

「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」
平成 21 年度採択研究代表者

川田 善正

静岡大学工学部・教授

電子線励起微小光源による光ナノイメージング

§ 1. 研究実施の概要

本研究では、光を用いて生物試料を実時間で観察でき、10 ナノメートルの分解能をもつ光学顕微鏡を実現することを目的とし、実際にシステムを試作し、生きた生物試料を実時間で高分解能に観察するための技術開発および理論構築を行なうことを目的としている。

今年度は、電子線を照射することにより、高効率に発光する蛍光薄膜材料について検討した。無機材料として ZnO をスパッタにより、有機材料として電子線のシンチレータに使用される B498 材料をスピコート法で製膜し、薄膜化するための製膜条件を確立した。ZnO 材料では、電子線照射により発光することを確認するとともに、膜をアニーリングすることにより発光強度が 2-3 倍程度向上することを確認した。また、製膜条件による表面の平坦性を評価した。B498 材料では、キシレンに溶解させる濃度により、数 100nm の膜厚で製膜した。電子線照射により、ZnO に比べて 10 倍以上明るく発光することを確認しており、本システムに有望な材料であることを確認した。電子線照射による耐性についても検討した。

微小光励起システムの基本構成について検討した。これまでは、現有のタングステンを用いた走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて、基礎データを取得してきたが、本プロジェクトではより高分解能、より明るく制御性の良いシステムを実現するために、電界放出型 SEM (FE-SEM)を基礎システムとして導入することを検討した。基礎システムの選定のための検討、改良点の検討などを行ない、具体的なシステムの設計を検討した。導入するシステムを用いて基礎データを取得し、システムにフィードバックすることにより、10 ナノメートルの空間分解能を実現する。

生物試料のマニピュレーション法においては、電子線照射をするための SiN 薄膜上に、標準的な細胞を培養する条件を検討した。この基質は負に帯電しており、細胞膜に多く存在する陰性電荷を持つ分子との反発が起こり、接着しにくい。通常使われているポリリジンのような陽性電荷の分子を支持体の上にコーティングする方法においては、多少の改善が見られたが、不安定な結果であった。これに対して、基板に紫外線照射を施すと、多くの場合に細胞の接着性が総じて高まる

結果を得た。本手法により、細胞を SiN 上に培養する方法の可能性が見いだされた。

§ 2. 研究実施体制

(1)「静岡大学」グループ

① 研究分担グループ長:川田 善正(静岡大学、教授)

② 研究項目

- ・光電変換膜の作製・評価・高機能化
- ・微小光源励起システムの設計・作製・評価

(2)「浜松医科大学」グループ

① 研究分担グループ長:寺川 進(浜松医科大学、教授)

② 研究項目

- ・光ナノイメージングのための生物試料のマニピュレーション法の確立と評価

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する。)

本研究では、光を用いて生物試料を実時間で観察でき、10 ナノメートルの分解能を有する、光学顕微鏡を実現することを目的とし、実際にシステムを試作し、生きた生物試料を実時間で高分解能に観察するための技術開発および理論構築を行なうことを目的している。これらの目的を実現するために、次の研究項目を実施している。

○光電変換膜の作製・評価・高機能化

電子線照射により発光する材料として、無機材料および有機材料など多くの材料について可能性を検討した¹⁾。可能性の高い材料として ZnO について検討した。大気圧と真空を分離する基板として SiN 膜を利用することを考えているため、SiN 膜上への製膜状態について検討した。スパッタの際に導入するアルゴンガスの圧力を変化させて製膜し、膜の表面状態を観察した。図 1 にアルゴンガスの圧力を変化させてスパッタし、その表面状態を観察した結果を示す。観察範囲は 1mm x 1mm であり、アルゴンガス圧を 1.1Pa から 4.7Pa の間で変化させた。アルゴンガス圧を変化させてもあまり大きな変化は見られないが、ガス圧を高くすると粒状の形状が大きくなっている様子が観察できる。これらの材料に電子線を照射し、その発光特性を評価した。これらの基礎実験の結果から、スパッタ電力 40W、アルゴンガス圧 0.8-1.0Pa で製膜するのが最適条件であると判断した。

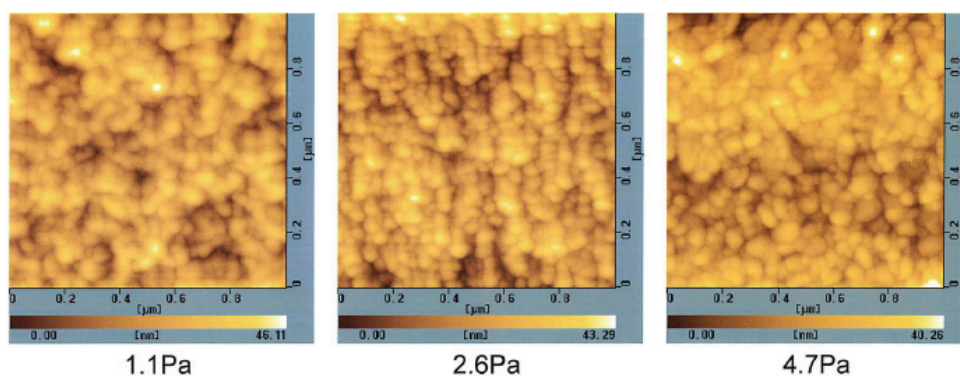
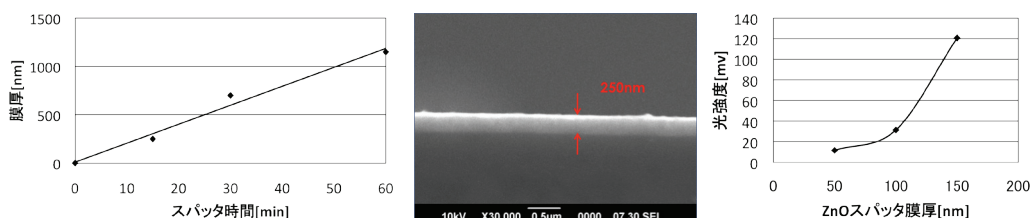


