

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-97844

(P2010-97844A)

(43) 公開日 平成22年4月30日(2010.4.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
H O 1 J 37/28 (2006.01)	H O 1 J 37/28	5 C O 3 3
H O 1 J 37/244 (2006.01)	H O 1 J 37/244	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2008-268441 (P2008-268441)	(71) 出願人	301021533
(22) 出願日	平成20年10月17日(2008.10.17)		独立行政法人産業技術総合研究所
			東京都千代田区霞が関1-3-1
		(74) 代理人	230104019
			弁護士 大野 聖二
		(74) 代理人	100106840
			弁理士 森田 耕司
		(74) 代理人	100105991
			弁理士 田中 玲子
		(74) 代理人	100117444
			弁理士 片山 健一
		(74) 代理人	100115679
			弁理士 山田 勇毅
		(74) 代理人	100113549
			弁理士 鈴木 守

最終頁に続く

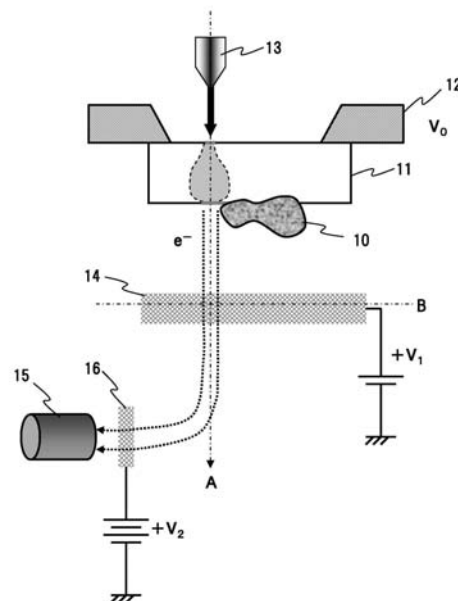
(54) 【発明の名称】 走査型電子顕微鏡およびその使用方法

(57) 【要約】

【課題】脆弱な試料にダメージを与えることなく、高分解能なSEM観察を可能とすること。

【解決手段】試料ホルダ12の下面側の平面内であって、観察試料10に照射される電子線の光軸に垂直な平面内に電位制御部14を配置した。そして、試料ホルダ12に固定させた試料支持部11の電位制御部14に対向する面で観察試料10を支持させ、電子線の加速電圧を1次電子が試料支持部11を実質的に透過せず且つ該試料支持部11内で発生した2次電子が観察試料支持面に到達する値に設定し、電位制御部14を試料ホルダ12の電位(V_0)よりも高い電位(V_1 : $V_1 > V_0$)とした条件で観察を実行する。このような条件でSEM観察を行なうと、電位制御部14により、試料支持部11の下面から出射された2次電子が電子線の光軸方向に引き寄せられるために2次電子のランダム放出が抑制され、得られるISEC画像の高分解能化を図ることができる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

観察試料を保持するための試料ホルダと、
該試料ホルダの上面側に配置された電子銃と、
前記試料ホルダの下面側に配置され、前記観察試料に照射される電子線の光軸に垂直な平面内に配置された電位制御部と、を備え、
前記電位制御部は、前記平面内の、前記電子線の照射領域に対応する領域の電位を、前記試料ホルダの電位 (V_0) よりも高い等電位 ($V_1 : V_1 > V_0$) に制御し得るものであることを特徴とする走査型電子顕微鏡。

【請求項 2】

前記電位制御部の下方に 2 次電子検出器が配置されており、該 2 次電子検出器の集電部の電位 (V_2) を前記電位制御部の電位 (V_1) よりも高く ($V_2 > V_1$) 制御し得るものであることを特徴とする請求項 1 に記載の走査型電子顕微鏡。

【請求項 3】

前記電位制御部は、導電性メッシュまたは孔部を有する導電性プレートである請求項 1 又は 2 に記載の走査型電子顕微鏡。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の走査型電子顕微鏡の使用方法であって、
前記観察試料を、前記試料ホルダに固定させた試料支持部の、前記電位制御部に対向する面で支持させ、
前記照射電子線の加速電圧を、1 次電子が前記試料支持部を実質的に透過せず、且つ、該試料支持部内で発生した 2 次電子が観察試料支持面に到達し得る値に設定し、
前記電位制御部を、前記試料ホルダの電位 (V_0) よりも高い電位 ($V_1 : V_1 > V_0$) とした条件で観察を実行することを特徴とする走査型電子顕微鏡の使用方法。

【請求項 5】

前記照射電子線の加速電圧を 5 keV 以下とし、且つ、前記試料支持部の厚みを 50 nm 以下とする、請求項 4 に記載の走査型電子顕微鏡の使用方法。

【請求項 6】

前記試料支持部としてカーボン膜を用いる、請求項 4 又は 5 に記載の走査型電子顕微鏡の使用方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は走査型電子顕微鏡技術に関し、より詳細には、生体物質や有機物質などの極めて脆弱な試料に対してもダメージを与えることなく、その形態や構造を高分解能で観察し得る走査型電子顕微鏡およびその使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

