

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014年1月30日(30.01.2014)



(10) 国際公開番号  
WO 2014/017008 A1

- (51) 国際特許分類:  
H01J 37/20 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/003701
- (22) 国際出願日: 2013年6月12日(12.06.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2012-162925 2012年7月23日(23.07.2012) JP
- (71) 出願人: 独立行政法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo (JP). 株式会社ライフセム(LIFESEM INC.) [JP/JP]; 〒1660001 東京都杉並区阿佐谷北2-10-6 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 小椋 俊彦(OGURA, Toshihiko); 〒3058568 茨城県つくば市梅園1丁目1-1 中央第2 独立行政法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内1丁目6番5号 丸の内北口ビル21階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: SAMPLE HOLDER AND METHOD FOR OBSERVING ELECTRON MICROSCOPIC IMAGE

(54) 発明の名称: 試料ホルダおよび電子顕微鏡像の観察方法

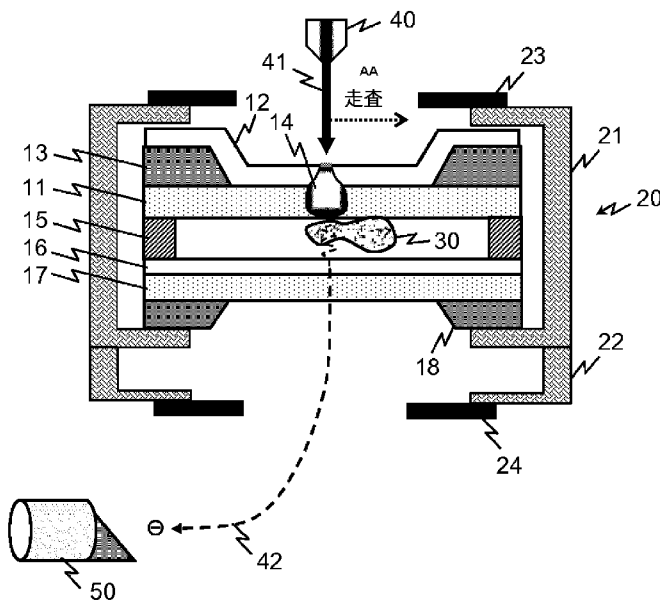


FIG. 1:  
AA Scan

(57) Abstract: A laminated body configured from an insulating thin film (11) and a secondary electron emission preventing thin film (12) is provided inside of an upper main body (21) of a sample holder (20), and an electron beam (41) emitted from an electron gun (40) is inputted from the secondary electron emission preventing thin film side. The lower surface of the insulating thin film (11) is a sample attaching surface, and a sample (30) to be observed is held by means of suction and the like. The secondary electron emission preventing thin film (12) is formed of a material, which has a small secondary electron emission coefficient ( $\delta$ ), and which is preferably a non-insulating material. Namely, since the secondary electron emission preventing thin film (12) has conductive characteristics, while having high electrical resistance, the charging level of a portion irradiated with the electron beam becomes low. As a result, effects of charging due to electron beam irradiation are reduced, secondary electrons generated in the surface layer of the secondary electron emission preventing thin film (12) are not easily emitted to the outside of the film, and image contrast deterioration due to the secondary electron discharge is suppressed.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2014/017008 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

---

試料ホルダ (20) の上部本体 (21) の内部には、絶縁性薄膜 (11) と 2 次電子放射防止薄膜 (12) の積層体が設けられており、電子銃 (40) から射出された電子線 (41) は 2 次電子放射防止薄膜側から入射する。絶縁性薄膜 (11) の下面は試料付着面であり、観察対象となる試料 (30) が吸着等により保持されている。2 次電子放射防止薄膜 (12) は 2 次電子放出係数  $\delta$  が小さい材質から成り、好ましくは非絶縁性である。つまり、2 次電子放射防止薄膜 (12) は電気的抵抗が高いながらも導電性を有しているため、電子線照射部位の帯電レベルは低くなる。その結果、電子線照射による帯電効果は低減し、2 次電子放射防止薄膜 (12) の表層で発生した 2 次電子が膜外へと放射され難くなり、2 次電子放出に起因する画像のコントラスト低下が抑制される。

## 明 細 書

**発明の名称**： 試料ホルダおよび電子顕微鏡像の観察方法

### 技術分野

[0001] 本発明は電子顕微鏡像の観察技術に関し、特に、照射電子線によるダメージを受けやすい有機材料系試料や生物試料を、コントラストの高い鮮明な電子顕微鏡像画像として観察するに好適な技術に関する。

### 背景技術

[0002] 走査型電子顕微鏡（SEM）は、無機材料系試料や有機材料系試料の形態観察はもとより生物試料の観察にも広く用いられ、バクテリアやウィルスといった肉眼では観察不能な微生物の観察に好適な機器である。

[0003] しかし、このような生物試料は電子線の照射により損傷を受けやすいことに加え、高いコントラストの画像を得にくいという問題がある。このため、生物試料をSEM観察する場合、一般には、観察対象である試料をホルムアルデヒド等で固定化して金やプラチナあるいはカーボン等を表面にコーティングしたり重金属等で染色するなどの手法により前処理を行い、これにより、試料への電子線ダメージを軽減するとともにコントラストを高めるという工夫がなされる。

[0004] また、最近では、生物試料に対して上述のコーティングや染色を施すことなく高コントラストの画像を得る手法も開発されている（特許文献1および非特許文献1を参照）。この方法では、薄い試料支持膜（カーボン膜）の下面（裏面）に観察対象試料を付着させ、試料支持膜の上面（表面）から比較的低い電圧で加速された電子線を照射する。試料支持膜に入射した電子線は支持膜内部で拡散しながら広がり、支持膜の下面付近に到達した電子が2次電子を放出する。この2次電子は支持膜下面に付着している観察対象試料に吸収され、これによりコントラストが形成され、鮮明なSEM画像を得ることができる。

[0005] このような2次電子のエネルギーは10eV程度と極めて低く、生物試料に

吸収されても殆どダメージを与えることがないだけでなく、この電子線の吸収の度合いがそのままコントラストとして得られるために極めてクリアで高コントラストなSEM画像を得ることができる。このような観察条件は、「間接2次電子コントラスト条件」と呼ばれる。

[0006] また、この方法をさらに進展させ、絶縁性薄膜の下部に導電性薄膜を形成し、電子線入射に起因する帯電効果を利用して、分解能やコントラストを更に向上させる方法も開発されている（特許文献2および非特許文献2を参照）。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0007] 特許文献1：特開2010-097844号公報  
特許文献2：特願2011-286018の明細書

#### 非特許文献

[0008] 非特許文献1：T.Ogura, 「A high contrast method of unstained biological samples under a thin carbon film by scanning electron microscopy」, Biochem.Biophys. Res. Commun. Vol.377, p79-84 (2008)  
非特許文献2：T.Ogura, 「Direct observation of the inner structure of unstained atmospheric cells by low-energy electrons」, Meas. Sci. Technol. Vol.23, 085402(8pp)(2012)

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0009] 上述したように、従来は、電子線照射により損傷を受けやすく且つ高いコントラストの画像を得にくい生物試料をSEM観察する場合、表面コーティングや染色の処理を行っていた。しかし、このような処理には熟練が必要であるのみならず、染色に用いられる薬剤は主として酢酸ウラン等の有害物質であるため環境面からも好ましくない。

[0010] また、間接2次電子コントラスト条件で観察されたSEM画像は極めてコ

ントラストが高いものの、分解能は比較的低いという問題がある。加えて、さらに、通常条件で加速された低エネルギーの2次電子では、観察試料の内部を透過することができず、内部構造観察には適さない。

[0011] 一方、上述した絶縁性薄膜の下部に導電性薄膜を形成して電子線入射に起因する帯電効果を利用する方法において生物試料を導電性薄膜下部に付着させて観察を行うと、2次電子の散乱に起因して分解能が低下してしまう。

[0012] これは、導電性薄膜がグランド電位となるため、電子線照射による帯電効果により絶縁性薄膜から導電性薄膜へと2次電子が透過してしまい、生物試料が保持されている位置には電位勾配が形成されないためである。この現象は、生物試料を試料ホルダ内に大気圧下で密閉して観察する場合にはより顕著となる。さらに、絶縁性薄膜上部では、帯電による2次電子が多量に発生し、これも画像のコントラストを低下させる原因となる。

