

走査電子顕微鏡法 (1)

木村利昭

(Toshiaki Kimura)

1. はじめに

食品に限らず顕微鏡で、ある試料を観察する際には、試料の全体像をとらえることが大切である。いきなり局所的な観察をしても、木を見て森を見ずということになりかねない。高倍率観察の前に、まず試料の外観、成分の分布状態など概要を把握することが大切である。その点で、光学顕微鏡、走査電子顕微鏡を用いることは、試料の全体像を知ることができ有効である。光学顕微鏡についての解説はすでに本誌の講座^{1)~7)}で組織化学的な方法を中心に詳述されているので参照されたい。

本講座では、光学顕微鏡から一步すすめて、走査電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM) で食品を観察する際に必要な、ハード/ソフト両面の知識について解説する。まず本稿ではハード面から述べる。

2. 走査電子顕微鏡の種類

一口に走査電子顕微鏡といっても、その構造、機能などの特徴は様々で、多くの機種が上市されている。表1に食品の観察に適した走査電子顕微鏡の特徴についてまとめた。表に示した分け方は電子銃、加速電圧、

真空度、試料位置、試料台の違いに着目したものである。この中で、高分解能 SEM, 低加速 SEM と電界放出 SEM はハード面に特徴がある。クライオ SEM, 低加速 SEM と低真空 SEM はソフト面とのつながりが深い。試料作製法の詳細は次回にゆずりここでは概要にとどめる。

クライオ SEM は試料台の温度を -100°C 以下に冷却制御できることが特徴である。試料は化学的に固定することなく、凍結という物理的固定をした後、切断面を観察する。この方法では凍結切断後昇華、という凍結乾燥と同じ工程をとる場合もあるが、凍結乾燥法とは異なる結果が得られることが多い。

低加速 SEM は食品のような非導電性試料においても無蒸着観察ができるメリットがある。導電性のない試料では、導電性を付与するために、通常金属微粒子を蒸着あるいはコーティングする。その結果、金属粒子によって微小な構造が覆い隠されたり、元の試料にはない凹凸が現れたりすることもある。このようなことは高倍率観察では特に問題になり、できればこのような前処理は用いたくない。これを可能にしたのが低

表1. いろいろな走査電子顕微鏡

種 類	機能部位	特 徴
汎用 SEM	—	電子銃は熱電子放出型で、試料は対物レンズの下。高真空。高加速電圧。二次電子以外の専用検出器を装備すると、反射電子像、元素分析が可能。
電界放出 SEM	電子銃	電界放出 (Field Emission: FE) 型の電子銃を装備した SEM。電子銃部は 10^{-7} Pa 程度の高真空。高分解能。
高分解能 SEM	試料位置	試料が強励磁対物レンズ上下磁極の間 (インレンズ方式) に位置する SEM。高加速電圧。高分解能。
低加速 SEM	加速電圧	低加速電圧で観察できる SEM。非導電性試料の無蒸着観察が可能。
クライオ SEM	試料台 (温度)	低温に制御できる試料ステージを装備した SEM。凍結状態の観察が可能。
低真空 SEM	試料室 (真空度)	低真空試料室をもつ SEM。含水試料の観察が可能。試料台を冷却できるタイプもある。

* 雪印乳業(株)技術研究所

走査電子顕微鏡法 (1)

加速電圧による観察である。

低加速 SEM は単独の機種としては販売されていないが、加速電圧の仕様の一部として位置づけられる。

つぎに低真空 SEM は無コーティングの他にさらに脱水・乾燥という処理も不用になり、組織学研究者の究極的目的ともいえる“無処理観察”が可能になる。低真空 SEM は、試料室の真空度が 270 Pa 程度の低真空でも観察できることが特徴で、水を含んだ試料を、適当な大きさに細切するだけの操作で観察できる。

