

光を使わない顕微鏡

許斐 麻美*・中澤 英子

顕微鏡は、微小な対象物を拡大して観察する装置で、光を用いる光学顕微鏡と電子を用いる電子顕微鏡に大別される。光学顕微鏡が、主として1000倍以下の観察倍率であるのに対して、1932年に発明された電子顕微鏡 (Electron Microscope) は、光学顕微鏡よりはるかに高い分解能を有し、より微細な構造観察が可能となっている。電子顕微鏡は、生命科学においては、細胞小器官の構造解明やウィルスの発見などに寄与し、また材料化学では、カーボンナノチューブに代表されるナノ構造物質の発見に寄与しており、半導体から医療、バイオにいたる幅広い分野で現在利用されている。電子顕微鏡には、透過電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope, TEM) と走査電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope, SEM) があり、今回は、この2種類の電子顕微鏡の原理と特徴、さらに応用例を紹介する。

電子顕微鏡の原理

図1に光学顕微鏡と電子顕微鏡の基本構造を示す。試料に光を当て、ガラスのレンズで拡大する光学顕微鏡に対し、電子顕微鏡は、電子銃から発生した電子線を利用している。電子銃には、熱電子放出型と、電界放出型 (Field Emission, FE) がある (表1)。熱電子放出型電子銃は、

電子源となるフィラメントに通電加熱することで熱電子を放出する方式で、使用真空度が低いため、比較的簡易な装置構成で利用できる。一方、FE電子銃は、細くとがらせたチップの先端に高真空下で強電界を作用させて電子線を放出する方法である。電子源サイズが小さく、高輝度を得られるため、高分解能観察が実現する反面、超高真空を必要とするため、装置が大がかりになってしまう。このほかにも、熱電子放出型としてホウ化ランタンを用いるLaB₆電子銃、FE型としてSchottky Emission電子銃が存在する。Schottky Emissionタイプは通常のFE電子銃よりも多くの電流を得ることができるため、元素分析を目的とする顕微鏡に搭載されている。

表1. 電子源の特性

特性	熱電子放出型	電界放出型
電子源	タングステンフィラメント	FEチップ
電子源の大きさ	30 μm	5 nm
輝度 ($\text{A}/\text{cm}^3 \cdot \text{sr}$)	10^6	10^9
エネルギー幅 (eV)	2	0.3
真空度 (Pa)	10^{-3}	10^{-7} 以下
陰極温度 ($^{\circ}\text{C}$)	2500	室温
寿命	50 hr	1年以上

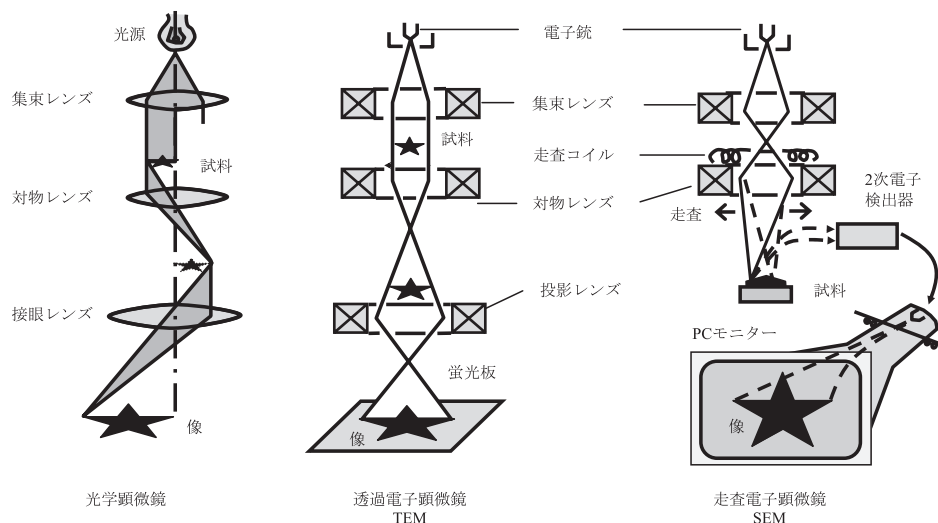


図1. 光学顕微鏡と電子顕微鏡の原理

*著者紹介 株式会社日立ハイテクノロジーズ アプリケーション開発部 (技師) E-mail: konomi-mami@naka.hitachi-hitec.com