[0013] 本発明はこのような問題に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、走査型電子顕微鏡による観察を行うに際し、生物試料を染色等することなく、極めて簡便に且つ大気圧下で、高分解能・高コントラストの観察を可能とし、電子線によるダメージも大幅に低減し得る試料ホルダならびにこれを用いた電子顕微鏡像の観察方法を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0014] 上述の課題を解決するために、本発明に係る試料ホルダは、電子顕微鏡像の観察に用いられる試料ホルダであって、2次電子放出係数 $\delta$ が小さい2次電子放射防止薄膜側を電子線入射面とし絶縁性薄膜側を試料付着面とする2次電子放射防止薄膜と絶縁性薄膜の積層体と、前記絶縁性薄膜に対向し且つ離間して設けられた導電性薄膜とを備え、前記導電性薄膜の電位は、電子顕微鏡のグランド電位と同電位若しくはプラス電位に制御可能である、ことを特徴とする。

[0015] 好ましくは、前記2次電子放射防止薄膜は非絶縁性である。

[0016] 例えば、前記2次電子放射防止薄膜は、チタン、カーボン、アルミニウム、シリコンの何れかを主成分とする。

- [0017] また、例えば、前記2次電子放射防止薄膜の厚みが30nm以下である。
- [0018] 好ましくは、前記絶縁性薄膜は、窒化シリコン、酸化シリコン、カプトン、ポリイミドの何れかを主成分とする。
- [0019] 例えば、前記絶縁性薄膜の厚みが200nm以下である。
- [0020] 好ましくは、前記導電性薄膜は、ニッケル、チタン、アルミニウム、金、銀、銅、コバルト、モリブデン、タンタル、タングステン、オスミウムの何れかを主成分とする。
- [0021] 例えば、前記導電性薄膜の厚みが30nm以下である。
- [0022] 本発明に係る試料ホルダは、前記2次電子放射防止薄膜の電子線入射側の表面に金属粒子を付着させている態様としてもよい。
- [0023] この場合、好ましくは、前記金属粒子の直径は10 $\mu$ m以下である。
- [0024] また、本発明に係る試料ホルダは、前記2次電子放射防止薄膜の電子線入射面若しくは前記絶縁性薄膜の試料付着面に金属パターンが設けられている態様としてもよい。
- [0025] この場合、好ましくは、前記金属パターンの線幅は10 $\mu$ m以下である。
- [0026] さらに、本発明に係る試料ホルダは、前記絶縁性薄膜の試料付着面が親水化処理されている態様としてもよく、前記絶縁性薄膜の試料付着面に試料吸着材を備えている態様とすることもできる。
- [0027] この場合、好ましくは、前記絶縁性薄膜の試料付着面の端部には吸水材が設けられている。
- [0028] 本発明に係る試料ホルダは、例えば、前記絶縁性薄膜と前記導電性薄膜とは高さが200 $\mu$ m以下のスペーサにより離間されている。
- [0029] また、本発明に係る試料ホルダは、前記2次電子放射防止薄膜の電子線入射面側に、電子線入射照射領域の直径に略等しい直径の開口部を有する視野絞りを備えている態様としてもよい。
- [0030] 本発明に係る電子顕微鏡像の観察方法は、本発明に係る試料ホルダを用いた電子顕微鏡像の観察方法であって、電子線の加速電圧を、入射電子の50%以上が前記積層体内で吸収若しくは遮蔽される値に設定し、該電子線を前

記電子線入射面上で走査する。

[0031] また、本発明に係る電子顕微鏡像の観察方法は、前記絶縁性薄膜の試料付着面に液体を滴下し、該液体で観察試料を保持する態様としてもよい。

### 発明の効果

[0032] 本発明に係る試料ホルダに設けられる2次電子放射防止薄膜は、電気的抵抗は高いながらも導電性を有している。このため、電子線照射部位の帯電レベルは低く、上述の電子線照射による帯電効果が低減され、2次電子放射防止薄膜の表層で発生した2次電子が膜外へと放射されて画像のコントラストを低下させることがない。

[0033] 一方、絶縁性薄膜は、入射電子により帯電して内部がマイナスの電位となる。生物試料等の観察試料はこの絶縁性薄膜の下面に保持されており、導電性薄膜が対向して設けられている。この導電性薄膜を電子顕微鏡のグランド電位と同電位若しくはプラス電位に制御した場合には、絶縁性薄膜と導電性薄膜との間に電位勾配が生じ、生物試料の内部を透過した2次電子がこの電位勾配に沿って移動することとなるため、試料内部で散乱され難くなり分解能が向上する。

[0034] また、入射電子線の多くは、2次電子放射防止薄膜と絶縁性薄膜の積層体の内部で散乱乃至は吸収され、観察試料への電子線ダメージが大幅に低減する。

[0035] さらに、絶縁性薄膜の試料付着面を親水化処理し、この絶縁性薄膜の試料付着面に、試料吸着材としての液体（水溶液等）を滴下して観察試料を保持する態様とすれば、細胞や細菌、ウイルス等の生物試料を生きた状態で観察することも可能となる。なお、試料吸着材は液体（水溶液）に限定されず、その材質等は観察対象の試料に応じて適宜変更すればよい。

### 図面の簡単な説明

[0036] [図1]本発明に係る試料ホルダの構成例の概要を説明するためのブロック図である。

[図2A]絶縁性薄膜11と2次電子放出係数 $\delta$ が小さい2次電子放射防止薄膜

1 2 の積層体に電子線が入射した際の 2 次電子の放射（放出）の様子を示す図である。

[図2B]絶縁性薄膜 1 1 と 2 次電子放出係数  $\delta$  が大きい薄膜 1 2 H の積層体に電子線が入射した際の 2 次電子の放射（放出）の様子を示す図である。

[図2C]絶縁性薄膜 1 1 に電子線が入射した際の 2 次電子の放射（放出）の様子を示す図である。

[図3A]薄膜として 2 次電子放出係数  $\delta$  が小さな T i を形成して撮影したバクテリアの S E M 画像である。

[図3B]薄膜として 2 次電子放出係数  $\delta$  が大きな C r を形成して撮影したバクテリアの S E M 画像である。

[図3C]薄膜を形成することなく絶縁性薄膜に電子線を直接入射させて撮影したバクテリアの S E M 画像である。

[図4A]絶縁性薄膜に対向し且つ離間して設けられる導電性薄膜の効果を説明するための図で、電子線入射により発生した 2 次電子の状態を示す図である。

[図4B]絶縁性薄膜に対向し且つ離間して設けられる導電性薄膜の効果を説明するための図で、2 次電子が観察試料を透過して導電性薄膜の下部から出射する状態を示す図である。

[図5A]導電性薄膜の有無が画像のコントラストに及ぼす影響について説明するための S E M 画像で、導電性薄膜として N i が形成されている場合の S E M 画像である。

[図5B]導電性薄膜の有無が画像のコントラストに及ぼす影響について説明するための S E M 画像で、導電性薄膜が形成されていない場合の S E M 画像である。

[図6]絶縁性薄膜の試料付着面に親水化処理を施し、この試料付着面に液体（水溶液）を滴下して形成した液体層で観察試料としての生物試料を大気圧下で保持した状態で S E M 像を得る態様を説明する図である。

[図7A] 2 次電子放射防止薄膜に、フォーカス調整等のための金属粒子を設け

た態様を説明するための図である。

[図7B] 2次電子放射防止薄膜に、フォーカス調整等のための金属パターンを設けた態様を説明するための図である。

### 発明を実施するための形態

[0037] 以下に、図面を参照して、本発明の試料ホルダならびにこれを用いた電子顕微鏡像の観察方法について説明する。

[0038] 図1は、本発明に係る試料ホルダの構成例の概要を説明するためのブロック図である。この図に示した例では、試料ホルダ20は、上部本体21と下部本体22とを備えている。上部本体21の内部には、絶縁性薄膜11と2次電子放射防止薄膜12の積層体が設けられており、電子銃40から射出された電子線41は2次電子放射防止薄膜側から入射する。絶縁性薄膜11の下面は試料付着面であり、観察対象となる試料30が吸着等により保持されている。なお、符号13および18で示したものは、試料ホルダ20の機械的な強度を担保等するためのフレームである。

[0039] 2次電子放射防止薄膜12は2次電子放出係数 $\delta$ が小さい材質から成り、好ましくは非絶縁性である。つまり、2次電子放射防止薄膜12は電氣的抵抗が高いながらも導電性を有しているため、電子線照射部位の帯電レベルは低くなる。その結果、電子線照射による帯電効果は低減し、2次電子放射防止薄膜12の表層で発生した2次電子が膜外へと放射され難くなり、2次電子放出に起因する画像のコントラスト低下が抑制される。

