

平成30年6月7日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K17469

研究課題名(和文) ウイルスの生きたまま観察も可能とする手法、及びそれを実現するためのDLC膜の開発

研究課題名(英文) The suggestion of the method and development of the DLC film to observe living viruses.

研究代表者

上月 具拳 (Kozuki, Tomotaka)

広島国際大学・保健医療学部・講師

研究者番号：50352026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：電子顕微鏡により含有試料を観察するためのチャンバを作製した。このチャンバに大気と含水試料をセットすることで、電子顕微鏡による含水試料の大気中観察を目指した。電子透過膜にはプラスマイオン注入法により成膜したDLC(Diamond-like Carbon)を用いた。本実験では膜厚50nm、サイズ50 μm ×50 μm の電子透過膜を使用した。電子線が与える酵母菌へのダメージの影響については、作製したチャンバに酵母菌と培養液をセットし、加速電圧5kVの電子線を照射することで評価した。その結果、電子線を5分照射しても分裂の機能を失わない酵母菌が多数存在することが確認できた。

研究成果の概要(英文)：We manufactured the containers to observe the wet sample by the electron microscope. We aimed at the observation of the sample in the atmosphere by putting air and a sample in these containers. We used DLC(Diamond-like Carbon) for the electronic transmission films. By the experiment, as for the film thickness, 50nm, the size used electronic transmission films of 50 μm ×50 μm . We tested it about the damage that the electron beam gave to the yeast funguses. We set the yeast funguses and culture fluid in the chamber and irradiated the electron beams of acceleration voltage 5kV. We irradiated the yeast funguses with the electron beams for five minutes. A lot of yeast funguses which did not lose the function of division existed.

研究分野：薄膜

キーワード：DLC ウイルス 電子顕微鏡 大気中

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスなどのごく一部のウイルスを除いて、ほとんどのウイルス(HIVウイルス、がんウイルスなど)に対する特効薬は開発されていない。この理由として、

- (1) ウイルスはタンパク質(ヘマグルチニンなど)から成る核に覆われているため、人の細胞表面(糖タンパク質)を破壊せず、ウイルスだけを破壊することが難しい。
- (2) 観察には走査型電子顕微鏡(SEM)などが使われるが、生きたまま(活性化状態)のウイルスを観察することは非常に困難であり、ウイルスの動きの全容を知ることができない。

などが挙げられる。(2)の影響もあり、近年SEMにて生体試料を生きたまま観察する技術が注目され、界面活性剤を試料に塗布する(ナノスーツ)ことにより高真空下にて生きたままの昆虫の幼虫観察を可能にする研究や、電子透過膜として窒化シリコン(SiN)を用いることで、大気圧下で生体試料の観察を目指す(加速電圧は数十 keV)研究がおこなわれている。

我々は、電子透過膜を用いた大気圧下での試料観察の研究を応用することで、大気圧下で生きたままウイルスなどの非常に小さなサンプル(体長:数百 nm)を観察できる可能性を見出した。以下が研究計画を進める上で我々が得た予備的な研究結果である。

- (1) ダイヤモンドライクカーボン(DLC)がSiNよりも電子透過率に優れていること発見(図1)した。
- (2) 膜中における電子の散乱がDLCの方が少ないため、DLC膜を電子透過膜として用いた方が分解能が高くなることを発見した。
- (3) 電子透過膜としてDLCを用いることで、超低加速電圧(5keV)にて大気圧下で酵母菌(体長:約3μm)を観察することに成功した(図2、3)。

2. 研究の目的

最終目標は、ウイルスを生きたまま観察するための技術開発(分解能:数nm)、および、DLCの新しい利用分野の開拓である。本研究では、

- (1) DLCの成膜方法の違いによる電子透過膜の評価および電子透過膜のサイズと膜厚の最適化
- (2) 生体試料を大気圧下で観察するための試料ホルダーの試作
- (3) 生体試料及ぼす電子線ダメージの影響について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DLCの成膜方法の違いによる電子透過膜の評価および電子透過膜のサイズと膜厚の最適化