クライオ、低真空ともに食品のような水を多く含んだ試料が多い分野では、乾燥を必要としない観察法として貴重である。

標準の SEM は二次電子検出器を装備し、二次電子像を観察しているが、これとは別に専用の検出器を用いると、反射電子、特性 X 線などを検出でき、それぞれ特徴のある情報が得られる。特に、特性 X 線は電子線が試料に衝突する際に、元素に固有なエネルギーの X 線が放出されるので、試料の元素分析が可能になる。この検出器にはエネルギー分散型検出器 (EDS) または波長分散型検出器 (WDS) の二種がある。このような検出器を備えた元素分析の専用機器を電子プローブマイクロアナライザ (EPMA) または X 線マイクロアナライザ (XMA) という。

3. 走査電子顕微鏡の概要と構成

SEM は、我々が自然界の物を見るのと同じように物体の反射像として観察できる。この点は光学顕微鏡や透過電子顕微鏡の透過像とは異なり、像解釈が簡単であり、初心者にも理解しやすい。

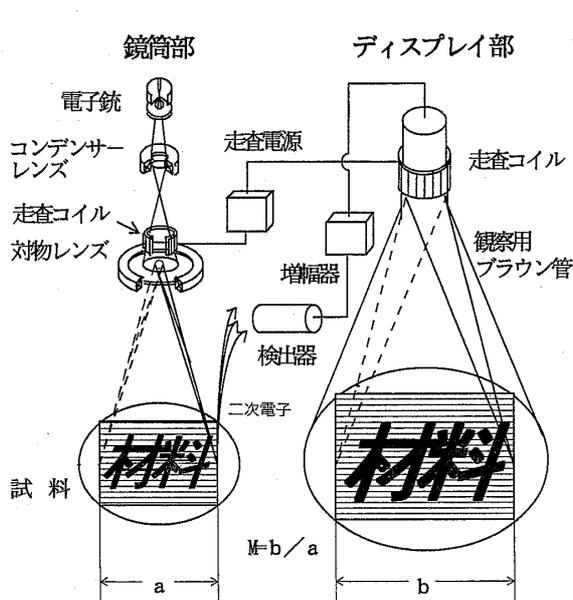


図 1. 走査電子顕微鏡の構成⁹⁾

図 1 に SEM の構成⁹⁾を示した。

SEM の「光源」は電子銃から発生する電子で、その原理は基本的には白熱電灯のそれと同様で、真空中のフィラメントに電流を流して抵抗加熱により熱電子を放出させ、高電圧により加速する。電子銃からでた熱電子（これを電子線、電子ビームあるいは電子プローブという）をコンデンサーレンズで集束し、走査コイルで、試料表面のある面積について線から面と逐次走査する。試料から発生した二次電子は、検出器の正に印加された電位に引かれて、蛍光塗料面に衝突して光に変換された後、光電子増倍管で電流に変換される。電流は増幅器で電圧に変換されたあとブラウン管で輝度変調され映像となる。これを写真撮影するか、デジタル信号として記録する。これが SEM の概要である。

観察倍率 (M) は電子線で走査した幅 a とブラウン管に写しだされた映像の幅 b との比で表される。

4. 固体表面からの二次電子の発生

試料に電子があたると、特性 X 線、カソードルミネッセンス、反射電子、二次電子などが発生する⁹⁾(図 2)。この蛍光のうち二次電子を主に利用するのが SEM である。

試料に電子が入射すると、電子は固体を構成する原子と衝突し、方向を変えながらエネルギーを失うまで散乱する。図 3 は固体内で電子が散乱する様子を示した¹⁰⁾もので、その範囲は洋ナシ形になる。SEM 像を形成する二次電子は試料表面のごく近く (10 nm 程度) から真空中に飛び出したもので、固体の内部で発生した二次電子は最終的には熱エネルギーに変換され結像に