[0040] このような2次電子放射防止薄膜12の材質としては、チタン、カーボン、アルミニウム、シリコンの何れかを主成分とするものを例示することができる。また、2次電子放射防止薄膜12の厚みは、例えば、30nm以下とする。

[0041] 電子線の加速電圧は、好適には、入射電子の50%以上が絶縁性薄膜11と2次電子放射防止薄膜12の積層体の内部で吸収若しくは遮蔽される値に設定され、この電子線を電子線入射面上で走査する。そして、試料30を透過してきた2次電子42を、2次電子検出器50により検知して得られた強

度プロファイルにより2次元的なSEM画像を得る。

- [0042] 入射した電子線41は絶縁性薄膜11の内部で拡散しながら広がり（拡散領域14）、2次電子を生成しながら絶縁性薄膜11の下面（試料付着面）に到達する。電子線41が入射すると、絶縁性薄膜11の絶縁性のために、絶縁性薄膜11の電位は電子注入量に応じた負の電位となる。
- [0043] 絶縁性薄膜11に対向して、スペーサ15を介して、耐圧性を有する導電性薄膜16が離間して設けられており、当該離間内部は絶縁性薄膜11と導電性薄膜16により密閉され、内圧を大気圧に保持することも可能である。スペーサ15の高さ、すなわち、絶縁性薄膜11と導電性薄膜16との間隔は、例えば、200 $\mu$ m以下とする。
- [0044] 絶縁性薄膜11の材質としては、窒化シリコン、酸化シリコン、カプトン、ポリイミドの何れかを主成分とするものを例示することができ、絶縁性薄膜11の厚みは、例えば、200nm以下とする。
- [0045] また、導電性薄膜16の材質としては、ニッケル、チタン、アルミニウム、金、銀、銅、コバルト、モリブデン、タンタル、タングステン、オスミウムの何れかを主成分とするものを例示することができ、導電性薄膜16の厚みは、例えば、30nm以下であるとする。
- [0046] なお、図1に示した態様では、導電性薄膜16の耐圧性を担保するために、下面側に耐圧薄膜17を設けている。
- [0047] 導電性薄膜16の電位は、電子顕微鏡のグランド電位と同電位若しくはプラス電位に制御可能とされる。その結果、帯電により負電位となっている絶縁性薄膜11との間に急峻な電位勾配が形成され、観察試料30の内部を透過した2次電子がこの電位勾配に沿って移動することとなり、試料内部で散乱され難くなり分解能が向上する。
- [0048] なお、導電性薄膜16の電位制御は、例えば、導電性薄膜16に電位制御のための電極等を設け、試料ホルダ20に設けられた端子等からの外部から電圧を印加するなどして行う。
- [0049] また、図1に示したように、試料ホルダ20の上部2次電子放射防止薄膜

の電子線入射面側)に、電子線入射照射領域の直径に略等しい直径の開口部を有する視野絞り23を設けたり、試料ホルダ20の下部(電子線出射面側)に視野絞り24を設けたりしてもよい。

[0050] 視野絞り23は、電子線入射部位から上方へと放出される2次電子を試料ホルダ20外へと漏れ出すことを防止することに寄与する。このような2次電子は試料30の情報を含んでいないため、これが検知されてしまうと画質を落としてしまう。また、視野絞り24は、試料ホルダ20の下部から出射され2次電子検出器50によって検知される2次電子の視野角を限定するためのもので、観察画像の分解能向上に寄与する。

[0051] 図2A~図2Cは電子線が入射した際の2次電子の放射(放出)の様子を模式的に示す図で、図2Aは絶縁性薄膜11と2次電子放出係数 $\delta$ が小さい2次電子放射防止薄膜12の積層体に電子線が入射した際の2次電子の放射(放出)の様子、図2Bは絶縁性薄膜11と2次電子放出係数 $\delta$ が大きい薄膜12Hの積層体に電子線が入射した際の2次電子の放射(放出)の様子、そして、図2Cは絶縁性薄膜11に電子線が入射した際の2次電子の放射(放出)の様子を示している。

[0052] 図2Aに示す態様では、絶縁性薄膜11の上に2次電子放出係数 $\delta$ が小さい2次電子放射防止薄膜12を積層させているため、電子線41が入射した際に表層から放出される2次電子43の量が低減する。また、この2次電子放射防止薄膜12は若干の導電性を有しているため、表層の帯電レベルが低く抑えられ、帯電効果による2次電子の放出も抑制される。

[0053] 一方、図2Bに示す態様では、絶縁性薄膜11の上に2次電子放出係数 $\delta$ が大きい薄膜12Hを積層させているため、電子線41が入射した際の表層からの2次電子43の放出量が多く、これが2次電子検出器に検出されて画像のコントラストを低下させる。

[0054] また、図2Cに示す態様では、絶縁性薄膜11に電子線41が直接入射するため、当該絶縁性薄膜11の内部に大量の電子が蓄積され、表面が大きな負電位となる。このため、絶縁性薄膜11の表層に生じた2次電子43はク

ーロン反発力により外部へと放出され、これが画像のコントラストを低下させる。

[0055] 図3A～図3Cは、絶縁性薄膜11の上部に設けられる薄膜の有無および当該薄膜の2次電子放出係数 $\delta$ の違いが画像のコントラストに及ぼす影響について説明するためのSEM画像で、これらの観察はバクテリアを試料として行っている。なお、観察条件は何れも、加速電圧2.6kVで倍率3万とした。

[0056] 図3Aは薄膜として2次電子放出係数 $\delta$ が小さいTi（2次電子放射防止薄膜）を厚み5nmで形成して得たSEM画像であり、図3Bは薄膜として2次電子放出係数 $\delta$ が大きなCrを形成して得たSEM画像であり、図3Cは薄膜を形成することなく絶縁性薄膜に電子線を直接入射させたSEM画像である。

[0057] 薄膜として2次電子放出係数 $\delta$ が小さいTiが形成されている場合（図3A）、電子線が入射した際に表層から放出される2次電子の量が低減するとともに表層の帯電レベルも低く抑えられ、高いコントラストの画像が得られ、バクテリアの内部や鞭毛の様子を鮮明に観察することができる。

[0058] これに対して、Tiよりも2次電子放出係数が大きなCrの薄膜（厚み5nm）が形成されている場合（図3B）、2次電子放出量が多いために全体的に白みがかかった画像となりコントラストが低下する。その結果、バクテリアの内部や鞭毛の様子を観察し難くなる。

[0059] また、このような薄膜を形成することなく絶縁性薄膜に電子線を直接入射させた場合（図3C）、帯電レベルが部位ごとに異なる結果としての帯電ムラが生じ、試料の中央部に本来の構造には無いはずの「白抜け」が観察されてしまう。

[0060] 図4Aおよび図4Bは、絶縁性薄膜11に対向し且つ離間して設けられる導電性薄膜16の効果を説明するための図で、図4Aは電子線入射により発生した2次電子の状態を、図4Bは上記2次電子が観察試料30を透過して導電性薄膜16の下部から出射する状態を、それぞれ示している。なお、こ

の図に示した例では、スペーサ15を介して設けられた絶縁性薄膜11と導電性薄膜16の離間内部の圧力は大気圧とされている。

[0061] 2次電子放出係数 $\delta$ が小さいTi等の2次電子放射防止薄膜12は抵抗 $R_s$ を介してグランド電位とされ、導電性薄膜16もまたグランド電位とされている。

[0062] 電子線41が入射すると、2次電子放射防止薄膜12の内部で発生した2次電子の多くは絶縁性薄膜11へと流れ込み、絶縁性薄膜11は帯電して負電位となる。そのため、グランド電位にある導電性薄膜16との間に急峻な電位勾配が形成される(図4A)。そして、絶縁性薄膜11の下面から射出された2次電子はこの電位勾配に沿って観察試料30へと入射・移動し、一部は試料内部で吸収され、残りの2次電子が試料30を透過して導電性薄膜16の下面から出射する(図4B)。出射した2次電子42は2次電子検出器により検出され画像を形成する。上記電位勾配は、観察試料30が生物試料である場合にも形成されるから、生物試料の内部の構造等を大気圧下で、しかも高いコントラストと分解能の下で観察することができる。

[0063] なお、この図に示した例では、導電性薄膜16の電位はグランド電位(0V)とされているが、プラス電位(正電位)としてもよい。

[0064] 図5Aおよび図5Bは、導電性薄膜16の有無が画像のコントラストに及ぼす影響について説明するためのSEM画像で、これらの観察もバクテリアを試料として行っている。なお、観察条件は何れも、加速電圧2.6kVで倍率3万とした。