電子透過膜として性能の高い膜は、膜内における電子の散乱が少なく、高分解能で画像を取得できる膜である。我々は、RF(高周波)プラズマCVD(科学的気相成長)法及びプラズマイオン注入成膜法の2種類の成膜方法にてDLC膜を作製し、電子透過膜としての性能を評価した。また、電子の透過率を上げるためには、できる限り電子透過膜を薄くすることが有効である。一方、電子透過膜は真空と大気の圧力差や、電子線の連続照射によるダメージに耐えるための強度が必要となるため、電子透過膜のサイズと膜厚の最適化を行った。

(2) 生体試料を大気圧下で観察するための試料ホルダーの試作

図2のように、観察はSEMの試料室に電子透過膜を備えた専用の試料ホルダーをセットすることで行った。この時、電子透過膜と試料の間にギャップが生じると、大気中における電子散乱のため、著しく分解能が低下し、ウイルスなどの非常に小さな試料(体長:数百nm)を観察することが困難となる。これを防ぐため、電子透過膜と試料を密着させることのできる試料ホルダーの作製を試みた。ま

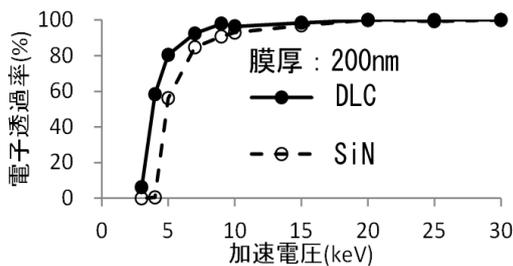


図1 DLCとSiNの電子透過率

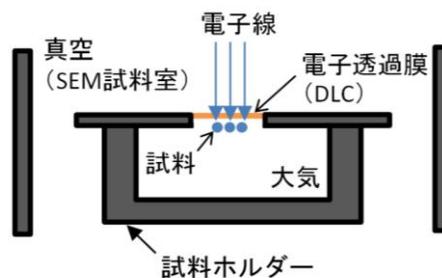


図2 酵母菌の観察イメージ

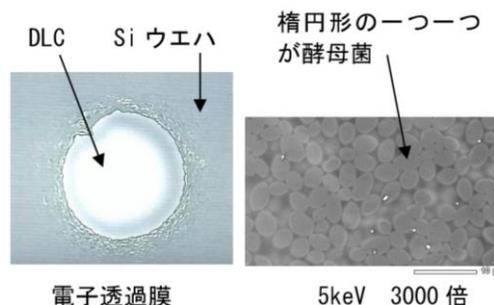


図3 電子透過膜と酵母菌観察

た、分解能の評価には、モンテカルロシミュレーションを用いた。シミュレーションでは図2に示す電子線を99000個の電子と仮定し、電子の加速電圧は5keVおよび10keVとした。

(3) 生体試料に及ぼす電子線ダメージの影響

当初の計画では、大気中にセットした酵母菌が分裂する様子をSEM (5keVの加速電圧)で観察する予定であった。しかし、分裂に最適な温度管理等をSEMチャンバ内で行うことが困難であった。そのため、電子線が試料に与えるダメージの評価に変更した。酵母菌が電子線照射により死滅、もしくは分裂の機能を失う変異を受けた場合、観察後に取り出し再度培養してもコロニーは形成されない。そこで、実験方法を

- ①作製したチャンバに酵母菌と培養液をセットし、5keVの電子線を照射(0分、1分、3分、5分)する。
- ②電子線を照射した酵母菌と培養液を回収し、寒天培地内で3日間25°Cの温度で培養する。
- ③それぞれの電子線照射時間におけるコロ