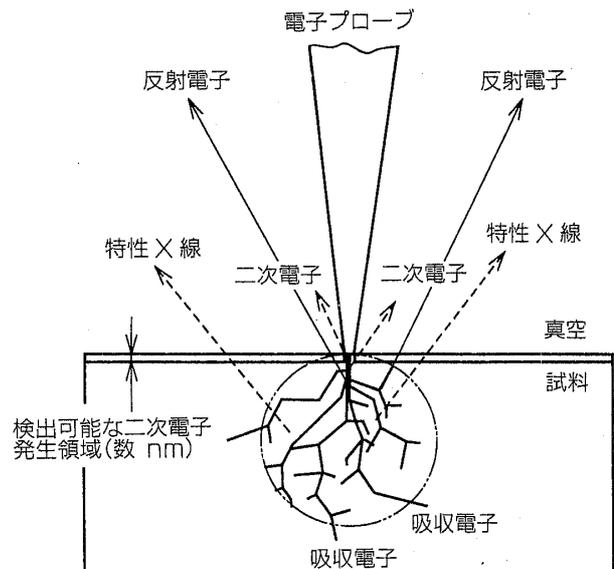
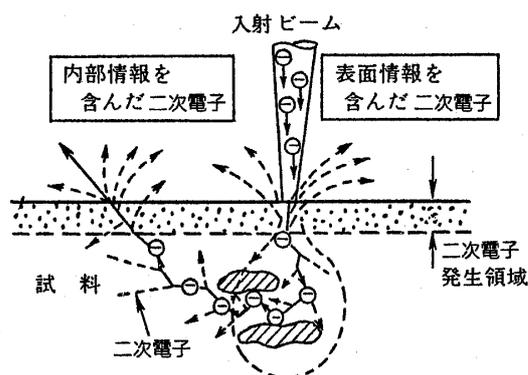


図 2. 電子と固体試料の相互作用による検出信号と発生領域の模式図⁹⁾

図3. 固体からの二次電子¹⁰⁾

関与しない。また、入射した電子の中でエネルギーを失って試料内部に吸収されるものを吸収電子という。(図2参照)。

図3中の左にある「内部情報を含んだ二次電子」というのは、加速電圧が高くなると“洋ナシ”の形が大きく広がり、入射電子が固体の内部まで進入し、その時発生する二次電子がつつぎと伝播し、電子が入射した位置から離れたところからも、二次電子が飛び出してくる。この二次電子は試料内部の情報を持っており、表面像と重なって内部の構造が透けて見える二重の映像となる。このような場合、表面構造だけを忠実に検出するには、加速電圧を下げて、電子線の試料内部への進入を少なくする必要がある。

また、加速電圧を高くすると、図3に示したように入射電子ビーム径よりも広い範囲から、二次電子が飛び出すことになり、分解能の低下をまねく。このため、SEMの加速電圧は透過電子顕微鏡のような100kV、200kVという高い値ではなく、30kVというの一般的な上限である¹¹⁾。

5. 走査電子顕微鏡のコントラスト

二次電子の発生する量は、電子線を照射する条件、試料の形状など種々の要因で変わる。二次電子の発生量が多ければ、その位置は明るい点として記録される。各位置の明るさ、すなわちコントラストの異なる点が線から面と連続することで像形成される。

二次電子の発生量は、試料表面のつぎの要因、①傾斜角効果、②エッジ効果、③構成元素、④表面電位、および、⑤走査電子顕微鏡の加速電圧などによって変化する。食品の観察に影響の大きい以下の3種について述べる。

i) 入射角効果

試料表面の凹凸は、電子線が試料に入射する角度を変化させることになる。入射角度の変化は二次電子の

発生効率に影響を及ぼす。二次電子の発生効率とは、試料に入射した電子と放出される二次電子の比をあらわす。図4aのように電子線が試料に垂直に入射したとき、二次電子発生量が最も少なくなる。一方、電子線が入射角 α で入射した(図4b)ときは、試料内部のある点Pを考えると、試料表面までの最短距離は、 $r \cos \alpha$ で入射した距離 r よりも表面との距離が短くなる。このため二次電子の発生量は、角度 α が大きくなるにしたがって、試料表面までの距離 $r \cos \alpha$ が短くなるので増加する。

