

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」

平成 18 年度採択研究代表者

永山 國昭

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

ns-nm 分解能の光子・電子ハイブリッド顕微鏡の開発

1. 研究実施の概要

1. 位相差電子顕微鏡の高度化と応用(岡崎、日本電子)

無損失位相板とピエゾ制御過熱位相板ホルダーの開発を行い、位相差法としての高度化を行った。無損失位相板は現在用いられている薄膜位相板の欠点である電子線損失を解決するために提案されているが、磁石型の開発は我々グループのみが行っている。実用に耐える極細線磁石作成のプロトコールが完成した。2008 年度は、プロトコールをもとに本格生産を行い 200kV 電頭とホログラフィーで性能テストを行い、応用研究を展開する。

2. パルス光電子顕微鏡による高分解能低温電子顕微鏡の開発(岡崎、つくば)

電子線損傷を軽減し、蛋白質 1 粒子解析法の分解能向上を目指し、パルス光電子を用いた高速パルス電子顕微鏡の開発を行っている。この実験はつくばにおいて行われ、光電子エミッター作製のための蒸着装置が完成した。2008 年度は、光電子エミッター作製を行い、これを 200kV 電子顕微鏡に装置し、パルス電子発生テストを行う。

3. 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発(岡崎、日本電子、浜松医大)

同一試料、同一視野を光頭と電頭で同時観察する装置の開発。日本電子から出向している大学院生を中心に浜松医大と協力して試作機作成と予備実験を行った。最終的には 1 台の電子顕微鏡が光頭・電頭を兼ねるが、予備実験では光頭染色が位相差電頭で観察可能かどうかをテストし、位相差法では光頭染色コントラストが電頭コントラストとなることを発見した。2008 年度は試作機を 120kV 電頭に装置し、光頭電頭同時観測のテストを行う。

4. 雰囲気試料室による Live TEM Imaging 法の開発(岡崎、日本電子)

生きた生物試料の高分解能時系列観察を行うため、雰囲気試料室の開発を行う計画はたてた

が、もっとも遅れており、遅れを取り戻すため世界で唯一生物間雰囲気試料室の開発と実験を行っている農工大箕田准教授とコンタクトをとった。2008 年度は箕田氏の岡崎グループの参加あり。

2. 研究実施内容

本 CREST で開発する電子光子ハイブリッド位相差顕微鏡の開発項目は、図1に示されるような電子顕微鏡の部分である。以下「1. 研究実施の概要」に述べた概要に従い平成 19 年度の研究実施内容を敷衍する。

要素技術

1. 位相板高度化および位相差ユニット
2. 電子・光子ハイブリッドレンズ
3. パルス光電子銃
4. 雰囲気試料室

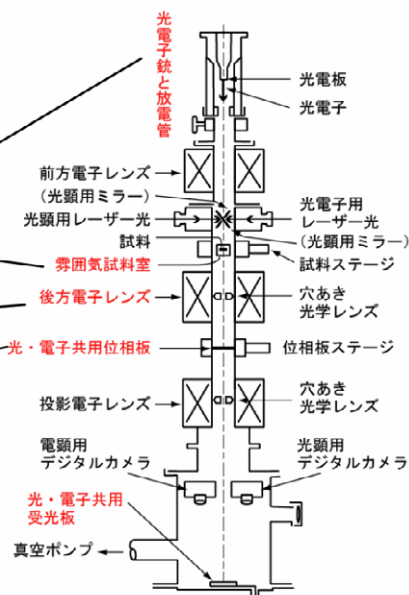


図1. 要素技術

1. 位相差電子顕微鏡の高度化と応用

a. 位相板を用いる電子顕微鏡の位相差法には図2に示す2種（ゼルニケ位相差法（図2a）、ヒルベルト微分法（図2b））がある。また位相板については、薄膜位相板を使う薄膜型と微小電極の静電ポテンシャルや微小磁石のベクトルポテンシャルを用いるポテンシャル型がある。薄膜型は、位相板の作成が容易なので、先行的に実現され