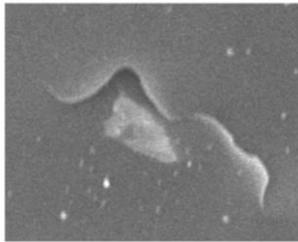


図4 エッチング時に起こる電子透過膜のひび割れ

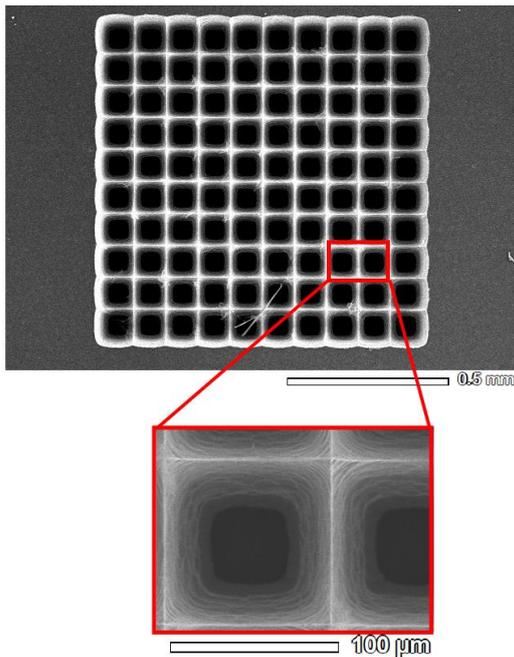


図5 評価に用いた電子透過膜

ニー数をカウント、無処理と比較する。に変更し実験をおこなった。

4. 研究成果

- (1) DLCの成膜方法の違いによる電子透過膜の評価および電子透過膜のサイズと膜厚の最適化

Si ウェハ上にRFプラズマCVD法及びプラズマイオン注入成膜法による異なる成膜方法にてDLCを成膜した。

その後、電子線が透過する領域をSiエッチングすることで、電子透過膜を作製した。

RFプラズマCVD法によるものは、エッチング時にほとんどの膜にひびが入り(図4)、電子透過膜の製造方法としては不向きであることが確認できた。これは、成膜時に起こる内部応力の影響が大きいと考えられる。一方、プラズマイオン注入成膜法によるものは、2種類の膜厚(200nm, 50nm)のものを作製した。本方法は内部応力を緩和するため、成膜ガスにトルエンを用いた。電子線が透過する領域(開口サイズ)は、1区画200μm、150μm、100μm、50μm角とし各々10×10区画並ぶように電子透過膜を作製した(図5)。

図6はSiエッチング時における電子透過膜の歩留まり率と開口サイズの関係を示したものである。電子透過膜の開口サイズが1区画50μm角の場合と比較し200μm角ではひび割れが生じる確率が高い。広い視野を必要とする場合、開口のサイズを大きくする必要はあるが、本研究ではウイルスのような非常に小さい(全長200nm以下)ものを観察することを目的としているため、50μm角の開口サイズで十分である。

さらに、電子透過膜の電子線に対する耐久性について評価するため、膜厚50nmの電子透過膜に30keVの加速電圧の電子線を30分間照射した。その結果、電子透過膜は破損しないことを確認した。