[0065] 図5Aは導電性薄膜16として厚みが5nmのNiが形成されている場合のSEM画像であり、図5Bは導電性薄膜16が形成されていない場合のSEM画像である。

[0066] 導電性薄膜16として厚みが5nmのNiが形成されている場合(図5A)、バクテリアの細胞壁や細胞内部が極めてクリアに観察され、高い分解能であることが確認できる。高い分解能の画像がコントラストも良好に得られており、バクテリアの細胞壁や内部の様子を鮮明に観察することができる。

[0067] これに対して、導電性薄膜 1 6 が形成されていない場合（図 5 B）、コントラストは顕著に低下して画像は全体的にボケたものとなり、細胞壁や内部の様子が観察し難くなる。

[0068] 図 6 は、絶縁性薄膜 1 1 の試料付着面に親水化処理を施し、この試料付着面に、試料吸着材としての液体（水溶液） 6 1 を滴下して 1 0 0 n m 以下程度の薄い液体層を形成させ、この液体層で観察試料 3 0 としての生物試料を大気圧下で保持した状態で S E M 像を得る態様を説明する図で、絶縁性薄膜 1 1 の試料付着面の端部には上記液体（水溶液）を拡散させないための吸水材 6 2 が設けられている。なお、この図では、試料吸着材が液体（水溶液）である例を示したが、その材質等は観察対象の試料に応じて適宜変更可能である。

[0069] 生物試料 3 0 は、この液体層に一部が浸る状態で保持されるため、生物試料 3 0 の生きたままでの観察が可能となる。なお、上記液体層は、透過 2 次電子の散乱を減少させ、分解能を高める効果も奏する。

[0070] 図 7 A および図 7 B は、2 次電子放射防止薄膜 1 2 に、フォーカス調整等のための金属粒子 7 1（図 7 A）や金属パターン 7 2（図 7 B）を設けた態様を説明するための図で、（a）は断面図で、（b）は上面図である。

[0071] 絶縁性薄膜 1 1 や 2 次電子放射防止薄膜 1 2 は極めて平坦であるため、フォーカスや非点調整が困難である。そのため、直径が 1 0  $\mu$  m 以下の金属粒子 7 1 や線幅が 1 0  $\mu$  m 以下の金属パターン 7 2 を適当な間隔で設けておくと、フォーカスや非点の調整が容易となる。

[0072] なお、金属パターン 7 2 は、絶縁性薄膜 1 1 の試料付着面に設けるようにしてもよい。

### 産業上の利用の可能性

[0073] 上述したように、本発明により、照射電子線によるダメージを受けやすい有機材料系試料や生物試料の電子顕微鏡像を、表面コーティングや染色の処理を行うことなく、高分解能でコントラスト高く観察することを可能とする技術が提供される。本発明は特に、バクテリアやウィルス或いはタンパク質

複合体等の生物試料の観察に有用である。

### 符号の説明

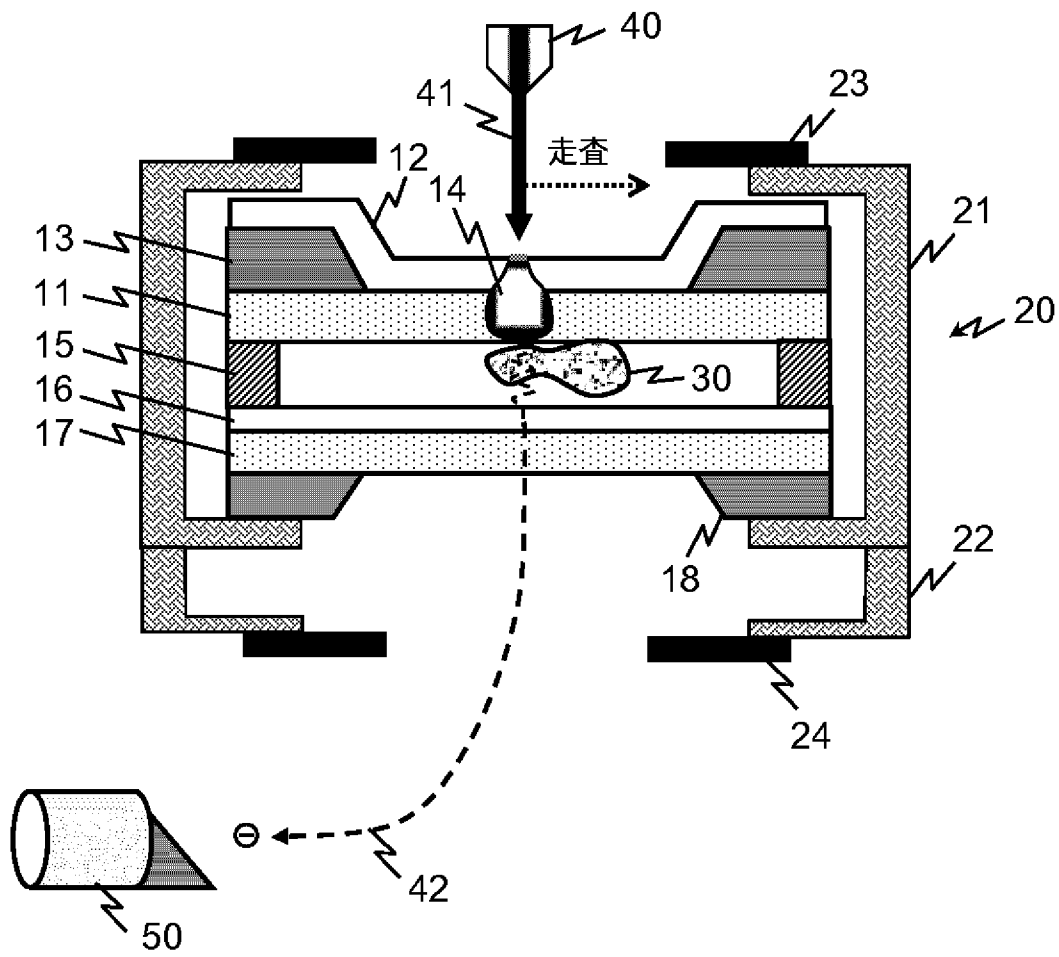
- [0074] 1 1 絶縁性薄膜  
1 2 2次電子放射防止薄膜  
1 2 H 2次電子放射係数の大きい薄膜  
1 6 導電性薄膜  
1 3、1 8 フレーム  
1 4 拡散領域  
1 5 スペーサ  
1 7 耐圧薄膜  
2 0 試料ホルダ  
2 1 上部本体  
2 2 下部本体  
2 3、2 4 視野絞り  
3 0 試料  
4 0 電子銃  
4 1 電子線  
4 2、4 3 2次電子  
5 0 2次電子検出器  
6 1 液体（水溶液）  
6 2 吸水材  
7 1 金属粒子  
7 2 金属パターン

## 請求の範囲

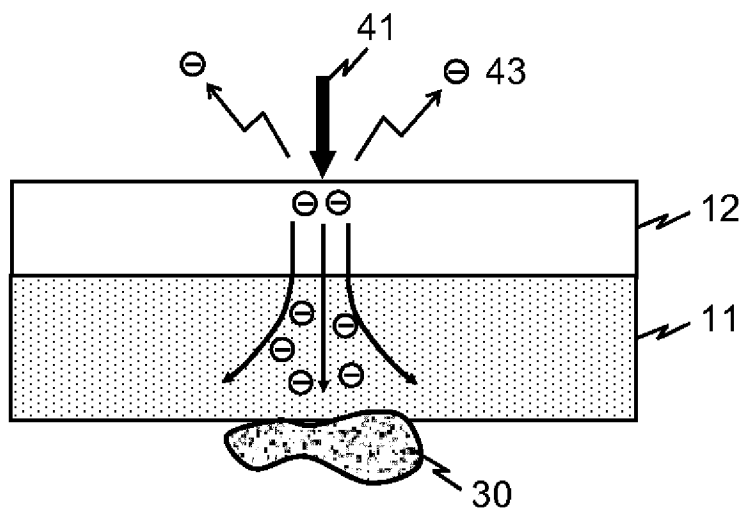
- [請求項1] 電子顕微鏡像の観察に用いられる試料ホルダであって、  
2次電子放出係数 $\delta$ が小さい2次電子放射防止薄膜側を電子線入射面とし絶縁性薄膜側を試料付着面とする2次電子放射防止薄膜と絶縁性薄膜の積層体と、前記絶縁性薄膜に対向し且つ離間して設けられた導電性薄膜とを備え、  
前記導電性薄膜の電位は、電子顕微鏡のグランド電位と同電位若しくはプラス電位に制御可能である、  
ことを特徴とする試料ホルダ。
- [請求項2] 前記2次電子放射防止薄膜は非絶縁性である、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項3] 前記2次電子放射防止薄膜は、チタン、カーボン、アルミニウム、シリコンの何れかを主成分とする、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項4] 前記2次電子放射防止薄膜の厚みが30nm以下である、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項5] 前記絶縁性薄膜は、窒化シリコン、酸化シリコン、カプトン、ポリイミドの何れかを主成分とする、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項6] 前記絶縁性薄膜の厚みが200nm以下である、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項7] 前記導電性薄膜は、ニッケル、チタン、アルミニウム、金、銀、銅、コバルト、モリブデン、タンタル、タングステン、オスミウムの何れかを主成分とする、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項8] 前記導電性薄膜の厚みが30nm以下である、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項9] 前記2次電子放射防止薄膜の電子線入射側の表面に金属粒子を付着させている、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項10] 前記金属粒子の直径は10 $\mu$ m以下である、請求項9に記載の試料ホルダ。