つぎに、入射角効果によるコントラストの観察例を示す。

図5はグラニュー糖の粒子¹²⁾である。砂糖は単斜晶系の結晶で、グラニュー糖は多面体の粒子である。矢印で示した面はコントラストが高い。この面は電子線の入射角が大きく、二次電子の発生効率が増加したた

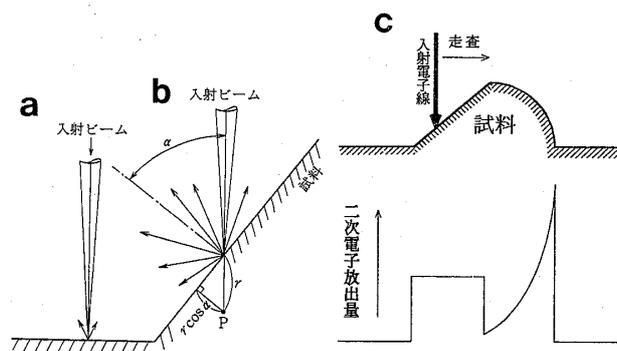
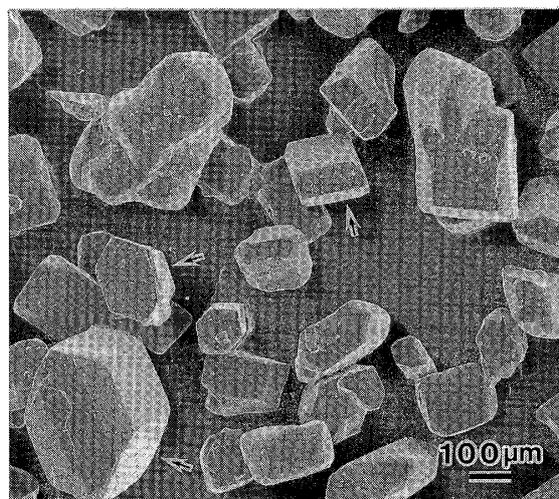


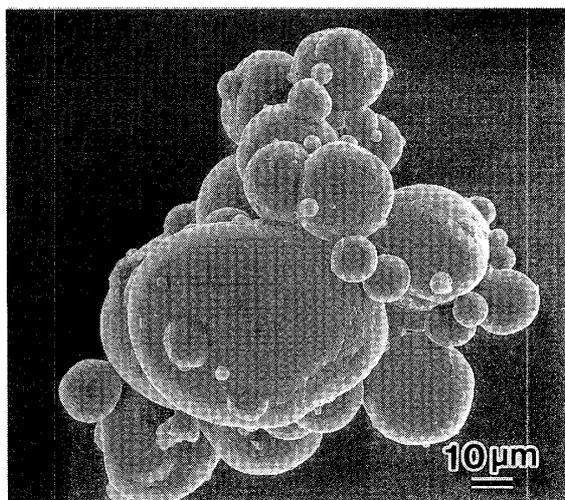
図4. 二次電子放出量の入射角依存性

(a)のような水平面より(b)(c)のように傾斜した面のほうが二次電子の放出が多く、その量は(c)のように変化する。

図5. グラニュー糖¹²⁾

矢印の面は入射ビームの傾斜角が大きいため、高コントラストになる。

走査電子顕微鏡法 (1)