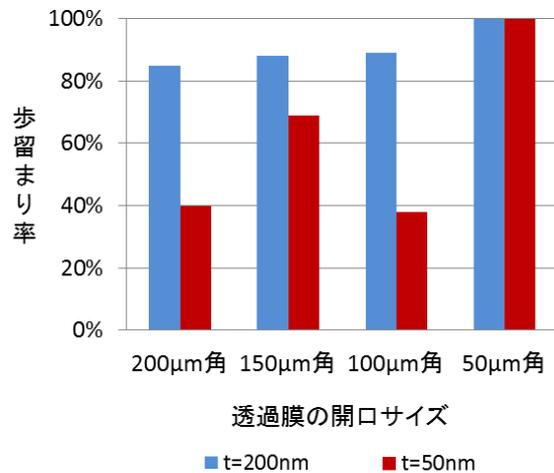


図6 電子透過膜の歩留まり率と開口サイズの関係

(2) 生体試料を大気圧下で観察するための試料ホルダーの試作

大気密封型の試料ホルダーを作製した(図7)。電子透過膜を上部に取り付けることができるよう、 $\phi 3\text{mm}$ の穴をあけた。

図8に分解能を評価するためのモンテカルロシミュレーションの結果を示す。また、試料にはライン状の仮想細胞をセットし、電子透過膜(膜厚 $50\mu\text{m}$)と試料間の水の厚さ変化が取得画像の分解能に及ぼす影響を評価した。加速電圧を 5keV 、電子透過膜と試料間の水の厚さ 100nm 、 500nm 、 $1\mu\text{m}$ としたシミュレーション結果を図8(a)~(c)に示す。水の厚さが 500nm までは加速電圧 5keV で仮想細胞の像は確認できるが、水の厚さを $1\mu\text{m}$ にすると仮想細胞の像を観察することが出来なかった。図8(d)は加速電圧を 10keV 、水の厚さを $1\mu\text{m}$ としたものである。この場合、ようやく電子を検出することができるが、像として確認することは難しい。このように、水中における電子散乱は分解能に大きな影響を与えることが分かる。

次に、試作した図7のホルダーに水溶液を含ませた酵母菌をセットし生体試料が観察可能か検討した。実験結果を図9(a)(b)に示す。シミュレーションと同様、水溶液の量が多いと電子散乱が大きくなり、酵母菌からの2次電子を検出することは困難であった。また、完全に水分が蒸発した場合でも酵母菌が凝集し1つ1つの形状を確認しにくかった。この結果からウェットな試料を観察するには、水溶液を適度な量に調整するなどの工夫が必要であることが分かった。水溶液の量を適度に調整する方法については、現在も検討中である。

(3) 生体試料が及ぼす電子線ダメージの影響

電子線を照射した酵母菌を寒天培地により 25°C の温度で3日間培養した。図10、図11に 10^6 倍に希釈した酵母水溶液のコロニーとコロニー数をカウントした箱ひげ図を示す。5分間電子線を照射したものは、形成されたコロニー数はわずかに少なくなったが、希釈前の形成数を計算すると、いずれも桁は同じであるため、誤差範囲である。すなわち、 5keV の電子線を5分間照射しても、分裂の機能を失わない酵母菌は多数存在し、電子線を照射する前と比較しても、分裂の能力は失わ

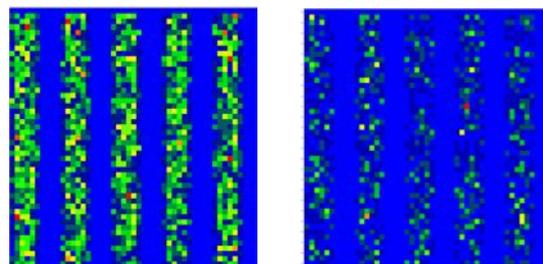


図7 大気密封型試料ホルダー

れないと推測される。

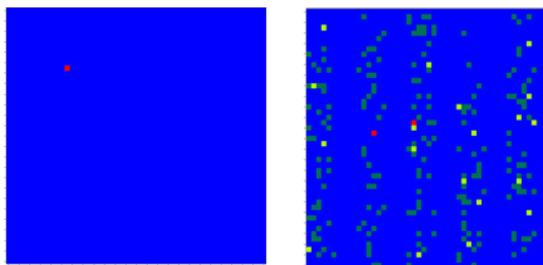
(4) まとめ

以上をまとめると、①ウイルスを生きのまま観察するためには、 SiN よりも電子透過率の高いDLCのほうが電子透過膜に適している。②プラズマイオン注入成膜法で形成したDLCは、内部応力が少なく破損しにくい。③電子透過性、耐久性の評価から透過膜の膜厚は 50nm 、サイズは $50\mu\text{m}$ 角が最適である。④水による電子線の散乱が激しいため、水溶液の量を調整する必要がある。現在この解決には至っておらず、現在も検討中である。⑤ 5keV の電子線を5分間酵母菌に照射しても、分裂の機能を失うことはなかった。