- [請求項11] 前記2次電子放射防止薄膜の電子線入射面若しくは前記絶縁性薄膜の試料付着面に金属パターンが設けられている、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項12] 前記金属パターンの線幅は10 $\mu$ m以下である、請求項11に記載の試料ホルダ。
- [請求項13] 前記絶縁性薄膜の試料付着面が親水化処理されている、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項14] 前記絶縁性薄膜の試料付着面に試料吸着材を備えている、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項15] 前記絶縁性薄膜の試料付着面の端部には吸水材が設けられている、請求項13に記載の試料ホルダ。
- [請求項16] 前記絶縁性薄膜と前記導電性薄膜とは高さが200 $\mu$ m以下のスペーサにより離間されている、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項17] 前記2次電子放射防止薄膜の電子線入射面側に、電子線入射照射領域の直径に略等しい直径の開口部を有する視野絞りを備えている、請求項1に記載の試料ホルダ。
- [請求項18] 請求項1乃至17の何れかに記載の試料ホルダを用いた電子顕微鏡像の観察方法であって、  
電子線の加速電圧を、入射電子の50%以上が前記積層体内で吸収若しくは遮蔽される値に設定し、該電子線を前記電子線入射面上で走査する、電子顕微鏡像の観察方法。
- [請求項19] 請求項13に記載の試料ホルダを用いた電子顕微鏡像の観察方法であって、  
前記絶縁性薄膜の試料付着面に液体を滴下し、該液体で観察試料を保持する、電子顕微鏡像の観察方法。

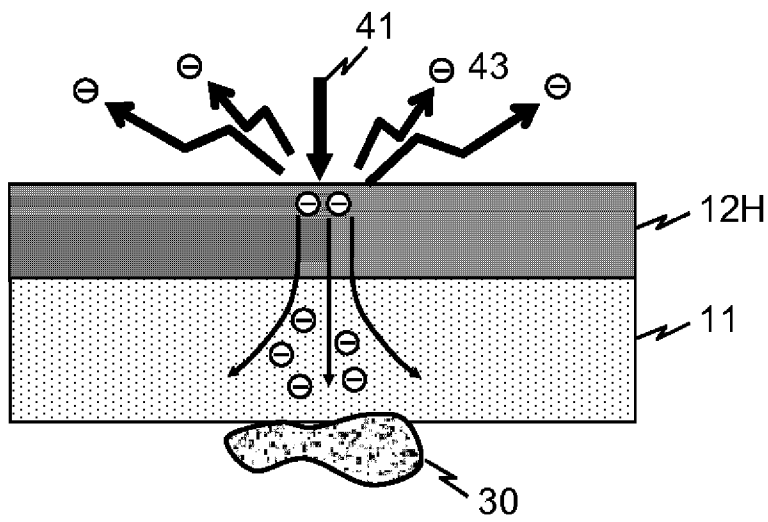
[図1]



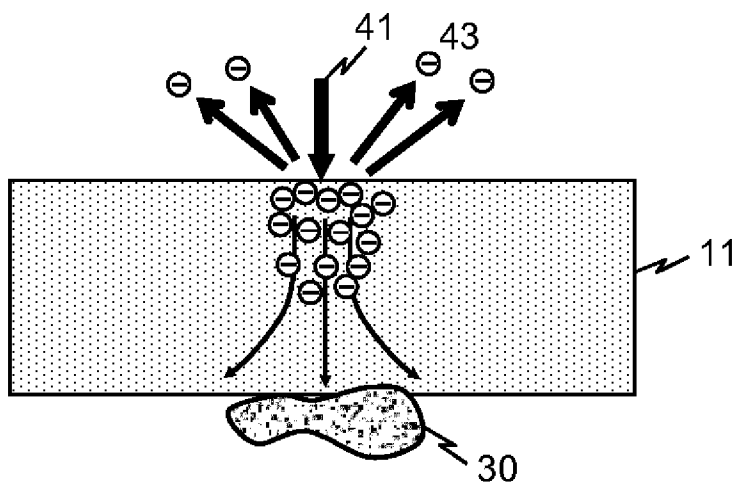
[図2A]



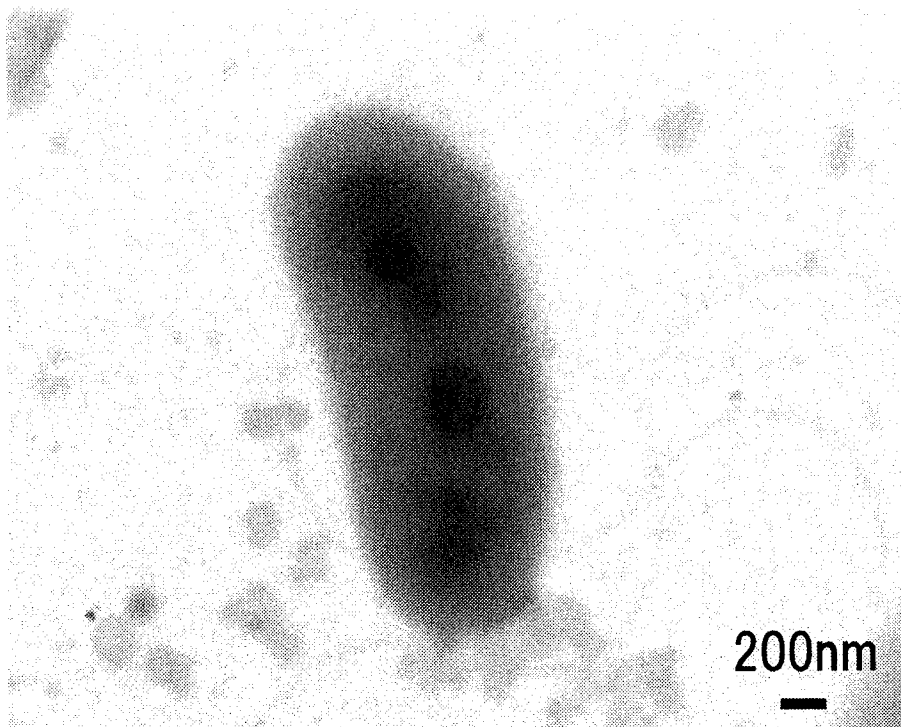
[図2B]



[図2C]

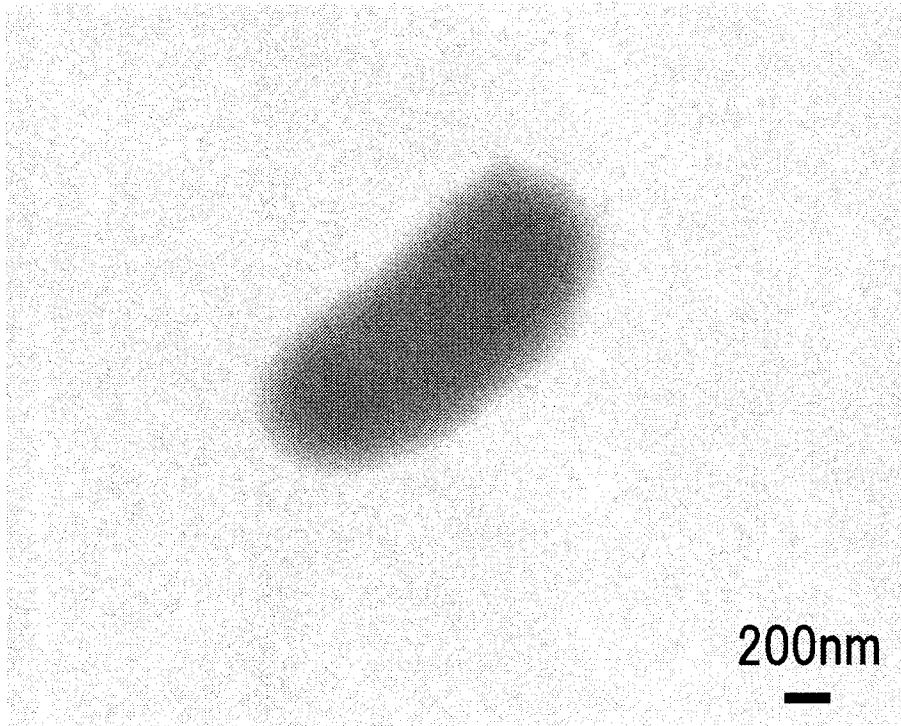


[図3A]