走査型電子顕微鏡 (SEM) は、生物試料の観測に良く用いられており、バクテリアの表面観察やウィルス等の観察が行われている。従来、走査型電子顕微鏡で生物試料を観察する場合は、試料をホルムアルデヒド等で固定化し金やプラチナ、カーボン等を表面にコーティング、あるいは重金属等による染色をしていた。こうした処理によりサンプルの電子線ダメージを低下させ、さらにコントラストの高い画像を得ることができる。

【0003】

最近、本発明者により、生物試料をコーティングや染色なしに高コントラストでの SEM 観察を可能とする新しい SEM 観察方法 (Indirect Secondary Electron Contrast Method: ISEC 法) が開発され、その観察条件及び当該手法で得られる画像は、間接 2 次電子コントラスト条件 (ISEC 条件) および間接 2 次電子コントラスト画像 (ISEC 画像) と呼ばれる (非特許文献 1 を参照)。

【0004】

この方法では、薄い試料支持膜（例えば、カーボン膜）の下部表面に観察試料を付着させ、試料支持膜の上部から低加速電圧の電子線を照射する。照射電子線は試料支持膜の内部で拡散しながら広がり、下部表面付近に到達し、試料支持膜の下部表面から２次電子が放出される。そして、この２次電子が、試料支持膜の下部表面に付着している観察試料に吸収される結果、高いコントラストのＳＥＭ像を得ることができる。

【０００５】

ＩＳＥＣ条件では、ＳＥＭ像形成（コントラスト形成）に寄与するのは試料支持膜中で発生した２次電子であり、入射電子線（１次電子線）が観察試料に直接照射されることはなく、入射電子線の殆どは試料支持膜に吸収されてしまう。また、ＩＳＥＣ条件下で発生する２次電子のエネルギーは数十eVと極めて低いため、この程度の低エネルギーの２次電子が生物試料等の脆弱な観察試料に吸収されてもダメージは殆ど無視できる。

10

【０００６】

しかも、ＩＳＥＣ法では、観察試料からの２次電子によってではなく、試料支持膜からの２次電子によって画像が形成されることとなるため、観察試料に黒いコントラストが生じる。従って、コントラストの付き難い観察試料からも高コントラストの観察画像を得ることが可能である。

【０００７】

しかし、非特許文献１に記載されている手法で得られるＩＳＥＣ画像は、一般的な手法で得られるＳＥＭ画像に比較して極めて高いコントラストのものであるという顕著な品質のものではあるものの、高分解能化という観点からは改善の余地が残されている。

20

【０００８】

これは、試料支持膜の下部表面から出射される２次電子が、様々な方向にランダムに放出されることによると解釈される。このような２次電子のランダム放出により、２次電子の放出範囲は空間的に広がらざるを得ず、その結果、得られるＩＳＥＣ画像に「ボケ」が生じてしまうのである。

【０００９】

同様に、試料支持膜をチルトさせて得られる観察試料の傾斜像も上記の２次電子のランダム放出の影響を受けるため、得られた傾斜像が本来のものとは異なるものになってしまう。加えて、傾斜観察の場合には、試料支持膜の下部表面の垂線方向が電子線の入射方向（光軸）とは一致しないため、放出された２次電子が入射電子線の光軸とは異なる方向に広がり、２次電子放出範囲がさらに広がることとなる結果、本来の傾斜画像を得ることが更に困難となってしまふ。

30

【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" Biochemical and Biophysical Research Communications (2008), doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.097

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１０】

本発明は、上述のＩＳＥＣ法の発展を目的としてなされたもので、生体物質や有機物質など極めて脆弱な試料の形態や構造を、試料にダメージを与えることなく高分解能で観察することが可能な走査型電子顕微鏡およびその使用方法を提供することにある。

40

【課題を解決するための手段】

【００１１】

かかる課題を解決するために、本発明に係る走査型電子顕微鏡は、観察試料を保持するための試料ホルダと、該試料ホルダの上面側に配置された電子銃と、前記試料ホルダの下面側に配置され、前記観察試料に照射される電子線の光軸に垂直な平面内に配置された電位制御部と、を備え、前記電位制御部は、前記平面内の、前記電子線の照射領域に対応する領域の電位を、前記試料ホルダの電位（ V_0 ）よりも高い等電位（ V_1 ： $V_1 > V_0$ ）に制御し得るものであることを特徴とする。

【００１２】

50

この走査型電子顕微鏡は、前記電位制御部の下方に２次電子検出器が配置されており、該２次電子検出器の集電部の電位（ V_2 ）を前記電位制御部の電位（ V_1 ）よりも高く（ $V_2 > V_1$ ）制御し得るものである構成とすることもできる。

【００１３】

前記電位制御部は、例えば、導電性メッシュや孔部を有する導電性プレートなどである。

【００１４】

このような走査型電子顕微鏡は、前記観察試料を前記試料ホルダに固定させた試料支持部の前記電位制御部に対向する面で支持させ、前記照射電子線の加速電圧を１次電子が前記試料支持部を実質的に透過せず且つ該試料支持部内で発生した２次電子が観察試料支持面に到達し得る値に設定し、前記電位制御部を前記試料ホルダの電位（ V_0 ）よりも高い電位（ V_1 ： $V_1 > V_0$ ）とした条件で使用される。