図6. 全脂粉乳¹²⁾

粉乳粒子の輪郭部は入射ビームの傾斜角が最大になるので、輝いたような照明効果を得られる

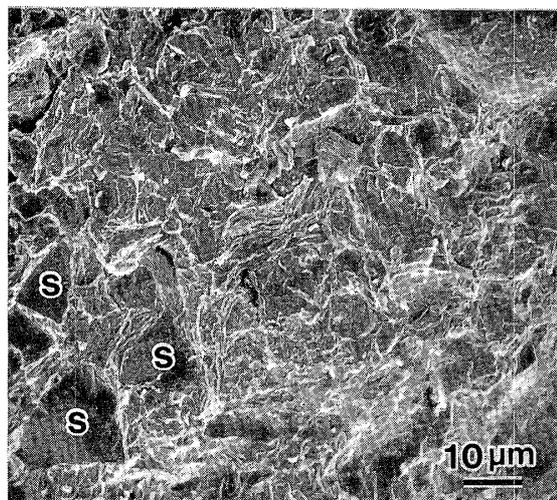
め、他の面に比べ明るく写しだされている。図6は噴霧乾燥した全脂粉乳¹²⁾で、球状の粒子が集合している。粒子の輪郭はコントラストが高く、中央部は低い。粒子の周辺部では、まわりから光を当てたように輝いて見える。これは図4cの断面が円形の右端部のような位置では、入射電子の角度が接線に近づき、二次電子の放出効率が極端に高くなるためである。一方、粉乳粒子の中央部では入射角が図4aのように直角に近くなるため、二次電子の放出量が少なくなり、コントラストは低下する。

このようにグラニュー糖のような均質な物質であっても異なるコントラストを示したり、粉乳粒子の例のように、自然界で物に光を当てて視る場合とは若干異なるSEM像独特の“照明効果”が得られていることに注意して像解釈をする必要がある。

ii) エッジ効果

入射ビームは図3で示したように試料の内部まで進入し、図中の洋梨のような形で拡散し二次電子が発生する。その範囲は加速電圧に依存し、高加速電圧では最も深いところで数 μm になる。試料の凹凸が鋭いエッジ状になった場合は、前項で述べたように電子線の入射角が大きくなると同時に、発生した二次電子の脱出面積も広がる。この場合、二次電子の発生効率は極端に大きくなる。これをエッジ効果といい、やや不自然なコントラストを生じる。

図7はエッジ効果の例で、チョコレートの凍結破断面を観察したものである¹²⁾。カカオ脂の破断面は、山脈の稜線を思わせる鋭いエッジが一面に広がり、その部位が高いコントラストで白い輪郭のようになっている。

図7. チョコレートの凍結破断面¹²⁾

カカオ脂破断面の突起部はエッジ効果で高コントラストになる。s: 砂糖粒子

。S字で示した平面部は砂糖粒子の断面である。

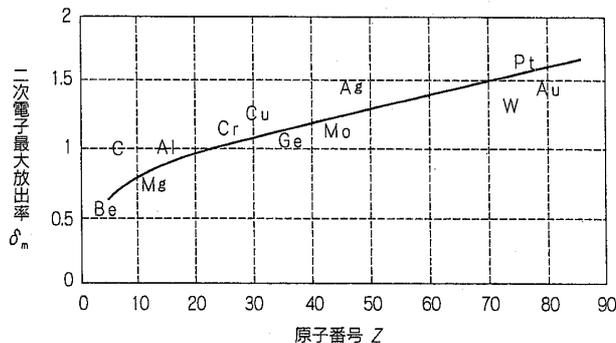
エッジ効果を減少させるには加速電圧を下げて、二次電子の発生領域を狭くする必要がある。

iii) 元素依存性

二次電子の発生効率は、電子線が入射した位置にある元素によっても変わる。二次電子の発生効率は、軽元素より重金属のほうが二次電子の発生が多くなる傾向があるが、原子番号に比例するわけではない。常用されている金属で最も効率のよい物質は金である⁹⁾(図8)。このような理由から、食品素材のような導電性のない試料では、二次電子発生効率の高い金(Au)や白金(Pt)を試料表面にコーティングあるいは蒸着し、コントラストを高める。

iv) 走査電子顕微鏡像のカラー表示

これまで述べたように二次電子像はコントラストの強弱として表現されるので、本質的には色の情報はもっていない。白黒像である。最近ではカラー化したSEM画像をみる機会も多いが、これらは二次的に着色したもので、試料本来の色を反映していない。その多くは

図8. 原子番号Zと二次電子放出率 σ_m の関係⁹⁾

コンピュータの画像処理技術を駆使したものであることが多い。例えば、コントラストによって分けられた階層のそれぞれに、着色したり、特定の部位を区切りその部位に任意の色を付加する。あるいは、白黒写真に直接エアブラシで絵の具を吹きつけ色彩化する。

