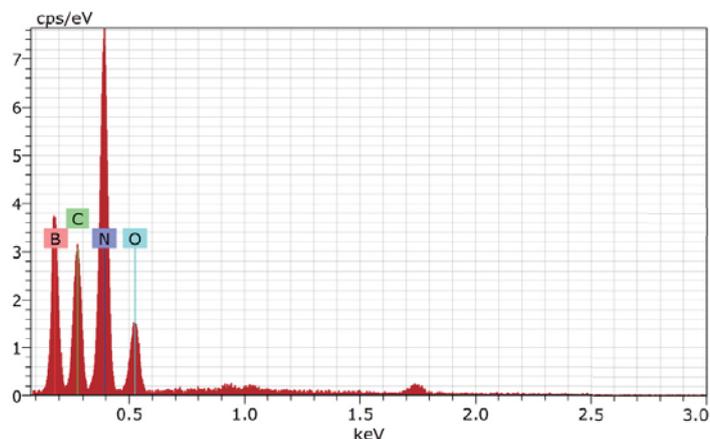


図2 SU6600 + Xflash6|10により取得したBNのX線スペクトル(EDS)。横軸はX線エネルギー (eV)、縦軸は計数率(cps/eV)。

分解能は、高真空で1.2 nm、60 Paの低真空で3.0 nm（ともに加速電圧は30 kV）となっている。なお、低真空で2次電子像を観察する場合、導入気体として空気を用いた方が信号強度が高くなり観察し易い。

SU6600は、対物レンズ光学系として、試料がレンズ磁場の外側にあるアウトレンズ系を採用している。そのため、鉄などのバルク磁性材料もSEM観察可能である。試料表面で電子線を収束させる観点では試料がレンズ磁場の中にあるインレンズ系の方が有利なため、高分解能を目的とした装置にはインレンズ系を採用している機種も多いが、バルク磁性材料などはレンズ磁場に影響を与えるため観察が困難になる。従前のJSM-6700Fはセミインレンズ系を採用しているため、試料の種類やサイズ、作動距離によって対応できないこともあったが、SU6600では使用方法を守る限り問題にならない。SU6600が導入されたことで、測定対象試料が大幅に広がったと言える。ただし、非磁性導電性試料を高分解能で観察しようとする場合はJSM-6700Fの方が良い像を得られることもあるので、用途に応じて使い分けるべきである。

次にQUANTAXシステムによるEDS測定分析について紹介する。本機には2種類のシリコンドリフト検出器（SDD、

Silicon Drift Detector）タイプのEDS検出器XFlash6|10とXFlash5060FQを搭載しており、用途に応じて選択して使用する。JSM-6700F導入時にはSi(Li)半導体検出器が主流であったが、エネルギー分解能を落とさずに高計数率のX線を計測できること、熱ノイズが少なく動作温度を高くできる（Si(Li)検出器が液体窒素冷却で動作させていたのに対し、SDDはペルチェ冷却で動作させる）こと、価格やサイズが同程度に落ち着いたことにより、現在は業界全体でSDDタイプに一変している。

XFlash6|10は筒型の形状、斜め上方配置の一般的な検出器で、検出可能元素は ${}^4\text{Be}$  ~  ${}_{95}\text{Am}$ である。保証エネルギー分解能が121 eV (Mn-K $\alpha$ 線)であり、市販品としては最高性能であるため、近接する特性X線ピークの分離能に優れ、定量分析や未知試料における元素の同定に向いている。XFlash6|10は素子面積が10mm<sup>2</sup>と小さく、SEM側の照射電流を上げるなどして発生するX線強度を高める必要がある。SU6600は低真空に対応するため照射電流を大きめに取れるようになっており、試料が壊れない限り大きな問題にはならない。図2に、カーボンテープ上に固定したBN粒子に対して、高真空で加速電圧5 kVの電子線を入射して測定したX線スペクトル(EDS)を示す。B、

C、N、Oの各ピークが重畳せず分離されているのが分かる。

他方、XFlash5060FQは、形状や配置が通常とは異なる。検出部が板状で、反射電子検出器のようにレンズ光学系と試料の間に挿入して使用する。検出部には電子線の通路を取り囲むように15 mm<sup>2</sup>の素子4個が並べられ、それらが試料表面に接近して配置されることで最大1 str以上の立体角を達成し、非常に高感度な検出器として使用することが可能である。ただし、保証エネルギー分解能は133 eVでXFlash6|10よりやや低い。またX線に加えて反射電子線も直接受けるため、加速電圧を高くする時は素子が損傷しないよう保護フィルターをつける必要があり、フィルターの厚みに応じて低エネルギー領域のみ検出感度が落ちたりゴーストが重畳したりする。そのため、低加速電子線入射による低エネルギーX線検出、高加速電子線入射による高エネルギーX線検出というように分けて使用することになる。使用法がやや限定されるものの、一般的な検出器にない測定が可能となる。現在のところ最も頻度の高い利用法は、6 kV以下の低加速電子線入射による高速元素マッピングである。入射した電子線が低加速であれば、試料内を広がる範囲は狭く浅くなり、特性X線が発生する領域も同じように