【００１５】

好ましく、前記照射電子線の加速電圧を５ｋｅＶ以下とし、且つ、前記試料支持部の厚みを５０ｎｍ以下とする。前記試料支持部としては、例えば、カーボン膜を用いることができる。

【発明の効果】

【００１６】

本発明の走査型電子顕微鏡では、試料ホルダの下面側（電子銃を配置する側とは反対側）の平面内であって、観察試料に照射される電子線の光軸に垂直な平面内に電位制御部を配置した。これにより、試料ホルダに固定させた試料支持部の電位制御部に対向する面で観察試料を支持させ、電子線の加速電圧を１次電子が試料支持部を実質的に透過せず且つ該試料支持部内で発生した２次電子が観察試料支持面に到達する値に設定し、電位制御部を試料ホルダの電位（ V_0 ）よりも高い電位（ V_1 ： $V_1 > V_0$ ）とした条件で観察を実行することを可能とした。

【００１７】

このような条件でＳＥＭ観察を行なうと、電位制御部により、試料支持部の下面（電子銃が配置された側とは反対側の面）から出射された２次電子が電子線の光軸と同じ下方向に引き寄せられるために２次電子のランダム放出が抑制され、得られるＩＳＥＣ画像の高分解能化を図ることができる。また、同様の理由により、観察試料の傾斜像も、より本来のものに近いものが得られるようになる。

【００１８】

さらに、電位制御部の下方に２次電子検出器を配置し、該２次電子検出器の集電部の電位（ V_2 ）を電位制御部の電位（ V_1 ）よりも高く（ $V_2 > V_1$ ）設定すると、試料支持部の上面（電子銃が配置された側の面）から出射された２次電子までもが２次電子検出器によって検知されてしまいノイズとなるという現象が抑制され、ＩＳＥＣ画像のＳＮ比が向上する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１９】

以下に、図面を参照して、本発明の走査型電子顕微鏡およびその使用方法について説明する。なお、以下では、便宜上、観察試料の位置を基準に他の構成要素の「上下関係」を説明するが、各構成要素の上下関係を逆に配置するなどとしてもよいことは自明である。

【００２０】

図１は、本発明の走査型電子顕微鏡の要部の構成例を説明するための概念図で、観察試料１０はカーボン膜などの試料支持部１１によって支持され、当該試料支持部１１は試料ホルダ１２に固定されている。試料ホルダ１２の上面側には電子銃１３が配置され、試料ホルダ１２の下面側には電位制御部１４（導電性メッシュとして図示）が配置されている。この電位制御部１４は、観察試料に照射される電子線の光軸（図中にＡで示した）に垂直な平面（図中にＢで示した）内に配置されており、上記平面（Ｂ）内の電子線の照射領域に対応する領域の電位を、試料ホルダ１２の電位（ V_0 ）よりも高い等電位（ V_1 ： V

10

20

30

40

50

$V_1 > V_0$) に制御し得るものであり、例えば、金属やカーボンといった導電性の材料からなる導電性メッシュや孔部を有する導電性プレートなどであってよい。

【0021】

電子銃13から試料支持部11の上面に照射された電子(1次電子)は当該試料支持部11の内部を拡散するが、本発明では、ISEC画像を得るに際し、1次電子が試料支持部11を実質的には透過せず、且つ、該試料支持部11内で発生した2次電子が試料支持部11の下面(観察試料支持面)に到達する値に電子線の加速電圧を設定する。そして、電位制御部14を、試料ホルダ12の電位(V_0 : 試料支持部11および観察試料10の実効的な電位でもある)よりも高い電位(V_1 : $V_1 > V_0$)とした条件で観察を実行する。具体的には、例えば、電子線の加速電圧を5 keV以下とし、且つ、試料支持部11の厚みを50 nm以下とするなどの条件設定を行なう。

10

【0022】

このような条件下では、エネルギーの高い1次電子は試料支持部11を透過しないから、脆弱な生物試料等にもダメージを与えることがない。一方、試料支持部11内で発生した2次電子は試料支持部11の下面より外部へと放出され、この2次電子は、電位制御部14の存在により、電子線の光軸と同じ下方向に引き寄せられることとなってランダム放出が抑制され、その状態で2次検出器により集電されることとなる。

【0023】

なお、「1次電子が試料支持部11を実質的には透過せず」という場合の「実質的には透過せず」とは、試料支持部11からの1次電子の透過を完全に抑え込むことまでを意味するものではない。ここで言う「実質的には透過せず」の意味(すなわち、どの程度の透過量まで許容し得るか)は、観察試料の電子線によるダメージに対する脆弱性に依存するものであり、観察試料にダメージを与えない程度の1次電子の透過量であれば許容し得る。しかし、これまでの説明から明らかなように、ISEC法では試料支持部を透過した1次電子はISEC画像のノイズ成分でしかないから、透過1次電子量は可能な限り低く抑えることが好ましい。