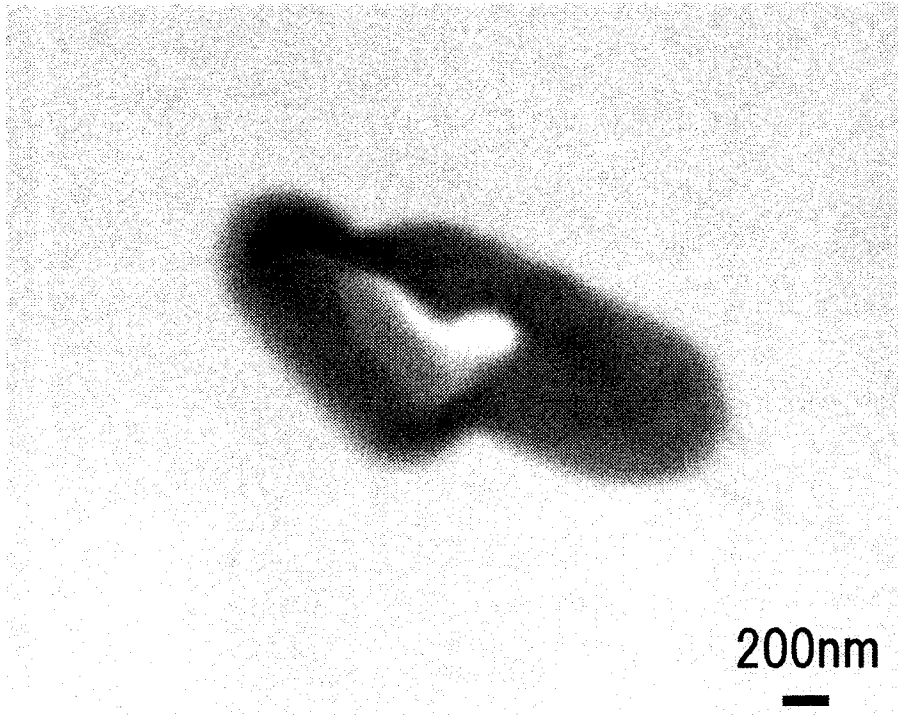
Ti薄膜

[図3B]



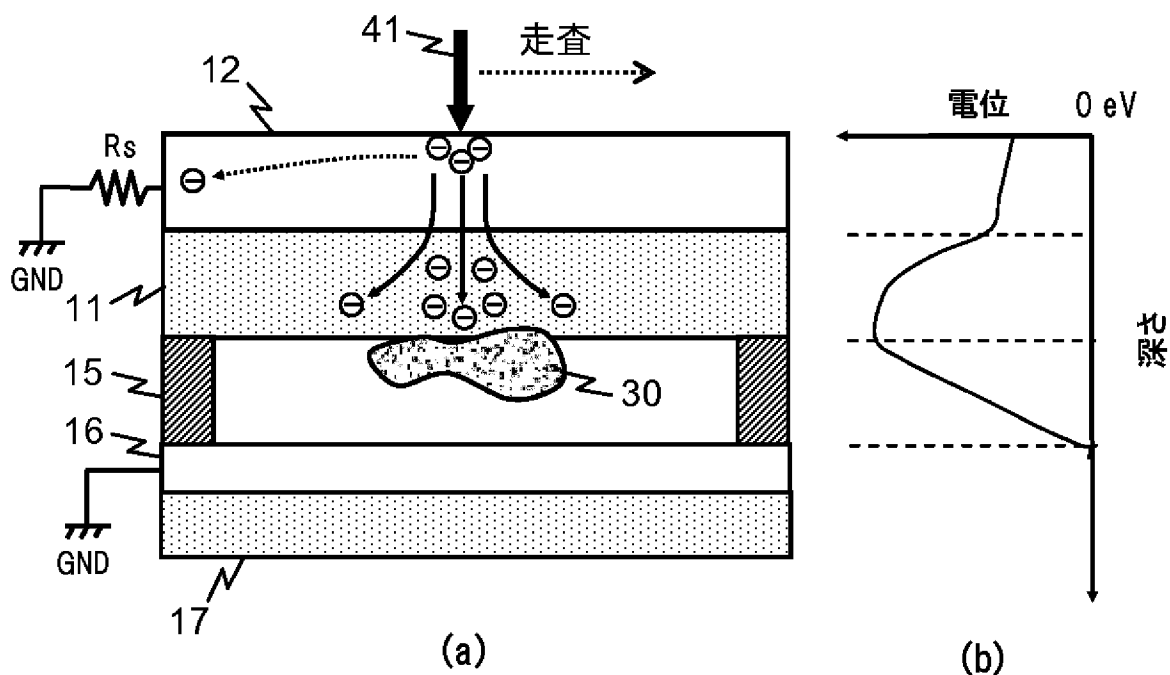
Cr薄膜

[図3C]