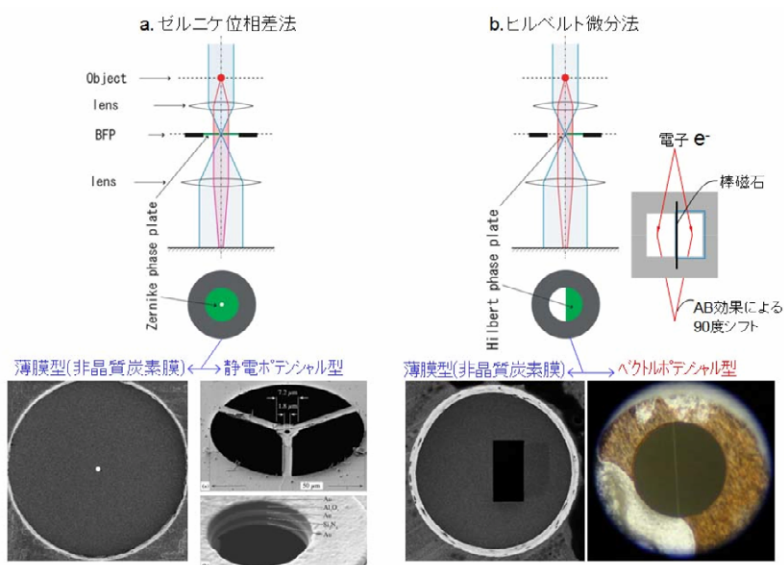


図2. 2種の位相差法と種々の位相板

たが、電子線損失のないポテンシャル型が次世代位相板として世界的に注目されている。日本以外（米、独、台湾）では図2a下段の静電ポテンシャル型の開発を行っているが、我々は日立の外村らが実証したベクトルポテンシャルによるAB効果の利用を考えた。予備的実験では、図2b下段

に示すような微小磁石を電子線ホログラフィー用バイプリズムを用いて作成したが、十分な微小化にいたらなかった。本 CREST では、微細加工技術の FIB (Focus Ion Beam) を用いて、微小磁石 $20\text{nm} \times 300\text{nm} \times 50\text{ }\mu\text{m}$ の作成を試みた。無垢の白金線 ($10\text{ }\mu\text{m}$) から出発して極細線磁石にいたる作成プロトコルがほぼ完成した。その結果、図 3a に示すような微小磁石 (ブレード端上に乗った 20nm 厚のニッケル薄膜) が作成できた。これを永久磁石化し、その両側を通る電子線に π の位相差を与えることを試みた。極細線磁石の左右の位相変化は、電子線ホログラフィーで計測され (図 3b)、長手方向に一樣な位相変化が見だされた。位相変化の計算結果 (図 3c) は多少のノイズはあるものの、左右がほぼ一樣でかつ両者の差が 0.7π という理想型を与えた。

b. ピエゾ制御過熱位相ホルダーの施策

高度な位置制御を行える新規の加熱型位相板ホルダーの開発を行った。テストは平成 20 年度に行う。

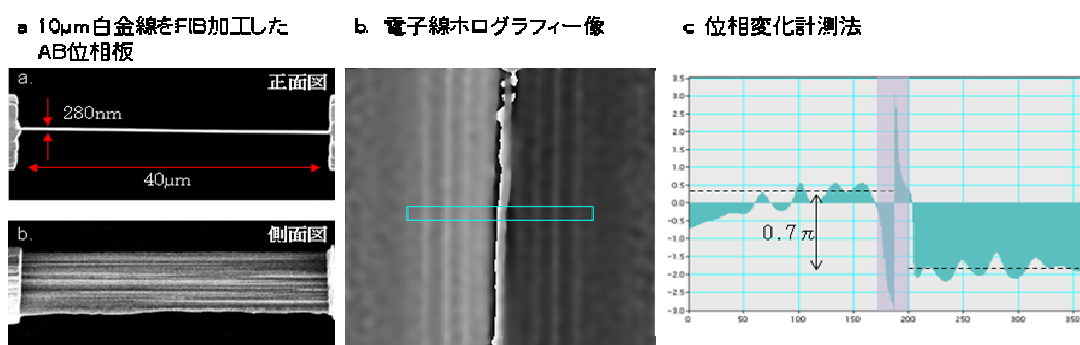


図 3. 磁石型位相板の構造と性能

2. パルス光電子顕微鏡による高分解能低温電子顕微鏡の開発

a. 光電子パルス電頭の試作

真空蒸着によってエミッター先端の微小領域にセシウムとアンチモンを付着させ、可視光に対する光電子発生効率 (量子効率) が極めて高いセシウムアンチモン (Cs_3Sb) 薄膜を形成させる装置の開発・製作を行った。 Cs_3Sb は酸素にさらされると量子効率が急速に低下して光電子を放出しなくなるため、エミッター先端部は常に超高真空中に置き、エミッター先端部を酸素 (空気) にさらすことなく蒸着装置から電子銃を取り出せるようにした。さらに、量子効率低下防止のため、エミッター先端部を冷却する工夫をした。

b. 電子銃の開発

真空蒸着により作られた Cs_3Sb エミッターを、TEM 用 200kV 電子銃に搭載するためにはペルチェ素子冷却が必要であり、高電圧絶縁の条件下で良好な熱伝達をするためにアルミナブロックを用いた構造を、またエミッター先端を Laser 照射するための反射鏡、レンズ部の設計・製作を行った。

3. 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発

a. 200kV TEM 装置に光学顕微鏡の光学系を組込み (図 4)、大気中でハイブリッド顕微鏡の性

能評価を行った。HEK293 細胞の樹脂包埋切片(300nm 厚、トルイジンブルー染色)の明視野観察、および $1\mu\text{m}$ ポリスチレン蛍光ビーズの蛍光観察を行った結果、ハイブリッド顕微鏡の光学系が正常に機能していることが確認できた。