また、レンズは、光学顕微鏡のようにガラス製ではなく、強力な磁界によってレンズ作用をもたらす電子レンズが利用されている。光と異なって電子は、その進行がガス分子に影響されるため、真空中に保持する必要がある。また、電子線は、通常TEMは100～300 kV、SEMは1～30 kVに加速している。そのため、装置は電子線を発生させる高性能な電源装置に加え、顕微鏡内を真空中に保つ機構が必要であり、光学顕微鏡より大きな構造となる。

光(可視光)が約400～750 nmの波長を示すのに対し、電子は約0.05 nm(加速電圧60 kVの場合)とはるかに短い波長であるため、より小さな対象物を観察することができる。また、電子線を真空中で試料に照射すると、図2に示すように、試料と相互作用してさまざまな信号が放出される。おもな放出信号は、二次電子(Secondary Electron, SE)、後方散乱電子(Backscattered Electron, BSE)、透過電子(Transmitted Electron, TE)、弾性散乱電子、非弾性散乱電子であり、他に特性X線、試料吸収電流、オージェ電子、カソードルミネッセンスなども放出される。主として、SEとBSEはSEMで利用され、TEはTEMで利用される。

透過電子顕微鏡：TEM

TEMは、電子銃、鏡体、試料室、観察室、カメラ室、操作パネル、モニタから構成される。サブミクロン以下の厚みの試料に数10 kVから300 kVの電圧で加速した電子線を入射し、試料を透過してきた電子を拡大して観察する装置である。コンデンサーレンズによって試料に電子線を平行照射し、透過した電子線を結像レンズで拡大し、蛍光板に投影する¹⁻³⁾。従来、肉眼やルーペを使って蛍光板上で投影された画像を観察していたが、最近では、蛍光板を直視せず、デジタルカメラで観察できる装置も開発されている(図3)。TEMでは、図2に示す透過電子

と弾性散乱電子をおもに用いて像が形成されており、試料内部の組織や微細構造を最大数百万倍の倍率で観察することができる。またX線やエネルギー損失電子の検出器を付加することで、元素や化学結合状態の分析も実現し、また近年では走査透過電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope, STEM)像観察装置を有するものもある。

TEM像は、散乱・回折・位相の3種のコントラストで結像される。散乱コントラストは、入射電子が試料中を通過する際に散乱・吸収されることに起因したコントラストで、主として構成元素による散乱能の差を利用しており、生物試料などの観察に用いられる。図4はラット腎臓糸球体の超薄切片像である。試料の固定や超薄切片の染色に重金属を用いることによって、コントラストが増加し、毛細血管や細胞核など微細構造が明瞭に観察されている。

結晶性試料の場合、入射した電子線は結晶面で回折され、明暗の回折コントラストが観察される。回折条件が結晶の方位によって異なることから、結晶粒や結晶欠陥

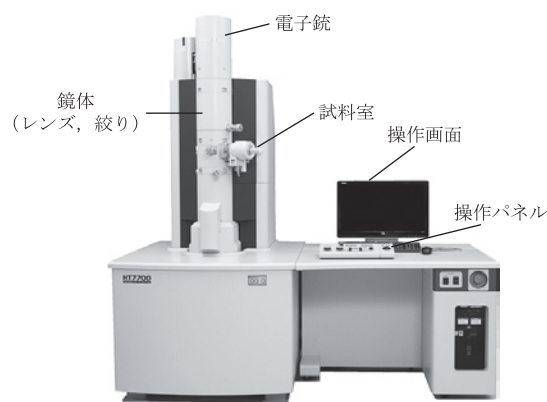


図3. 透過電子顕微鏡の外観(日立HT7700形TEM)