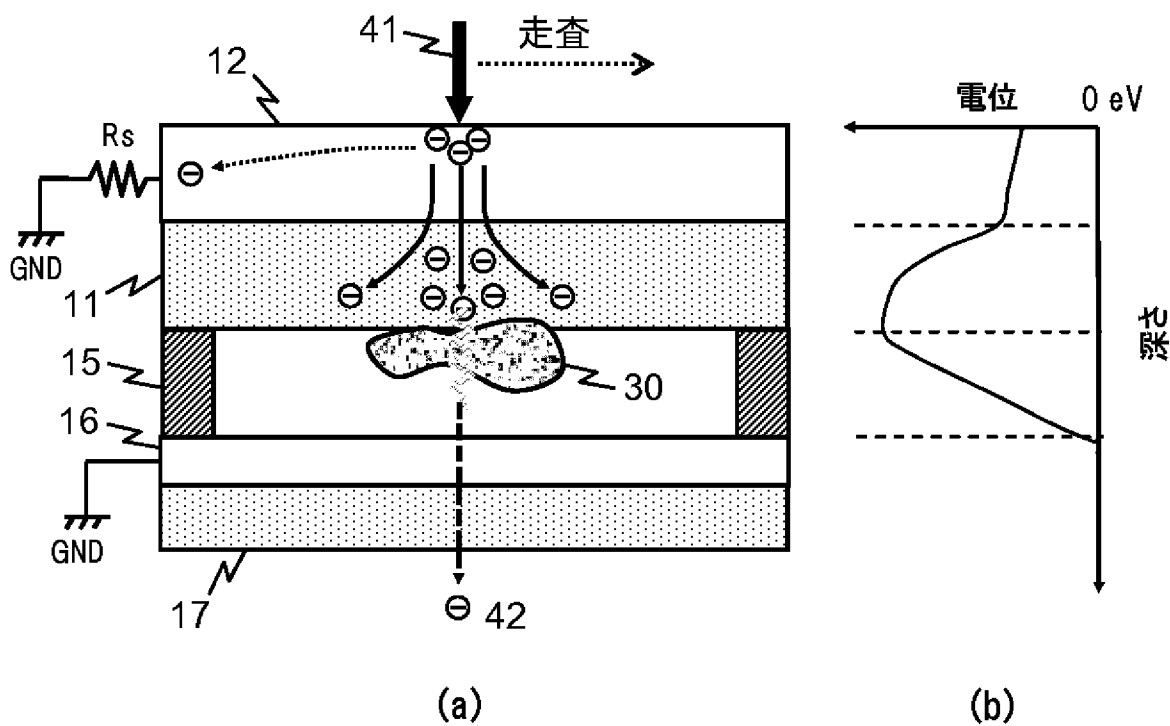


絶縁膜のみ

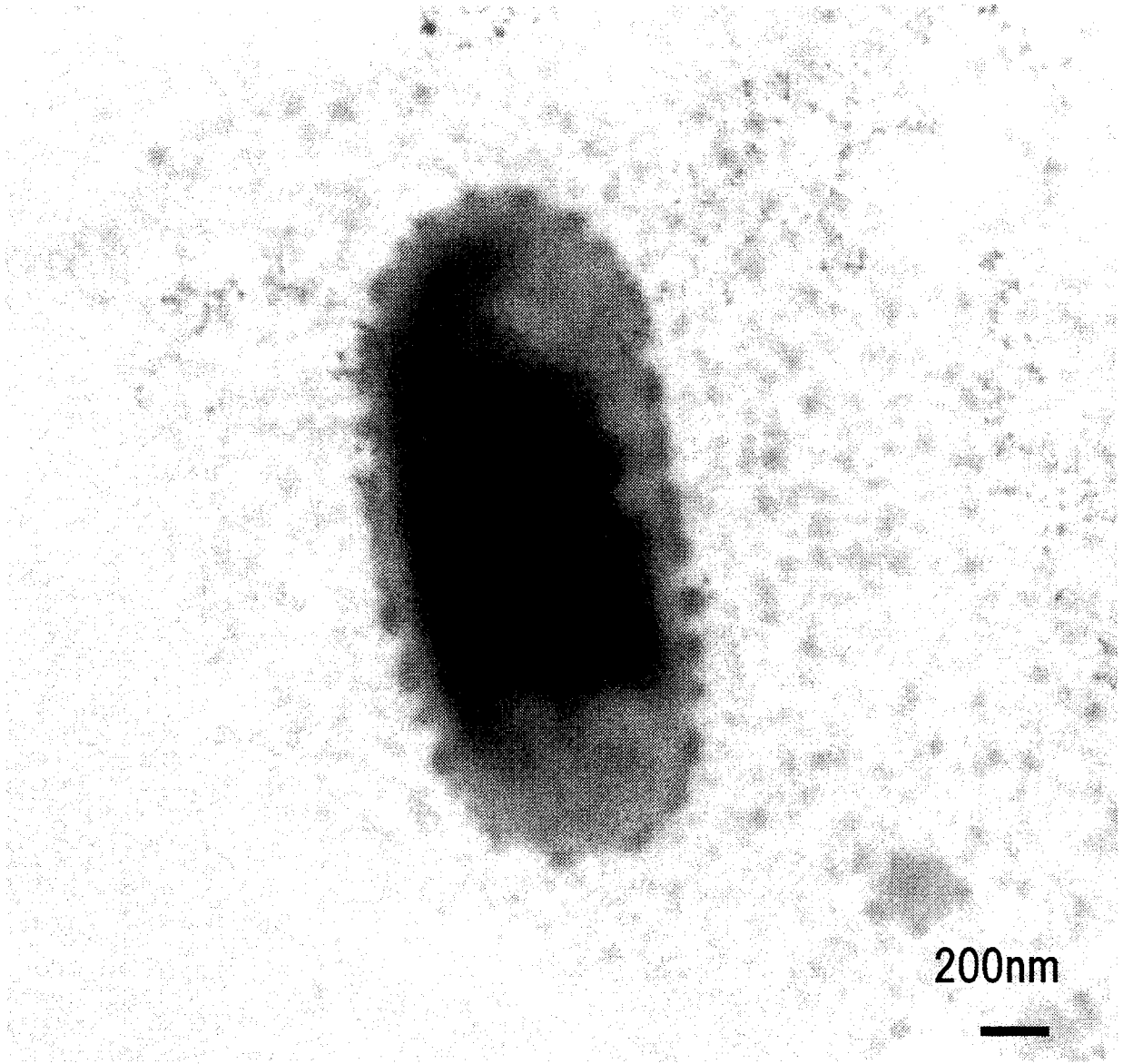
[図4A]



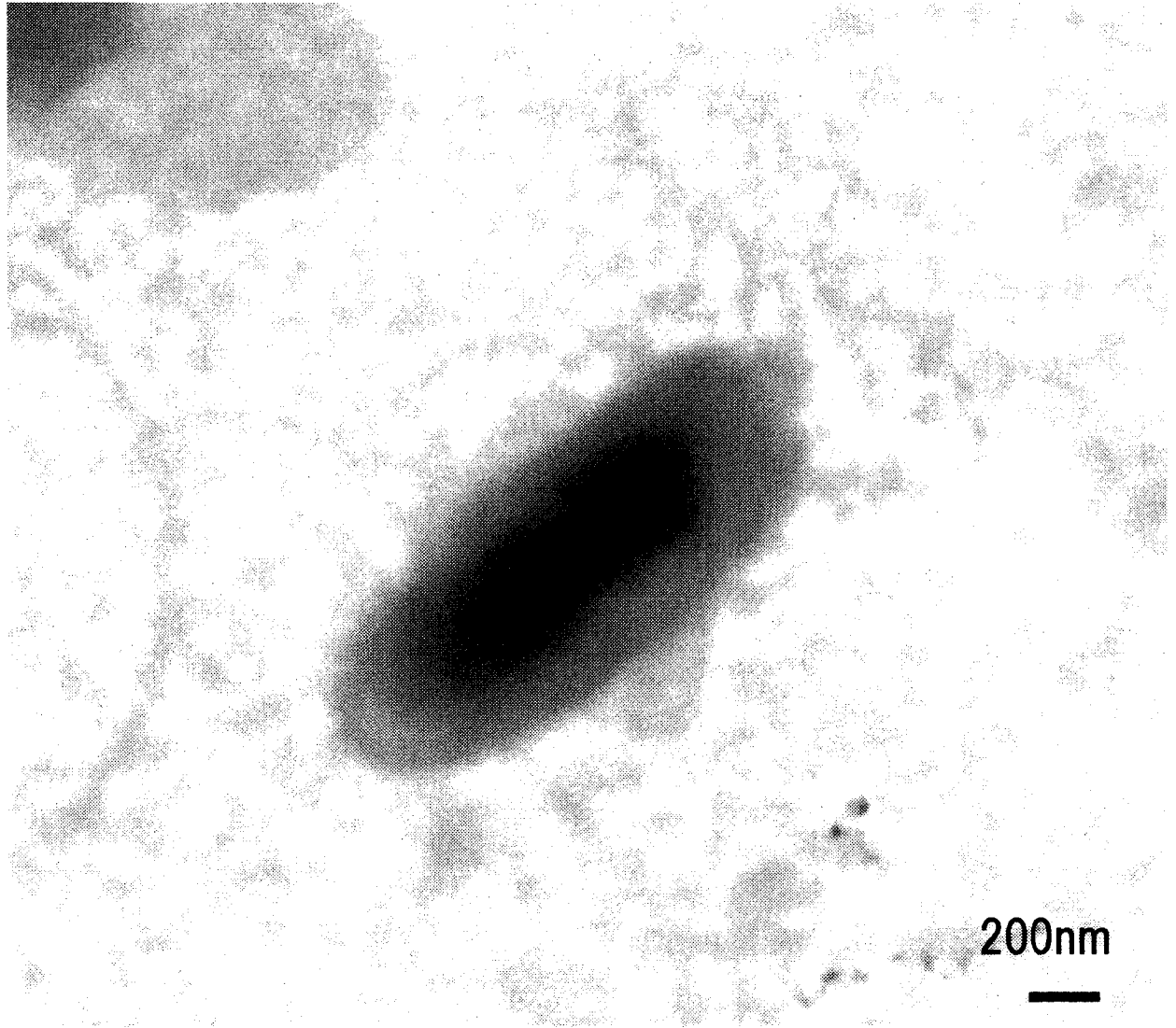
[図4B]