20

【0024】

一般的なSEMでは、2次検出器は試料ホルダ12(試料支持部11)の上側に配置されているが、図1に示した構成例では、電位制御部14の下方に2次電子検出器15を配置し、該2次電子検出器15の集電部16(導電性メッシュとして図示)の電位(V_2)を電位制御部14の電位(V_1)よりも高く($V_2 > V_1$)設定している。

30

【0025】

これは、2次検出器を試料ホルダ12(試料支持部11)の上側に配置した構成では、試料支持部11の下面から放出された2次電子のみならず、試料支持部11の上面から射出された2次電子までもが2次電子検出器によって検知されてしまうが、後者はノイズの原因となるためである。

【0026】

このような構成の走査型電子顕微鏡によれば、試料支持部11の下面から放出された2次電子をランダムな方向に拡散させることなく、入射電子線の光軸方向に引き寄せることが可能となり、ISEC画像の分解能が向上し、観察試料の傾斜像の「歪み」も取り除くことができる。

40

【0027】

試料支持部11としては、透過型電子顕微鏡観察で一般的に用いられているカーボン支持膜を使用することが可能であるが、シリコン系素材の膜や金属薄膜なども使用可能である。また、試料支持部11の厚さは50 nm以下であることが好ましい。

【0028】

また、入射電子線の加速電圧は、試料支持部の素材と膜厚に依存して適正な値を選択する必要があるが、例えば、非特許文献1では、厚み40 nmのカーボン膜を試料支持部として使用し、電子線加速電圧1.5 kVの条件の下で、高コントラストのISEC画像を得ている。

50

【0029】

図2 (A) および (B) は、本発明の走査型電子顕微鏡が備える電位制御部がある場合 (図2 (A)) とない場合 (図2 (B)) の違いを模式的に示すための図で、試料支持部が入射電子線の光軸に垂直 (チルトなし) な場合の模式図である。なお、ここでは、電位制御部を導電性メッシュとして図示している。

【0030】

電位制御部がある場合 (図2 (A)) には、観察試料10の下側に配置された導電性メッシュ14により、2次電子のランダム放出は生じない。これに対し、導電性メッシュ14を配置しない場合 (図2 (B)) には、試料支持部の下面から放出された2次電子はランダムに放出され、これがISEC画像の「ボケ」の原因となって分解能が低下してしまう。

10

【0031】

図3 (A) および (B) は、試料支持部をチルトさせた場合の、本発明の走査型電子顕微鏡が備える電位制御部がある場合 (図3 (A)) とない場合 (図3 (B)) の違いを模式的に示すための図である。なお、ここでも、電位制御部を導電性メッシュとして図示している。

【0032】

試料支持部をチルトさせた場合も、図2 (A) および (B) で説明したのと同様に、電位制御部がある場合 (図3 (A)) には、観察試料10の下側に配置された導電性メッシュ14により、入射電子線の光軸に一致する方向に2次電子が引き寄せられるためにランダム放出は生じないため、より正確な傾斜画像を得ることが可能である。これに対し、導電性メッシュ14を配置しない場合 (図3 (B)) には、試料支持部の下面から放出された2次電子はランダムに放出され、これがISEC画像の「ボケ」の原因となるだけではなく正確な傾斜画像を得ることそのものの障害となる。

20

【実施例1】

【0033】

図4 (A) 乃至 (D) は、口腔内バクテリアの一種を観察試料とし、これを銅製グリッド (メッシュ) に固定した厚み40nmのカーボン膜の下部に付着させ、アルミニウム製の試料ホルダで保持させて、ISEC法で得られたISEC画像である。このISEC画像は、図1に図示されているように、観察試料下面側に電位制御部としての銅製グリッドメッシュ (金属メッシュ) を試料支持部であるカーボン膜に平行 (すなわち、観察試料に照射される電子線の光軸に垂直な平面内) に設置して撮影されたものである。なお、カーボン膜と銅製グリッドメッシュ (金属メッシュ) との間隔は5mmである。

30

【0034】

図4 (A) は電位制御部としての銅製グリッドメッシュ (金属メッシュ) の電位を $V_1 = +200V$ とした場合のISEC画像であり、図4 (B) は $V_1 = 0V$ とした場合のISEC画像である。なお、アルミニウム製試料ホルダ電位を $V_0 = 0$ である。これらのISEC画像に映し出されたバクテリアの形状を比較すると、図4 (A) のほうが明らかに細く (すなわち、シャープに) 観察されている。

【0035】

図4 (C) 及び (D) はそれぞれ、図4 (A) 及び (B) 中に破線で示した領域の拡大画像である。図4 (C) ではバクテリアの屈曲部も明瞭に確認できているのに対して、図4 (D) では画像の「ボケ」のために上記屈曲部の形状を確認することは困難である。

40

【実施例2】

【0036】

図5 (A) 乃至 (D) は、上記と同様の観察試料を 30° 傾斜させた状態で撮影したISEC画像で、図5 (A) は電位制御部としての銅製グリッドメッシュ (金属メッシュ) の電位を $V_1 = +100V$ とした場合のISEC画像であり、図5 (B) は $V_1 = 0V$ とした場合のISEC画像である。なお、この場合も、アルミニウム製試料ホルダ電位を $V_0 = 0$ である。