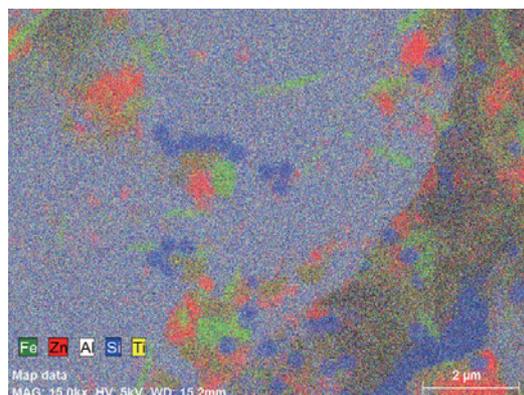


図3 SU6600 + Xflash5060により取得した酸化物微粒子分散試料の低真空SEM像(a)とEDS元素マッピング(b)。

狭く浅くなる。横方向の広がりが狭くなることでマッピングの空間分解能は上がり、縦方向に浅くなることで表面の構造や組成を強く反映することになる。元素マッピングはX線信号を元素毎に分けて積算するため、元素分布を判別するのに十分な信号量を得るまでに必要な測定時間が長くなりがちであったが、SU6600とXFlash5060FQの組み合わせでは、最高1024×768の分割に対して、数分から10分程度の積算で十分なコントラストを得ることもできる。また、仕様によれば、XFlash5060FQは、高純度窒素雰囲気30 Paまでなら低真空中で動作可能であ

るため、SU6600との組み合わせでは低真空中での高速元素マッピングも可能になる。図3に、種々の酸化物微粒子を分散させた試料に対し、30 Paの低真空中で、加速電圧5 kVの電子線を入射して取得した2次電子像と元素マッピングを示す。元素マッピングは1024×768分割、積算時間は全体で900秒とした。球状のSiO<sub>2</sub>、棒状及び球状の酸化鉄類(前者はFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>やFeOOHで、後者はFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)、微粒子の凝集体であるZnOやTiO<sub>2</sub>などが、大きなAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>粒子の上に分散していることが、元素マッピングから判別できる。また、試料の真上に検出器が配置されることで、

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>粒子の段差による影ができにくい利点もある。

観察対象の広いSEMであるSU6600に、これほどエネルギー分解能の高い検出器と高感度検出器を搭載したQUANTAXシステムの組み合わせは、現時点では国内にほとんどなく、一般に公開されている例は他に見当たらない。これから所内外の多くの方々に利用頂きたい。本装置の仕様や利用申請等は、<http://nanoims.ims.ac.jp/ims/>を参照されたい。

## 新装置紹介

## 急速溶液交換装置の紹介

生命・錯体分子科学研究領域 古谷 祐詞

イオンや低分子との結合に伴う膜タンパク質の構造変化を、全反射型赤外分光装置によって解析する手法が広く使われています。私は、これまでナトリウムイオンポンプであるV型ATPase、カリウムイオンチャネルであるKcsAなどに全反射型赤外分光法を適用してきました<sup>[1, 2]</sup>。また、広島大学の井口佳哉准教授と共同研究を行い、表面増強赤外分光法を併用することで、金薄膜表面に修飾したイオノフォアの構造解析を行いました(共同利用研究ハイライト)<sup>[3]</sup>。このように溶液中での赤外分光計測を可能とする全反射赤外分光法は、分子間や分子-イオン間の相互作用を研究するのに適した手法です。一方、ペリスタポンプやシリンジポンプなどモーターを利用する溶液交換では時間を要するため、時間分解計測について改善の余地があります。そこで、私はシリンジを圧縮空気で作動させる方式により、溶液を急速に

交換する手法の開発を行いました。今回、日本生物物理学会の欧文誌であるBIOPHYSICSに発表した論文<sup>[4]</sup>が第1回BIOPHYSICS Editors' Choice Awardに選ばれたこともあり、新装置紹介の機会を頂きました。

受賞対象論文は、膜タンパク質とイオンや低分子の結合に伴う構造変化を、ミリ秒程度の時間分解赤外分光計測で追跡することを可能とする急速溶液交換システム(図参照)の開発に関するものです。本システムは、ストップフロー法で用いられる圧縮空気作動型シリンジポンプにより、ATR結晶上の溶液を急速に置換します。基板に吸着した膜タンパク質を浸している緩衝液を、イオンや低分子を含む緩衝液に急速に置換することで、膜タンパク質との結合反応を開始させることが可能になります。実際に、全反射赤外分光計測用のATR結晶上に膜タンパク質を吸着させることで、膜タンパク質がイオ



第1回BIOPHYSICS Editors' Choice Awardの賞状と盾

ンや低分子を結合した際に起こす構造変化をミリ秒程度の時間分解赤外分光計測で追跡することが可能であることを示しました。論文の詳細については、生物物理学会誌の総説にも記載しております<sup>[5]</sup>。