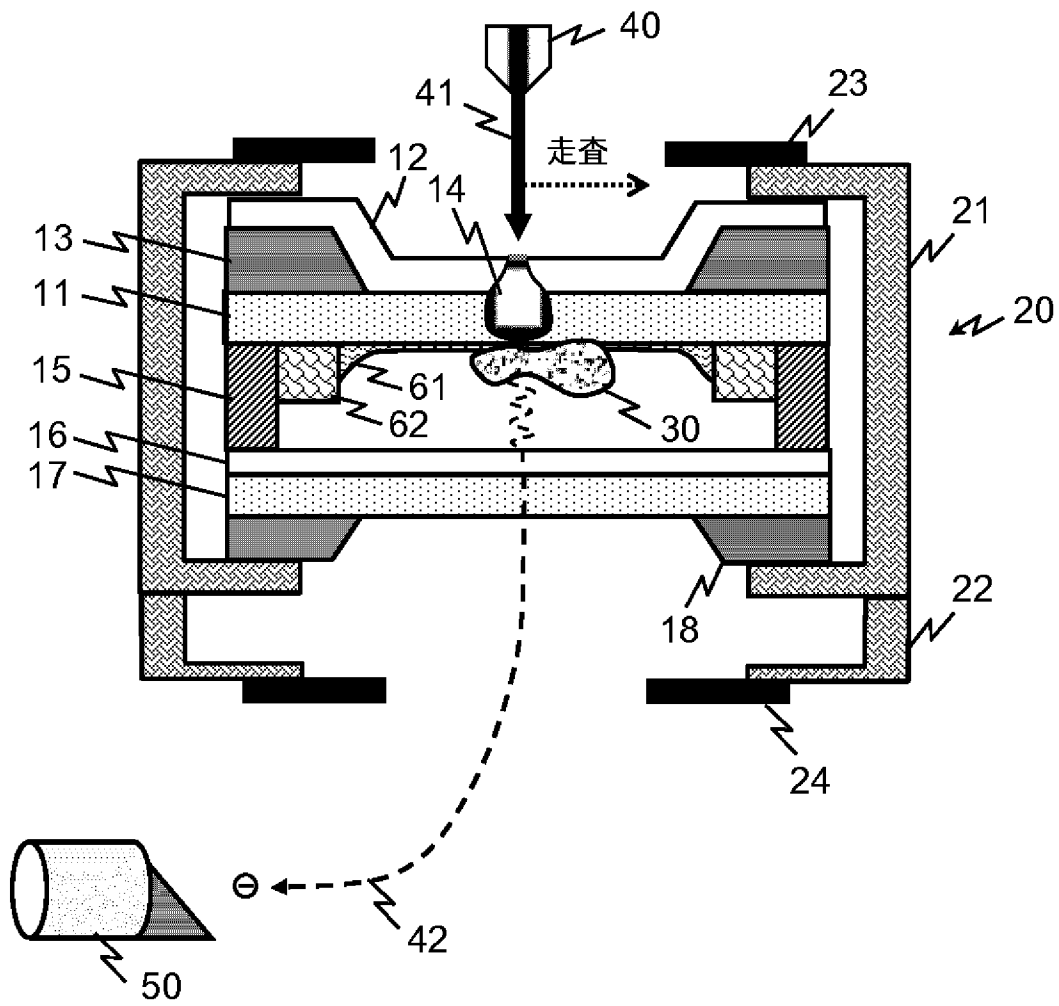
[図5A]



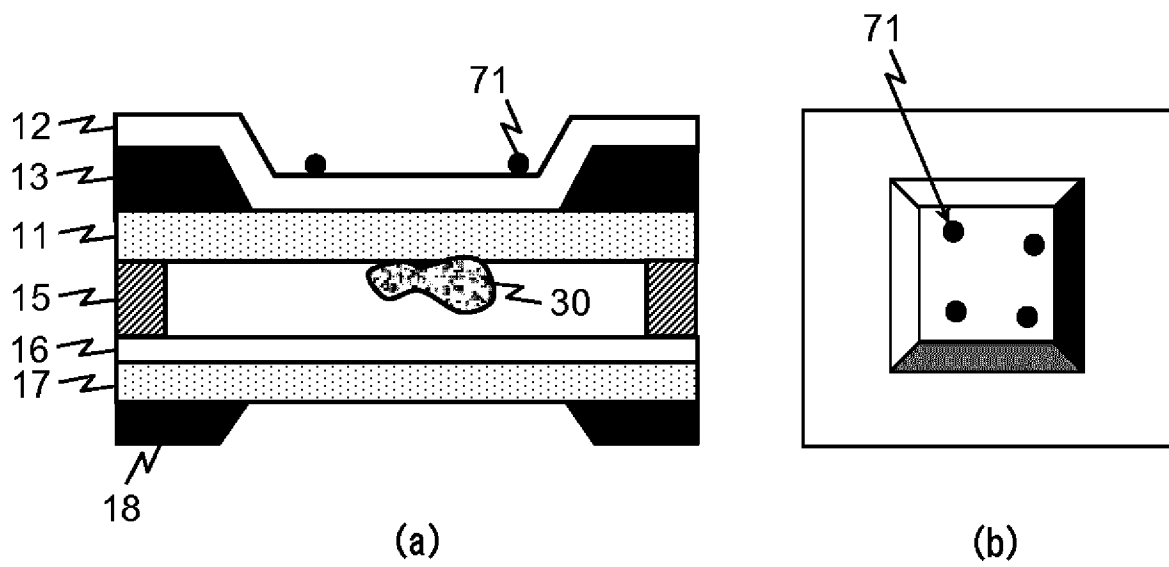
[図5B]



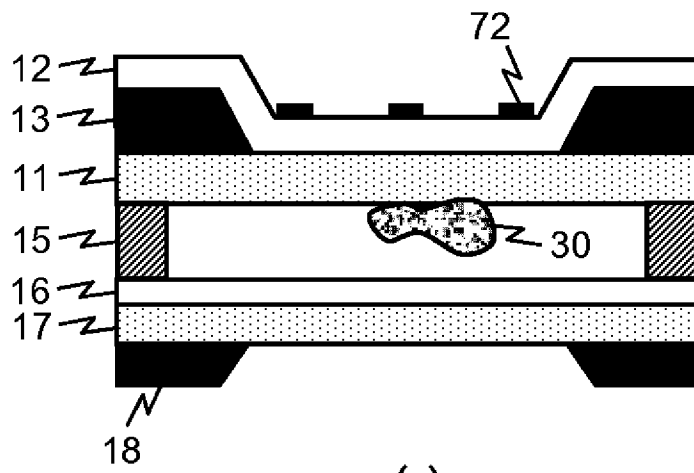
[図6]



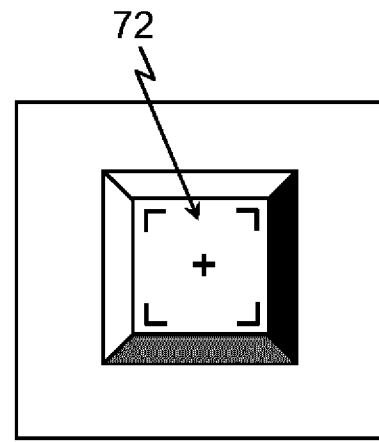
[図7A]



[図7B]



(a)



(b)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/003701

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

H01J37/20 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

H01J37/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2011-7766 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 13 January 2011 (13.01.2011), entire text; all drawings & WO 2010/134282 A1	1-19
Y	JP 2010-97844 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 30 April 2010 (30.04.2010), entire text; all drawings (Family: none)	1-19
Y	JP 2008-210765 A (JEOL Ltd.), 11 September 2008 (11.09.2008), paragraphs [0054] to [0065], [0109] to [0110]; fig. 9 & US 2008/0308731 A1 & EP 1953793 A1	9-12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 July, 2013 (08.07.13)

Date of mailing of the international search report  
16 July, 2013 (16.07.13)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2013/003701

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-8960 A (Advantest Corp.), 11 January 2002 (11.01.2002), entire text; all drawings & US 2001/0052573 A1 & DE 10129019 A & TW 499705 B	9-12
Y	JP 2004-515049 A (Yeda Research & Development Co., Ltd.), 20 May 2004 (20.05.2004), entire text; all drawings & US 2004/0046120 A1 & EP 1340241 A & AU 2101902 A & IL 156027 A & CZ 20031455 A & CN 1511332 A	13-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. H01J37/20(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. H01J37/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2011-7766 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2011.01.13, 全文、全図 & WO 2010/134282 A1	1-19
Y	JP 2010-97844 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2010.04.30, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-19
Y	JP 2008-210765 A (日本電子株式会社) 2008.09.11, 段落【0054】-【0065】、【0109】-【0110】、図9 & US 2008/0308731 A1 & EP 1953793 A1	9-12

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.07.2013

国際調査報告の発送日

16.07.2013

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

遠藤 直恵

電話番号 03-3581-1101 内線 3226

2G

3701

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2002-8960 A (株式会社アドバンテスト) 2002.01.11, 全文、全図 & US 2001/0052573 A1 & DE 10129019 A & TW 499705 B	9-12
Y	JP 2004-515049 A (エダ リサーチ アンド ディベロップメントカンパニー, リミテッド) 2004.05.20, 全文、全図 & US 2004/0046120 A1 & EP 1340241 A & AU 2101902 A & IL 156027 A & CZ 20031455 A & CN 1511332 A	13-15