50

【0037】

傾斜観察の場合も、電位制御部の電位を、試料ホルダの電位 (V_0) よりも高い等電位 ($V_1 = +100\text{V}$) とした場合のほうが、バクテリアがシャープに観察されている。

【0038】

図5 (C) 及び (D) はそれぞれ、図5 (A) 及び (B) 中に破線で示した領域の球状のバクテリアの拡大画像である。図5 (D) では球状バクテリアの輪郭が「ボケ」ているのに対し、図5 (C) では比較的明瞭な輪郭を確認することができる。

【産業上の利用可能性】

【0039】

本発明は、バクテリア、ウィルス、タンパク質複合体等の生体物質や有機物質など極めて脆弱な試料の形態や構造を、試料にダメージを与えることなく高分解能で観察することが可能な走査型電子顕微鏡およびその使用方法を提供する。研究用装置としてだけでなく薬品開発等としても利用価値が高い。

10

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】本発明の走査型電子顕微鏡の要部の構成例を説明するための概念図である。

【図2】本発明の走査型電子顕微鏡が備える電位制御部がある場合 (図2 (A)) とない場合 (図2 (B)) の違いを模式的に示すための図である。

【図3】試料支持部をチルトさせた場合の、本発明の走査型電子顕微鏡が備える電位制御部がある場合 (図3 (A)) とない場合 (図3 (B)) の違いを模式的に示すための図である。

20

【図4】口腔内バクテリアの一種を観察試料とし、これを銅製グリッド (メッシュ) に固定した厚み 40nm のカーボン膜の下部に付着させ、アルミニウム製の試料ホルダで保持させて、ISEC法で得られたISEC画像である。