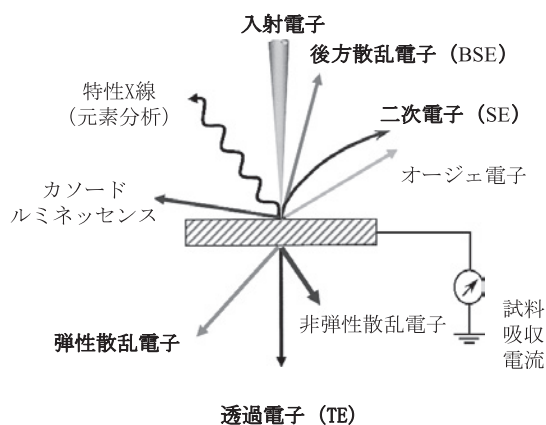


図2. 電子線照射により試料から発生する信号



図4. ラット腎臓糸球体の超薄切片像。観察条件：加速電圧100 kV、撮影倍率700倍。

などの情報を捉えることができる。

位相コントラストは、平行な電子線で非常に薄い試料を照射した際に透過電子波と散乱電子波の干渉により生じるコントラストであり、10万倍以上の高分解能像が観察できるため、原子配列や微粒子の周期情報を捉えることができる。図5に、ネガティブ染色したカタラーゼ結晶の格子像を示す。焦点量によって異なる格子像が観察されている⁴⁾。

近年では、試料を連続的に傾斜して撮影した像をコンピュータ上で画像処理することにより、三次元像を再構成して解析する電子線トモグラフィ法が普及している。本方法は、試料の微細な三次元構造をナノレベルで解析できる有用な方法となっている。

走査電子顕微鏡：SEM

図6には走査電子顕微鏡の外観を示す。SEMは、電子銃、鏡体、試料室、検出器、操作パネル、操作画面で構成される。SEMでは電子銃から発生した電子線は、真空中で加速し、細く絞られ、走査コイルによって試料表面にXY方向に走査される。電子線照射により試料から放出された信号を検出器によって捕集し、信号増幅後にモニタ上に輝度信号として表示される。試料表面の電子線走査幅の調整で、モニタ表示される像の拡大倍率が可変できる。照射電子ビームの加速電圧は通常500 Vから30 kVであり、目的に応じて使い分けられている^{1-3,5)}。また最近では、試料直前で入射電子を減速させるリターディング⁶⁾など減速電子光学方式が利用可能な装置もあり、100～300 Vの極低加速電圧で観察できる。この装置では、入射電子はレンズ内を高加速のまま通過するので収差の影響を受けにくく、高分解能観察が可能となる。