最近、SEM像のカラー化として新しい試みがなされている^{13)~17)}。これはナチュラルカラーSEMと称するもので、SEM像に光学顕微鏡の色彩情報を表示する考え方で、SEMと光学顕微鏡の良い面を合わせもつ情報が得られる。

具体的には低真空SEMの鏡体中にビデオ顕微鏡を挿入し、同一視野をビデオ顕微鏡とSEMで観察し、ビデオ顕微鏡のデジタル信号から明度要素のハイライト成分を抽出し、SEM信号のハイライト成分と置き換える。これによりSEM像に光学顕微鏡から得た試料本来の色が付加された像が得られる¹⁷⁾。

食品のような多成分分散系試料の成分分布の測定という面から考えると、従来のSEM観察では、光学顕微鏡の組織化学的手法から得た結果を参考にしながら、主として形態だけから成分の判定をしてきた。この場合、類似の形状が混在した系では厳密な判別はできず推定に終わっていた。

今後、ナチュラルカラーSEMが常用されるようになれば、組織化学的手法を導入して試料作製を行うことにより、SEM像から直接成分の判定ができることになる。将来の発展が期待できる新しい顕微鏡である。

これまで述べた内容についてさらに詳しく知りたい読者は、末尾にしるした成書を参照されることをお勧めする。

文献

- 1) 星野忠彦：調理科学，**22**，47-57 (1989)
- 2) 星野忠彦：調理科学，**22**，183-189 (1989)

- 3) 星野忠彦：調理科学，**23**，24-32 (1990)
- 4) 星野忠彦：調理科学，**23**，234-241 (1990)
- 5) 星野忠彦：調理科学，**23**，348-354 (1990)
- 6) 星野忠彦：調理科学，**26**，68-77 (1993)
- 7) 田村咲江：日調科誌，**31**，157-160 (1998)
- 8) 吉田 明：材料科学，**34**，120-126 (1997)
- 9) 日本工業標準調査会：走査電子顕微鏡試験法通則，pp. 4-5，日本規格協会，(1997)
- 10) 黒田勝広：電子顕微鏡技術，外村 彰編，pp. 115-140 丸善 (1989)
- 11) 長谷川与一：走査電子顕微鏡，日本電子顕微鏡学会関東支部編，pp. 44-53，共立出版 (1976)
- 12) 種谷真一，木村利昭，相良康重：食品・そのミクロの世界，pp. 17-145，槇書店，(1991)
- 13) 小柏，於保，上代：日本電子顕微鏡学会第51回学術講演会予稿集，247 (1995)
- 14) 小柏，於保，上代：日本電子顕微鏡学会第52回学術講演会予稿集，153 (1996)
- 15) Oho E., Ogashiwa T.: SCANNING **18**，331-336 (1996)
- 16) 佐藤，於保：日本電子顕微鏡学会第54回学術講演会予稿集，171 (1998)
- 17) 鈴木，山田，伊東，於保，松島：日本電子顕微鏡学会第54回学術講演会予稿集，172 (1998)

電子顕微鏡関係の成書

- ・走査電子顕微鏡：日本電子顕微鏡学会関東支部編，共立出版，1976)
- ・医学・生物学のための走査電子顕微鏡入門，M. A. HAYAT 著，鈴木昭男，永谷 隆訳，丸善，(1979)
- ・図説走査電子顕微鏡：田中敬一，永谷 隆編集，朝倉書店 (1980)
- ・医学生物学の走査電子顕微鏡：医学・生物学電子顕微鏡技術研究会編，医学出版センター，(1992)
- ・電子顕微鏡の上手な使い方講座 I, II, III，日本電子顕微鏡学会電顕サマースクール実行委員会編，医学出版センター編，(1992)
- ・電子顕微鏡基礎技術と応用，1994~1997，日本電子顕微鏡学会電顕サマースクール実行委員会編，学際企画，