【図5】図4と同様の観察試料を 30° 傾斜させた状態で撮影したISEC画像である。

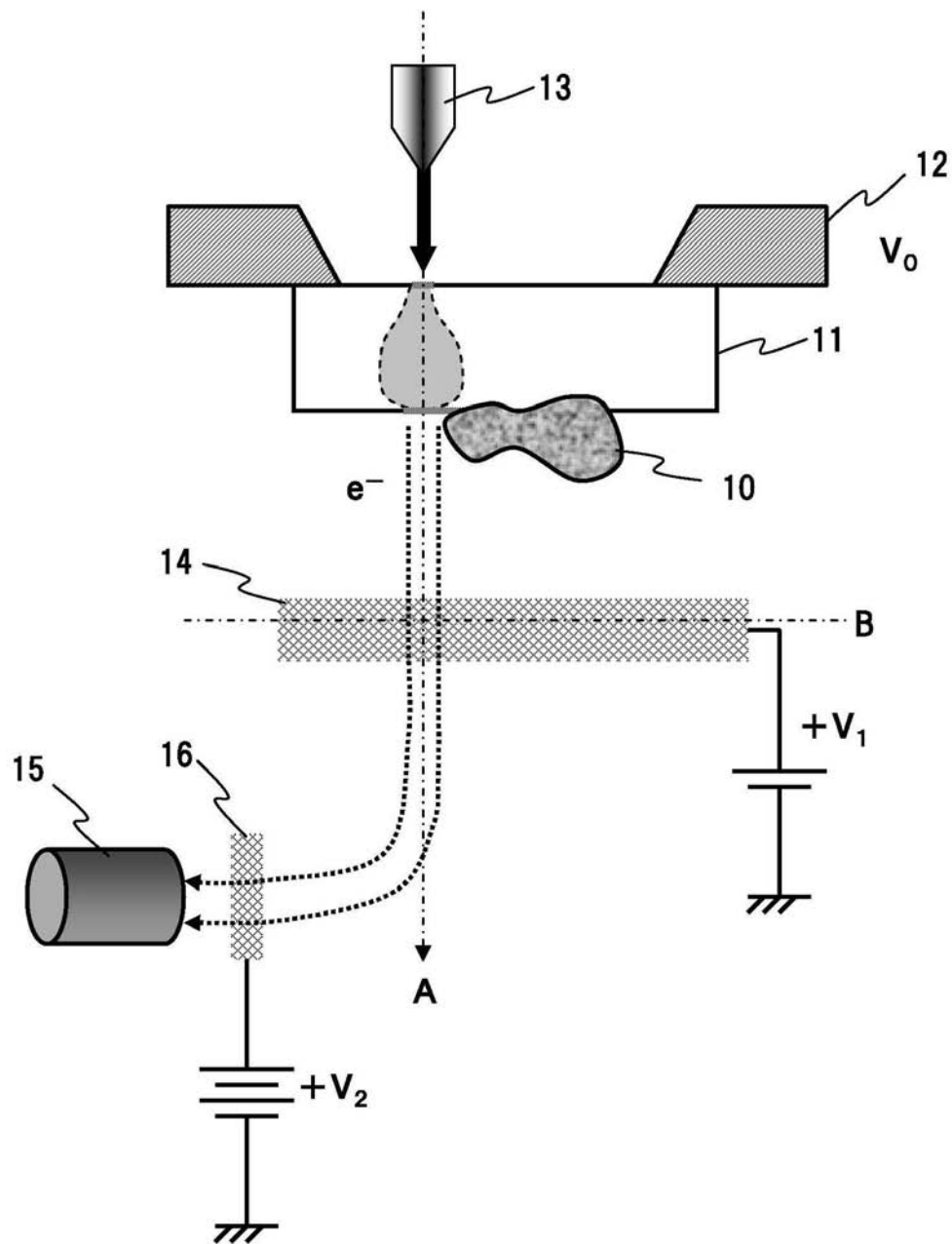
【符号の説明】

【0041】

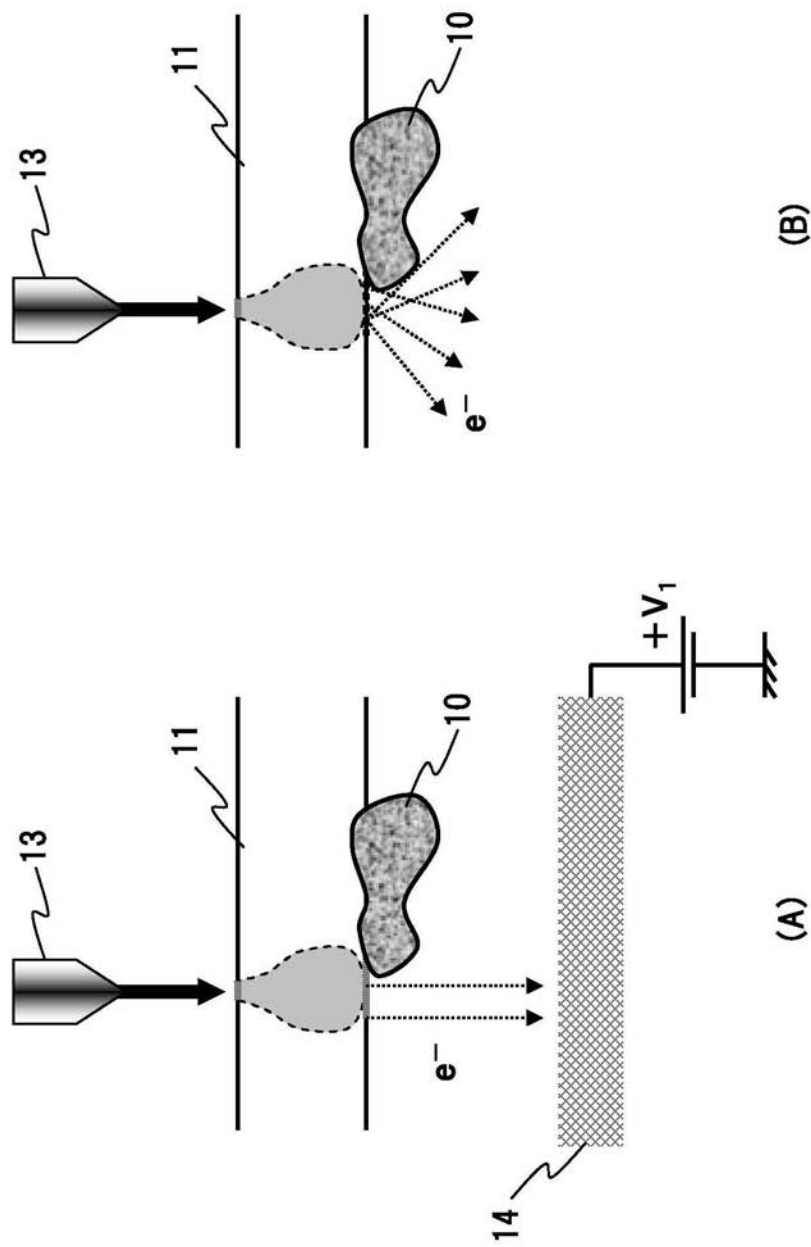
- 10 観察試料
- 11 試料支持部
- 12 試料ホルダ
- 13 電子銃
- 14 電位制御部
- 15 2次電子検出器
- 16 集電部