ハイブリッド顕微鏡の対物レンズは 1 群レンズを用いているため、通常の光学顕微鏡による像と比較すると分解能とコントラストが低い、新規対物レンズを採用することで像質向上を図っている。また、照明光学系については、光量と照明範囲を適切に調節し、ケーラー照明法を採用した照明光学系設計、製作を行っている。

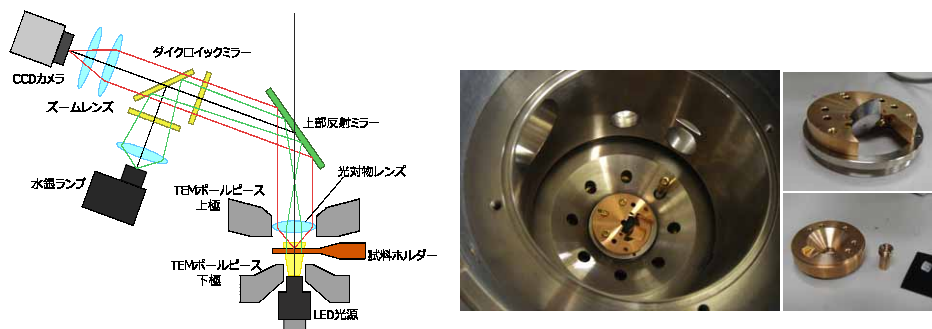


図 4. 左: ハイブリッド顕微鏡概略図 右: 光学系を組込んだ電顕内部および光学部品

ハイブリッド顕微鏡開発の予備実験として、同一試料の同一視野を電顕および光顕で観察した。HEK293 細胞、シアノバクテリアおよびラット肝臓組織について、トルイジンブルー染色、酢酸ウラン・クエン酸染色、および無染色の 300nm 厚樹脂包埋切片試料を作り、光顕および電顕下で観察した。まず光顕において明視野法、位相差法および微分干渉コントラスト法による観察を行い、それぞれの観察方法に対応するものとして、電顕において明視野法、ゼルニケ位相差法、およびヒルベルト微分コントラスト法による観察を行った。観察像を比較した結果、いずれの染色法の試料においても電顕像は光顕像に比べて高い分解能と高いコントラストが得られ、光顕の染色法が電顕観察法に有効であることが定性的に示された(図 5)。

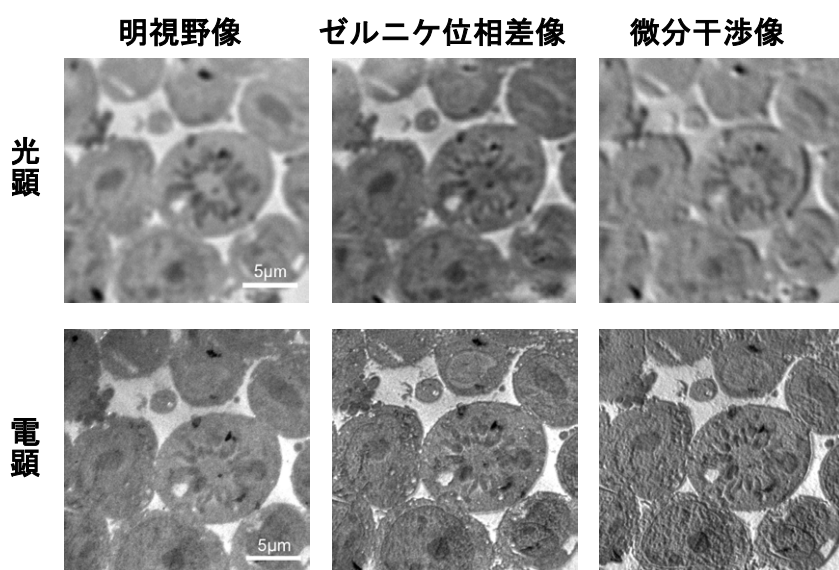


図 5. 300nm 厚 HEK293 細胞切片の光顕像—電顕像比較

4. 雰囲気試料による Live TEM Imaging 法の開発

具体的試験展開は平成 20 年度より行う。

3. 研究実施体制

(1)「岡崎統合バイオサイエンス」グループ

① 研究分担グループ長:永山 國昭(自然科学研究機構、教授)

② 研究項目

- ・ 光電子パルスによる電子線損傷低減法
- ・ 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発

(2)「日本電子」グループ

① 研究分担グループ長:大蔵 善博(日本電子株式会社、チームリーダー)

② 研究項目

- ・ 電子・光子ハイブリッドレンズ系の開発
- ・ 光電子銃の開発

(3)「物質・材料研究機構」グループ

① 研究分担グループ長:木本 高義(物質・材料研究機構、主席研究員)

② 研究項目

- ・ 光電子エミッターの開発