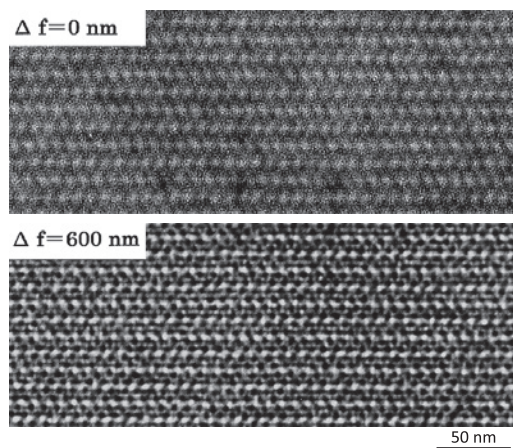


図5. カタラーゼ結晶の格子像。観察条件：加速電圧100 kV，撮影倍率5万倍。Δf：不足焦点量

電子線を試料上に集束させる対物レンズには、用途に応じて3種類が用いられる。図7 (a) のアウトレンズ方式は、試料をレンズ下方に置き、信号はレンズ下面と試料の間にある検出器で捕集される。もっとも一般的なレンズで大型試料や磁性材料の観察に適している。図7(b) に示すインレンズ方式⁷⁾は、試料を対物レンズ構造内に挿入する方式で、信号はレンズ磁場で巻き上げられ、レンズ上方の検出器で捕集される。このレンズでは試料サイズが数mm角に制約されるが、仮想レンズと試料の距離が短くなり、短焦点化が実現するため、高分解能観察が可能になる。図7 (c) のシュノーケルレンズ方式⁸⁾は、仮想レンズを対物レンズ構造体の下側に形成することによって、レンズと試料との距離が短くなり、インレンズ方式並みの高分解能を実現し、一方、試料は対物レンズ下方に置くことができるため、アウトレンズ方式並みの大型試料観察ができる。また信号はレンズ下方と試料の間にある検出器に加え、レンズ磁場で巻き上げられたものをレンズ上方の検出器で検出するなど複数の検出器を有するものがある。SEMの分解能はこの対物レンズと

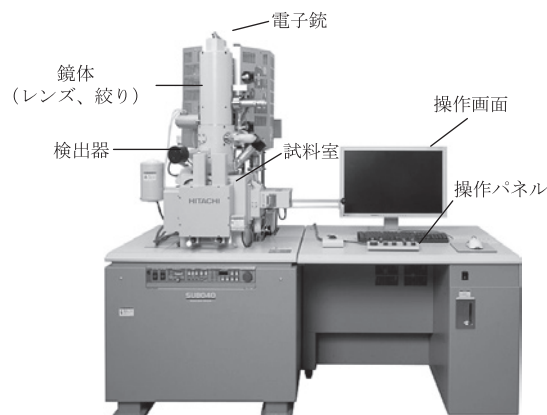


図6. 走査電子顕微鏡の外観（日立SU8040形FESEM）

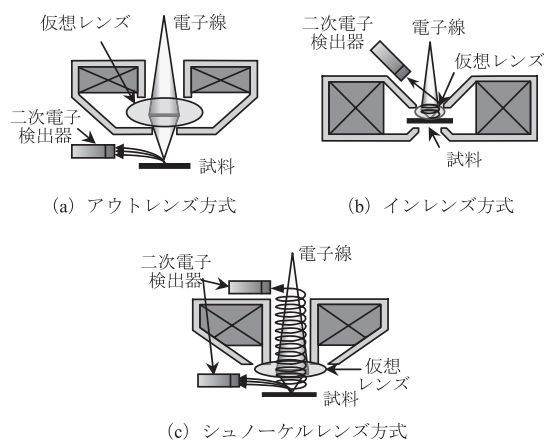


図7. SEM対物レンズの種類

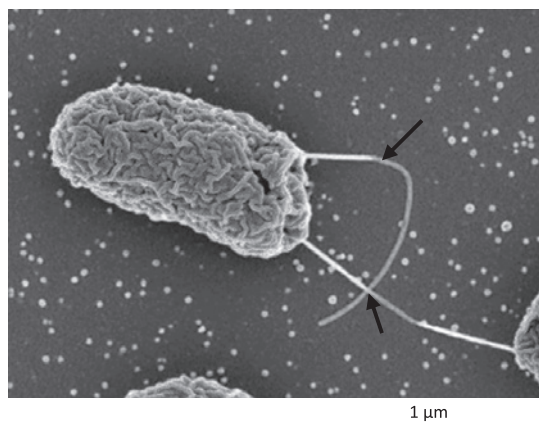


図8. 大腸菌の二次電子像。観察条件：加速電圧1.2 kV，撮影倍率3万倍。（試料ご提供：株式会社NBCメッシュテック殿）

前述の電子銃との組合せによって異なり，FE電子銃とシュノーケルレンズ及びインレンズ方式との組合せはナノメートルオーダーの高分解能観察を実現することができる。

SEMは，電子ビームが照射されて試料から放出されるSEとBSEを用いて主に像が形成されている（図2）。SEは，入射電子のクーロン力により二次的に放出された電子で，数十eV以下のエネルギーを有し，放出効率が試料の傾斜角度に依存することから，試料表面凹凸形状を反映したコントラストを取得できる。図8には，大腸菌のSE像を示す。大腸菌の菌体形状だけでなく，試料表面構造が確認され，また2本の鞭毛を有することが確認できている（図8，矢印）。