30

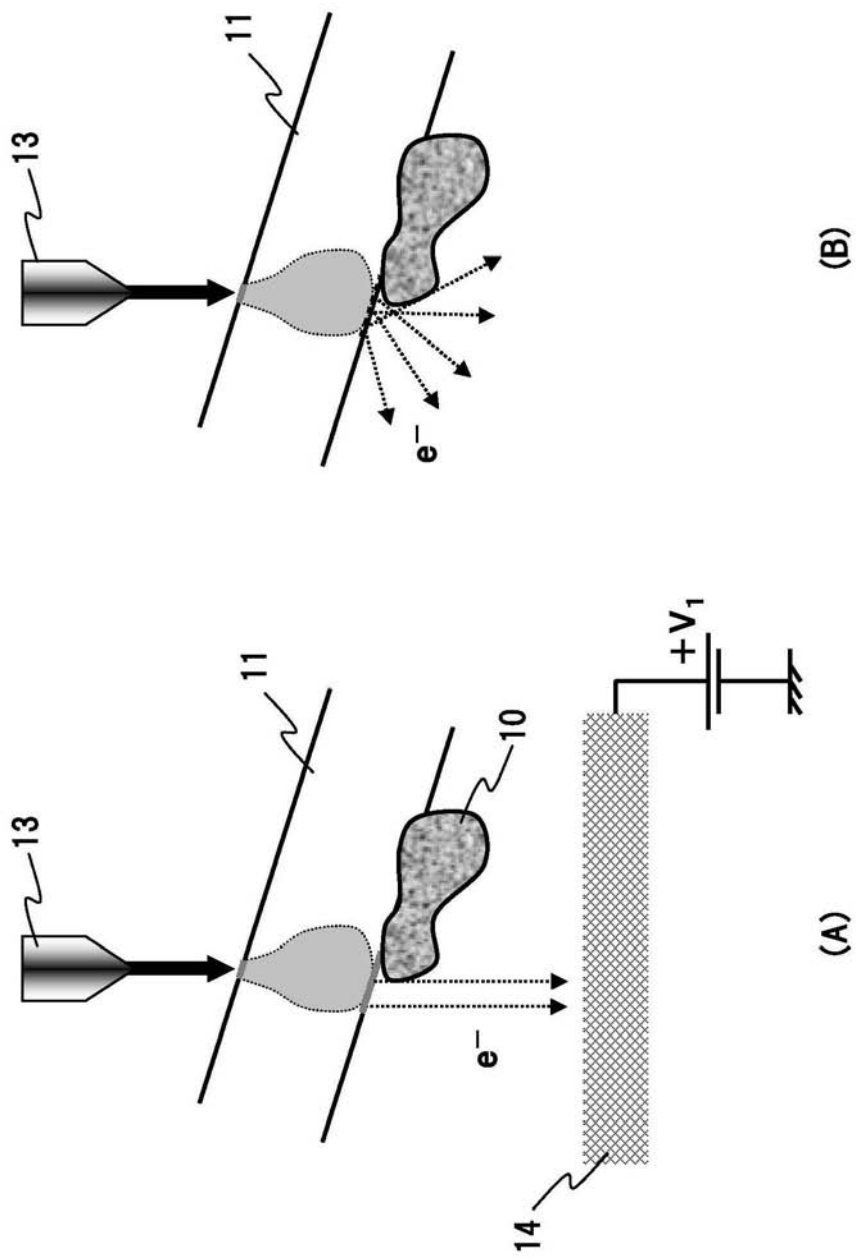
【図 1】



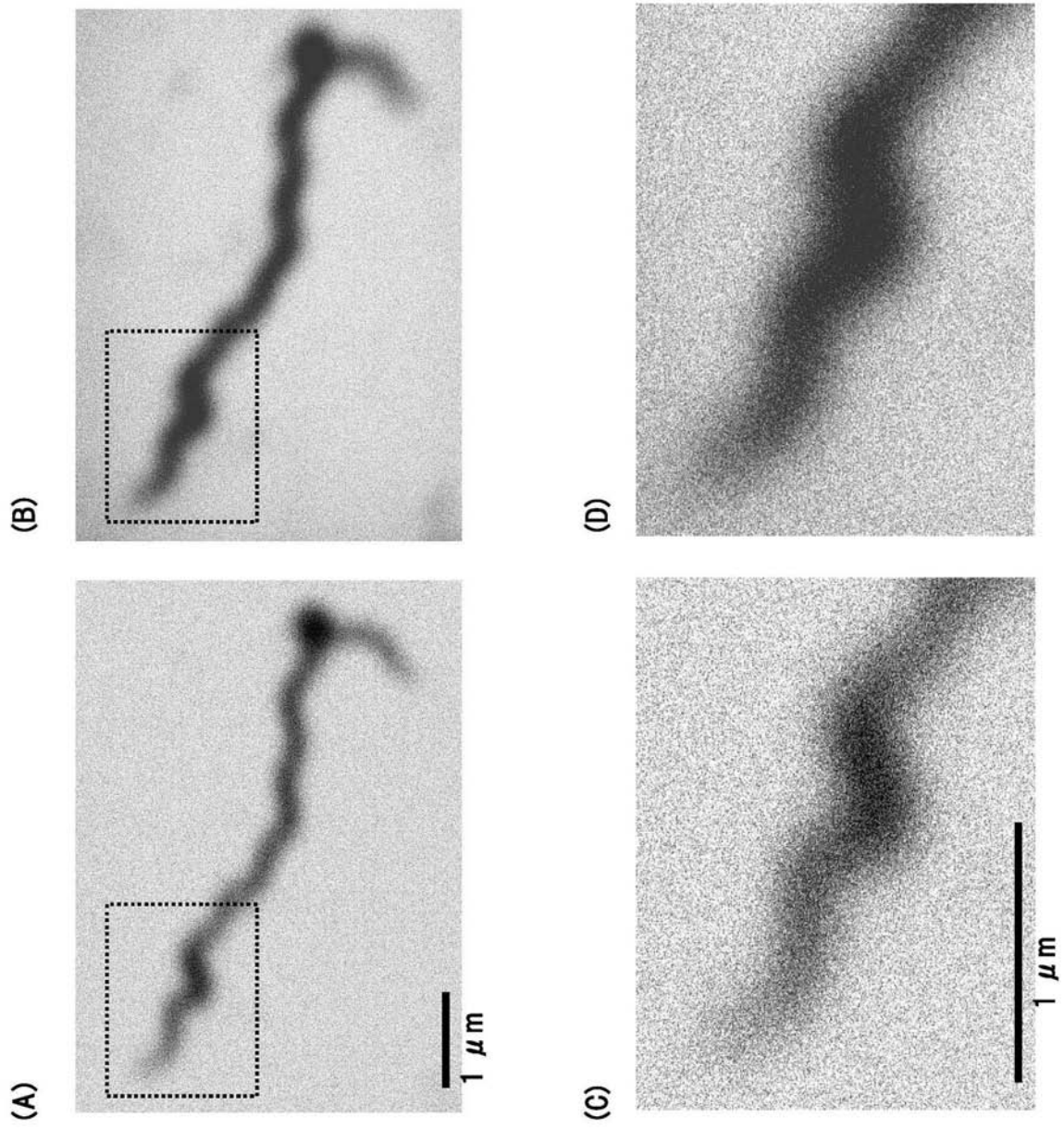
【 図 2 】



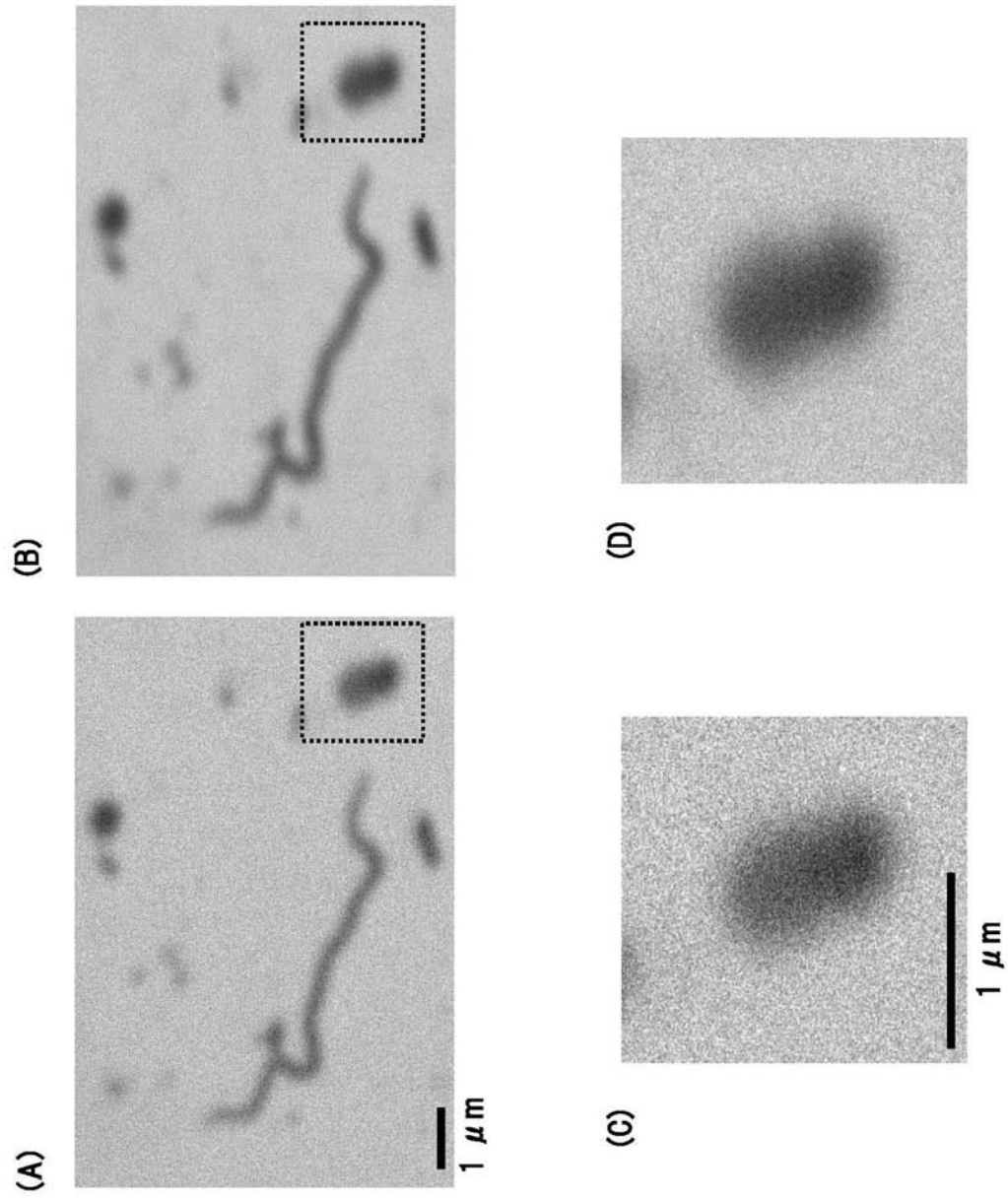
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(72)発明者 小椋 俊彦

茨城県つくば市東 1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

Fターム(参考) 5C033 NN01 NN10 NP01 NP08 UU04 UU10