

「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創成」
平成19年度採択研究代表者

松尾 二郎

京都大学大学院工学研究科 附属量子理工学研究実験センター・准教授

ソフトナノマテリアル3D分子イメージング法の開発

§ 1. 研究実施の概要

本研究は、有機物や生体高分子などのソフトナノマテリアルを、高速重イオンによる電子励起を用いた2次イオン質量分析法により分子イメージングすることを目的としている。高速重イオンを用いる分子イメージング法は、固体内で核衝突をほとんど起さずに電子的に分子を脱離・イオン化させる原理に基づいており、これまで困難と考えられてきた原子衝突によるソフトなイオン化を実現する画期的な手法である。高速重イオン励起法による2次元分子イメージング法と有機物を破壊することなくエッチングする手法を有機的に組み合わせて、有機物や生体高分子などのソフトナノマテリアルの3D分子イメージング法を確立し、ナノ・バイオテクノロジー分野に画期的な評価手法を提供する。

2009年度は、2次イオン検出系を新たに開発し2000Pa程度の低真空でも2次イオン測定が可能な“wet-SIMS”装置を試作し、液体状態の揮発性分子のSIMSスペクトルの取得に成功した。さらに、基板上に培養した細胞1個の観察を行い、様々な脂質分子の質量イメージングを取得することが可能となった。また、クラスターイオン照射表面ダメージを詳細に調べ、XPSでもほとんど変化が見られないことを明らかにした。さらに、Arクラスターを用いた有機半導体薄膜の深さ方向分析法を確立し、本手法がC₆₀などよりも優れていることを示した。

§ 2. 研究実施体制

(1)「分子イメージング法の研究」グループ

- ① 研究分担グループ長:松尾 二郎(京都大学 准教授)
- ② 研究項目

高速重イオンを用いる分子イメージング装置に関するイオン種やエネルギーの探査

§ 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)

「3D 分子イメージング分析手法開発」

平成 20 年度から開発している o-ToF (orthogonal time of flight) を使った新しい 2 次イオン検出系を使い、様々なソフトナノマテリアル試料の測定をおこなった。

この新しく開発した 2 次イオン検出系は、

- 質量分解能が高い($M/\Delta M$: 5000 以上)。
- 入射イオンをパルス化する必要がなく計測時間の短縮が可能。
- 分析環境を高真空から低真空まで自由に設定でき、水分を含む試料の分析が可能。

などこれまでの 2 次イオン質量分析法にはない特徴を有しており、“Wet-SIMS”と命名した。

水を含む試料を観察するためには、水の水蒸気圧が 10°C で 1200Pa あるため、1000Pa 以上の低真空中に試料を設置した状態で分析を行うことが必要である。通常低速イオンをこの真空度で輸送することは困難であるが、高速重イオンを用いることにより低真空中でのイオン照射を可能にした。さらに、低真空下で発生させた 2 次イオンを効率的に検出するために、ガス流量やサンプリングクーンの形状などを工夫し、質量分析計との間に新たなインターフェイスを開発した。また、試料の移動をステップモーター駆動に変更し、組織切片など 1mm 以上の大きな試料の分析が可能となるように変更した。この手法を用いて、テストサンプルや組織切片や培養細胞など生命科学で用いられる実際の試料評価を行い^{4,5)}、本手法を生命科学に応用したときの課題抽出を行った。この装置の現段階での空間分解能は 30 μm であり改善が必要ではあるが、ラットの脳や脊髄などのイメージングをおこない、脂質やコレステロールのイメージングに成功した。さらに、直行型飛行時間質量分析計の持つ高い質量分解能の実現により、飽和度の異なる脂質の分布やアルカリ付加イオンの分布などの組織切片の詳細な情報を得ることができた。

静電型四重極レンズのシミュレーションを行い、収束精度を決定する要因について検討した。その結果、4 重極レンズ同士を 1 度以下の精度で 90 度に配置することがもっとも難しい部分であることが明らかになった。レンズ電極の加工精度、組み立て精度、収束電源の安定性などを考慮した静電型のダブルレットレンズを新たに設計、製作した。高精度の 3 次元測定器を使い、最終的な四重極レンズの精度を調べたところ、設計時に想定した精度内に納まっていることが分かった。ビームラインに組み込む部分の製作をおこない、イオンビームの収束特性を調べる。

「ソフトマテリアルエッチング技術」

低損傷エッチングを実現できるガスクラスターイオンを用いるとポリマーや有機半導体分子などのソフトマテリアルの深さ方向分析が可能となる。様々な材料の深さ分析を行い、これまで有機物の深さ分析に用いられてきた C_{60} イオンと比較して、ダメージが少ない、エッチング時の表面荒れ