BSEは，入射電子が試料内の原子や電子と相互作用して後方に散乱した電子であり，凹凸に加え組成や結晶の情報をも有する。これはBSEが，試料構成元素の原子番号や密度に比例した発生効率を示すことに起因しており，試料の組成差に応じたコントラストが得られる。またBSEが保有するエネルギーと放出領域は入射電子のそれと比例することから，高加速電圧では試料のより深い領域の情報が観察できる。BSEは，数kV以上の加速電圧で取得する検出器を装着して検出するが，近年では新しい検出方式の採用により低加速電圧でBSE情報が取得できる装置もある⁹⁾。図9は免疫染色された黄色ブドウ球菌の低加速電圧BSE像を示した。細胞表層に存在するタンパク質の局在を示すコロイド金粒子が，BSEにおいてコントラスト高く観察され，その局在が確認されている¹⁰⁾。

またSEMには，STEM検出器を備えることで，TEを検出することも可能な装置がある。その他，エネルギー分散形X線分光器（Energy Dispersive X-ray Spectrometer, EDS）や波長分散形X線分光器（Wavelength Dispersive

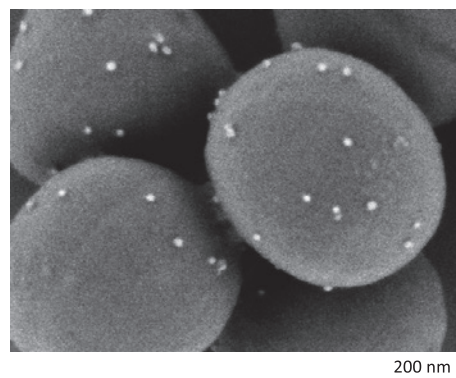


図9. 免疫染色された黄色ブドウ球菌の低加速電圧BSE像。観察条件：加速電圧0.8 kV，撮影倍率10万倍。（試料ご提供：千葉大学真菌医学研究センター山口正視先生）

X-ray Spectrometer, WDS) を装着することで特性X線を検出し，試料の組成分析を行うこともできる。また，電子線後方散乱回折（Electron Backscattered Diffraction, EBSD）を利用して結晶方位解析する装置や発光スペクトルを検出するカソードルミネッセンス（CL）の装置なども装着することができる。

終わりに

TEMおよびSEMの基本的な原理と応用例について紹介した。電子顕微鏡は，幅広い分野で活用されているが，特に生命科学分野では，生命体の微細構造解析に加え，機能物質の局在解析にも用いることができる。構造と機能の相関において，電子顕微鏡の担う役割は大きく，今後ますます，重要なツールとして活用されるものと期待される。

文 献

- 1) 小森亨一ら編：分析機器の手引き，社団法人日本分析機器工業会 (2012)。
- 2) 医学生物学電子顕微鏡技術研究会：よくわかる電子顕微鏡技術，朝倉書店 (1992)。
- 3) 日本顕微鏡学会：電顕入門ハンドブック，学会出版センター (2004)。
- 4) 中澤英子：電子顕微鏡 基礎技術と応用2000，p. 7，学際企画 (2000)。
- 5) 日本顕微鏡学会関東支部：走査電子顕微鏡，共立出版 (2011)。
- 6) Ezumi, M. *et al.*: *Proc. of SPIE*, **2275**, 105 (1996)。
- 7) Nagatani, T. *et al.*: *Scanning Electron Microsc.*, **1**, 901 (1987)。
- 8) Murvey, T.: *Scanning Electron Microsc.*, **1**, 43 (1974)。
- 9) 澤島哲哉ら：LSIテストングシンポジウム資料，p. 157 (2000)。
- 10) Yamaguchi, M. *et al.*: *Microbiol. Immunol.* **54**, 368 (2010)。