急速緩衝液置換システムの開発では、私と当時助教であった木村哲就博士とで、システム全体の動作方式や時間分解赤外分光計測に必要な制御部分の基本設計を行い、(株)ユニソク

の岡本基土さんが実際に動作する装置の開発を行いました。また、ATR結晶上のチャンバーについては、装置開発室の青山正樹さんと高田紀子さんに作製頂きました。スムーズな緩衝液の交換を実現するには、チャンバーの形状が重要であることが分かり、10種類程度の流路形状を試作頂きました（詳細については装置開発室のAnnual Report 2014に記載）。この場を借りて御礼申し上げます。

また、最近、分子研の藤准教授のグループにて、チャープパルス上方変換を用いた全反射赤外分光計測にも本手法を適用して頂き（図参照）、アセトンと水の交換過程をミリ秒の時間分解能で追跡した結果をOpt. Express誌に報告しました<sup>[6]</sup>。

現在、本手法のさらなる発展を目指して、研究を継続しています。また、本手法を用いた共同研究の提案を随時募集しておりますので、ご興味のある方は古谷までお問い合わせください。

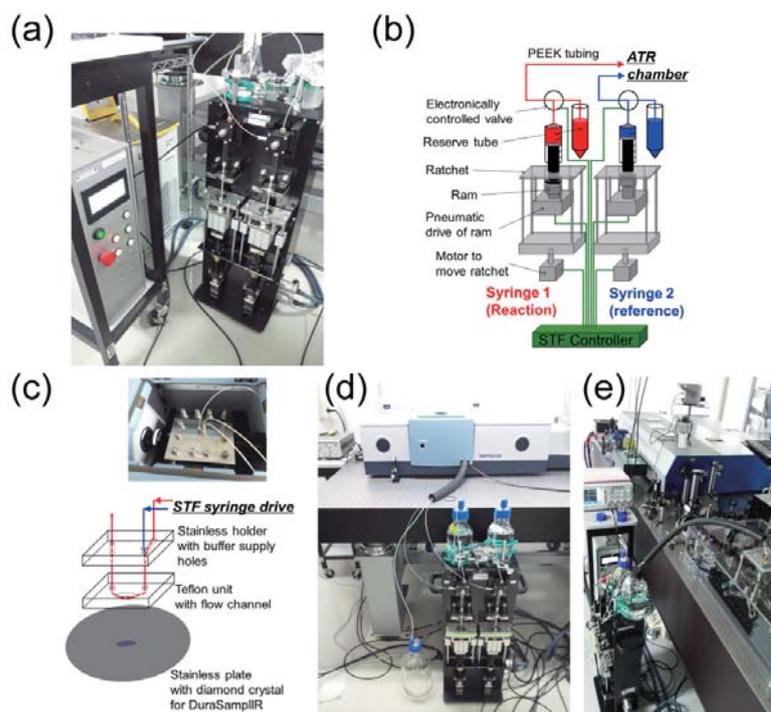


図 新規装置の図  
(a) 急速溶液交換装置 (b) 装置の模式図 (c) ATR部分 (d) FTIRとの接続  
(e) 藤グループの装置との接続((b), (c)模式図については論文4より転載)

## 参考文献

- [1] Y. Furutani, T. Murata, and H. Kandori, "Sodium or Lithium Ion-Binding-Induced Structural Changes in the K-ring of V-ATPase from *Enterococcus hirae* Revealed by ATR-FTIR Spectroscopy", *J. Am. Chem. Soc.* 133 (9), 2860-3, 2011.
- [2] Y. Furutani, H. Shimizu, Y. Asai, T. Fukuda, S. Oiki and H. Kandori, "ATR-FTIR Spectroscopy Revealed the Different Vibrational Modes of the Selectivity Filter Interacting with  $K^+$  and  $Na^+$  in the Open and Collapsed Conformations of the KcsA Potassium Channel", *J. Phys. Chem. Lett.* 3, 3806-10, 2012.
- [3] Y. Inokuchi, T. Mizuuchi, T. Ebata, T. Ikeda, T. Haino, T. Kimura, H. Guo, Y. Furutani, "Formation of Host-Guest Complexes on Gold Surface Investigated by Surface-Enhanced IR Absorption Spectroscopy", *Chem. Phys. Lett.* 592, 90-5, 2014.
- [4] Y. Furutani, T. Kimura, and K. Okamoto, "Development of a rapid Buffer-exchange system for time-resolved ATR-FTIR spectroscopy with the step-scan mode", *BIOPHYSICS* 9, 123-9, 2013.
- [5] 古谷祐詞、木村哲就、岡本基土「急速緩衝液交換法による時間分解全反射赤外分光法の開発」, *生物物理* 54 (5), 272-5, 2014
- [6] H. Shirai, C. Duchesne, Y. Furutani, and T. Fuji, "Attenuated total reflectance spectroscopy with chirped-pulse upconversion", *Opt. Express* 22 (24), 29611-16, 2014