が抑えられる、スパッタ率の変動がないなど優れた特徴を有していることを明らかにした^{9,10)}。光電子分光法やエリプソメーターを使ったポリマー表面のダメージ評価から、ダメージ層は 1nm 以下と極めて薄く C₆₀ のようにポリマー組成比の変化は見られなかった¹⁴⁾。さらに、加工条件を最適化することにより化学結合状態(ケミカルシフト)も照射前後でほとんど変化させることなくエッチング可能となった。2 次イオン質量分析法のプローブとしてだけでなく、光電子分光法のエッチングビームとしても有用なことが明らかとなり、化学結合状態を計測できる新しい光電子分光法として実用化していく。

表面分析装置に対応できる小型クラスターイオン源の製作を進め、100 μ A/cm² 以上のビーム電流量密度でビーム径を 30 μ m まで収束したビームを使い 2 次イオン像を取得した。さらに、可動式の分散制限アパチャーを追加することにより、数ミクロンまで収束可能であることがわかった。加工ビームだけでなくプローブビームとしての可能性を追求するとともに、ビームをさらに収束するための光学系の開発も進める。

「ナノ・バイオ材料分析プロトコール」

昨年度開発した培養細胞の急速凍結・切断乾燥法を用いて培養細胞1個の質量イメージングを行った。細胞内部を露呈させるために、Si 基板上に培養した細胞を別の Si 基板で挟み込みサンドイッチした試料を急速凍結し、その後 Si 基板を用いて細胞を劈開し内部を露呈させた^{4,13)}。このプロトコールで作成した培養細胞を蛍光顕微鏡法で観察したところ、細胞内部の小器官の構造や形態を維持したまま試料作成が可能であることが分かった(図-a)。開発したこのプロトコールでは、培養液由来のノイズを低減し細胞からのシグナルを妨害しないような様々な工夫を行った。

図-b,c,d に示した質量イメージング像は蛍光顕微鏡像と良く一致しており、細胞レベルの質量イメージングが可能であることがわかる。質量イメージング像を詳しく見ると蛍光像では観察されない2つに分裂した細胞の間からも2次イオンシグナルが観察されている。これは、蛍光像と2次イオン像の感度の違いによるものであると考えられる。SIMS法は最表面に敏感であり、表面数層程度の分子が存在しても検出することができるため、蛍光像では見えない少量の分子が表面に存在するだけでもシグナルとして十分検出できる感度を有している。フォスファチジルコリンやフォスファチジルイノシトールなど様々な脂質分子の2次イオン質量イメージングから、細胞中の特定の分子分布の計測が可能である。

さらに、ラットの組織切片中の生体高分子分布の予備的な観察をおこなった。組織切片を観察するためには、組織の固定法や切片化の方法、更には、脱水方法などの開発が必要である。ラットの脳、脊髄、筋肉などの組織を凍結し、マイクロームで数十ミクロンの厚みに切片化した試料を用いた。脂質分子のイメージングにより灰白質や白質の組成の違いなどが

確認された。さらに、生体組織の場合には水素原子付加イオンだけでなくアルカリ付加イオンも多く検出されることが明らかになった。イオン化ポテンシャルの低い Na や K などのアルカリ金属原子が組織内に多く含まれることや、細胞内と細胞外とで Na,K の比が異なることがデータ解析を複雑にしており、脂質のデータ解析を進めるためにはデータベースの作成なども必要となる。

これらの測定データは位置情報と質量情報をあわせて保存しているので数 Gbyte の膨大なデータとなるため、PCA などデータ解析手法の検討にも着手した。

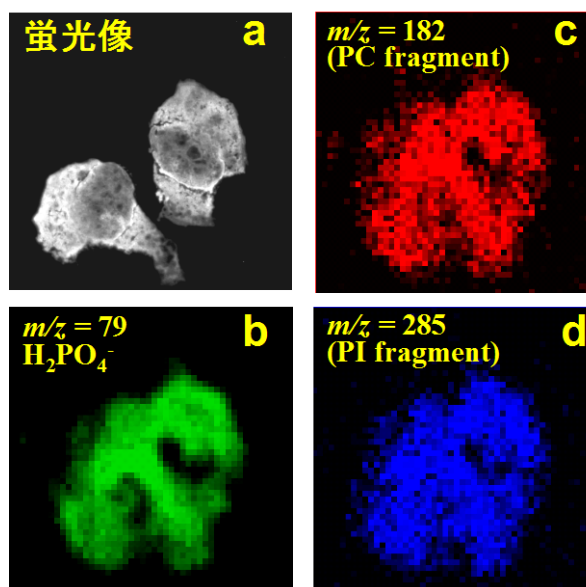


図 ラット 3T3 細胞の蛍光顕微鏡像(a)と質量イメージング像 (b) $m/z=79$ Da: リン酸イオン (c) $m/z=182$ Da: フォスファチジルコリンのフラグメントイオン (d) $m/z=285$ Da: フォスファチイノシトールのフラグメントイオン