図 1. アルゴンガス圧の変化による ZnO スパッタ膜の変化

本研究で開発するシステムにおいて、より高い分解能を実現するためには、蛍光薄膜を薄くする必要がありますため、ZnO 薄膜化するための条件とその発光特性について検討した。図 2(a)に製膜条件と膜厚との関係、(b)に膜厚 250nm の膜の SEM による観察結果を示す。スパッタ時間を変化させることにより、線形的に膜厚が変化しており、時間制御のみで膜厚を制御できることを確認した。図 2(b)から厚みが一定の均一な膜が形成されていることが確認できる。

図 2(c)に、作製した薄膜に電子線を照射し、その発光強度を測定した結果を示す。この測定では、ZnO 薄膜を SEM 内に配置して電子線を照射し、発光強度を SEM の試料室内に設置した集光レンズおよび光電子増倍管で検出した²⁾。膜厚が大きくなるに従って発光強度が大きくなっている。膜厚が大きくなると電子線の散乱により空間分解能が低下すると予想されるため、信号強度と空間分解能のより詳細な評価が必要である。また、製膜した材料を 800 度で 1 時間アニーリングすることによって、発光波長が橙から緑に変化し、強度が 2-3 倍に増強することを確認した。

電子線励起により発光する材料として、電子線検出に用いられるシンチレータ材料 B498 の製膜条件についても検討した。B498 はスピコート法によって製膜できるため、表面の均一性の高い膜が形成できることが期待できる。有機材料である B498 でも濃度を制御することにより数 100nm の発光膜を作製でき、高い効率で発光することを確認した。電子線を照射することによって ZnO 膜よりも 10 倍以上高い効率で発光することを確認した。



(a) 製膜条件と膜厚との関係 (b) 250nm の ZnO 膜の製膜結果 (c) 電子線による発光強度

図 2. ZnO の薄膜化と電子線励起による発光

○微小光源励起システムの設計・作製・評価

電子線による微小光源を励起するための基礎システムを検討した。これまでの基礎データは、現有の電子源にタングステンによる熱電子放出を用いた走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて取得してきた。熱電子放出の電子源では、光源サイズが大きいため空間分解能が制限されるとともに、輝度をあげる点についても限界がある。本プロジェクトでは、10 ナノメートルの空間分解能を実現する基礎システムを作製する。高速に電子を走査するために、電界放出型 SEM(FE-SEM)を基礎システムに用いる。FE-SEM のステージ部分を改造し、蛍光薄膜および試料台、光検出部を設置するとともに、大気圧と真空を分離するための構成について設計・検討し、対応可能な機種を選定を行なった。

○光ナノイメージングのための生物試料のマニピュレーション法の確立と評価

電子線照射をするためのSiN薄膜上に、標準的な細胞を培養する条件を探った。この基質は負に帯電しており、細胞膜に存在する陰性電荷を持つ分子との反発が起こり、接着しにくい。通常使われているポリリジンのような陽性電荷の分子を支持体の上にコーティングする方法では、多少の改善が見られたが、不安定な結果であった。これに対して、基質に対する紫外線照射を施すと、表面電荷量が変化すると考えられ、多くの場合に細胞の接着性が総じて高まる結果を得た。紫外線の波長と照射時間に対して詰めを行っている。

また、電子顕微鏡的観察方法と光学顕微鏡的観察方法を融合させる際の課題として、電子線照射は真空中で、光学観察は一気圧の水中で行なう必要がある。この点を解決する可能性として、薄膜上に培養した細胞をイオン液体で覆って真空中に露出するという方法を検討している。イオン液体は、水や油に溶けず第三の液体と呼ばれ、真空中で蒸発しないという特徴を持つ。この液体の各種性質を調べ、細胞に毒性のないものを候補として選び出した。次期においてこれを入手し、実際の毒性の有無を調べる予定である。

さらに、電子線照射によってコントラストの高い光信号を得ることが、本計画の重要な点であるため、金のコロイドで標識する方法も試みた。金のナノパーティクルは、ナノメートルスケールのサイズでも暗視野光学顕微鏡で所在を確認する事ができる。電子線に対する吸収能は良く知られているので、本計画の中での標識として使える可能性があり、その応用準備を進めた。金ナノパーティクルを細胞の懸濁液に混ぜ、細胞の取り込みを調べた。これによって、少なくとも細胞内の標識としては使用できる事が分かった。抗体等を結合させ、細胞膜に標識する事が次の目標となる。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

- 1 E. V. A. Premalal, G. R. R. A. Kumara, R. M. G. Rajapakse, M. Shimomura, K. Murakami

and A. Konno(Shizuoka Univ.), “Tuning chemistry of CuSCN to enhance the performance of TiO₂/N719/CuSCN all-solid-state dye-sensitized solar cell,” Chem. Commun. DOI: 10.1039/B927336K (in press).

- 2 M. Tsuji, W. Inami, Y. Kawata(Shizuoka Univ.), “Fiber Confocal Microscope for Alignment-Free Readout System of Multilayered Optical Memory,” Jpn. J. Appl. Phys. (in press).