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. S. Ninomiya, K. Ichiki, H. Yamada, Y. Nakata, T. Seki, T. Aoki, J. Matsuo,
“Precise and fast SIMS depth profiling of polymer materials with large Ar cluster ion beams”
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 23, pp.1601-1606 (2009, April)
2. T. Seki, T. Aoki and J. Matsuo,
“High-speed processing with Cl₂ cluster ion beam”
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 267, pp.1444-1446, (2009, May)
3. T. Aoki, T. Seki, S. Ninomiya, K. Ichiki and J. Matsuo
“Study of crater formation and sputtering process with large gas cluster impact by molecular dynamics simulations”
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 267, pp.1424-1427, (2009, May)
4. H. Yamada, K. Ichiki, Y. Nakata, S. Ninomiya, T. Seki, T. Aoki and J. Matsuo,
“A Processing Technique for Cell Surfaces Using Gas Cluster Ions for Imaging Mass Spectrometry”
Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan vol. 57, No. 3 pp.117-121, (2009, June)
5. Y. Nakata, H. Yamada, Y. Honda, S. Ninomiya, T. Seki, T. Aoki and J. Matsuo
“Imaging Mass Spectrometry with Nuclear Microprobes for Biological Applications”
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 267, pp. 2144-2148, (2009, June)
6. T. Seki
“Nano-processing with gas cluster ion beams”
Surface & Coatings Technology 203 Issues 17-18, pp. 2446-2451, (2009, June)
7. S. Ninomiya, K. Ichiki, T. Seki, T. Aoki, J. Matsuo,
“The emission process of secondary ions from solids bombarded with large gas cluster ions”,
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 267, pp. 2601-2604, (2009, Aug.)
8. T. Aoki, T. Seki and J. Matsuo
“Study of density effect of large gas cluster impact by molecular dynamics simulations”
Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 267, pp. 2999-3001, (2009, September)
9. S. Ninomiya, K. Ichiki, H. Yamada, Y. Nakata, T. Seki, T. Aoki and J. Matsuo
“Molecular depth profiling of multilayer structures of organic semiconductor materials by secondary ion mass spectrometry with large argon cluster ion beams”
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 23, pp. 3264-3268 (2009, September)
10. K. Ichiki, S. Ninomiya, T. Seki, T. Aoki and J. Matsuo
“Sputtering Yield Measurements with Size-selected Gas Cluster Ion Beams”
MRS Symposium Proceedings (2009 MRS Spring Meetings) Vol. 1181-DD13-25, (2009)

11. J. L. Lee S. Ninomiya, J. Matsuo, I. S. Gilmore, M. P. Seah, A. G. Shard
“Organic depth profiling of a nanostructured delta layer reference material using large argon cluster ions”
Anal Chem. 2010 Jan 1;82(1): pp98-105.
12. S. Ninomiya, K. Ichiki, H. Yamada, Y. Nakata, T. Seki, T. Aoki, J. Matsuo,
“SIMS Depth Profiling of Organic Materials with Ar Cluster Ion Beam”,
Transactions of the Materials Research Society of Japan, (2009), (accepted)
13. T. Aoki, T. Seki and J. Matsuo
“Molecular dynamics simulations for gas cluster ion beam processes”
Vacuum, 84, (2010), Pages 994-998
14. H. Yamada, K. Ichiki, Y. Nakata, S. Ninomiya, T. Seki, T. Aoki, J. Matsuo,
“Processing Techniques of Biomaterials: Using Gas Cluster Ion Beam for Imaging Mass Spectrometry”,
Transactions of the Materials Research Society of Japan, (2009), (accepted)
15. M. Hada, S. Ibuki, S. Ninomiya, T. Seki, T. Aoki, J. Matsuo,
“Evaluation of Damage Layer in an Organic Film with Irradiation of Energetic Ion Beams”,
Japanese Journal of Applied Physics Japan, 49 (2010) pp. 036503_1-5
16. M. Hada and J. Matsuo
“Development of femtosecond X-ray source in helium atmosphere with millijoule high-repetition-rate femtosecond laser”
Transactions of the MRS-J 34 [4] pp. 621-626 (2009)
17. M. Hada and J. Matsuo
“Effects of ambient pressure on Cu K α X-ray radiation with millijoule and high-repetition-rate femtosecond laser”
Applied Physics B, (2010) 99, pp. 173-179