(a) $5\text{keV}_{100\text{nm}}$

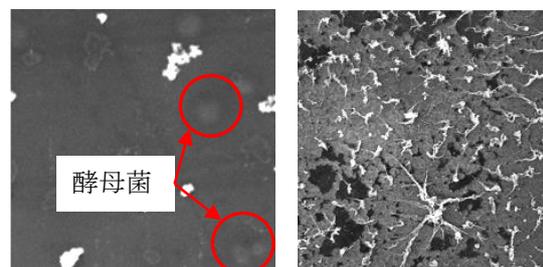
(b) $5\text{keV}_{500\text{nm}}$



(c) $5\text{keV}_{1\mu\text{m}}$

(d) $10\text{keV}_{1\mu\text{m}}$

図8 水による電子線の散乱の影響



(a) 水溶液が多く観察 (b) 乾燥し凝縮した
が困難な酵母菌 酵母菌

図9 SEMで観察した酵母

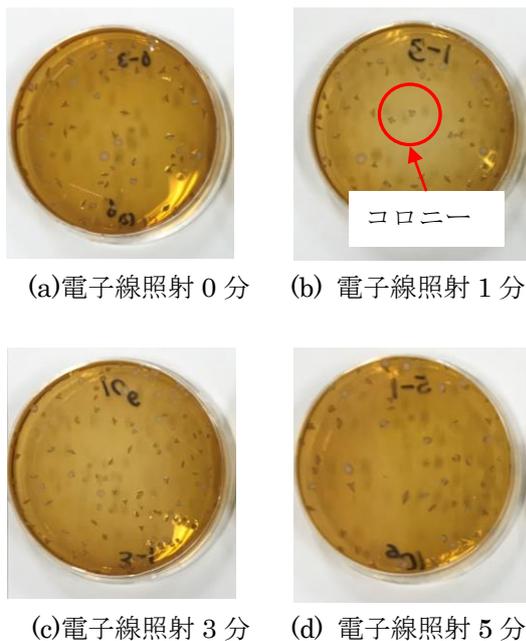


図 10 観察されたコロニーの様子

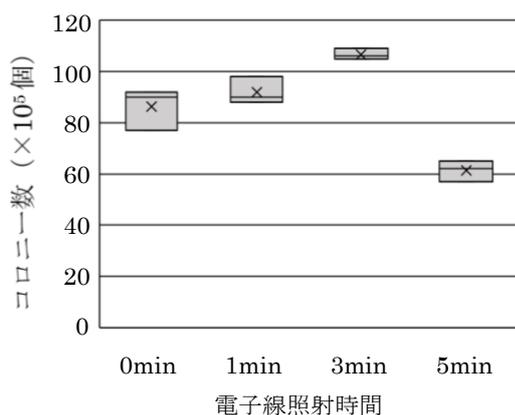


図 11 電子照射時間とコロニー数

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

①上月 具举、縄稚 典生、塩野 忠彦、ウイルスの生きたまま観察を実現するための DLC の電子線に対する耐久性評価、第 64 回応用物理学会春季学術講演会、2017 年 3 月 16 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

②上本 翔、門脇 正和、木村 亮太、縄稚 典生、塩野 忠彦、上月 具举、ウイルスの生きたまま観察を実現するための DLC の特性評価および取得画像の評価、第 76 回応用物理学会秋季学術講演会、2015 年 9 月 14 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：電子透過膜及びその製造方法
 発明者：縄稚典生、山本晃、本多正英、筒本隆博、菅博、上月具举
 権利者：広島県、学校法人常翔学園
 種類：特許
 番号：特許第 5339584 号
 取得年月日：平成 25 年 8 月 16 日
 国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上月 具举 (KOZUKI, Tomotaka)
 広島国際大学・保健医療学部医療技術学科・講師
 研究者番号：50352026

(2) 研究協力者

菅 博 (SUGA, Hiroshi)
 大阪工業大学・名誉教授

小寺 正敏 (KOTERA, Masatoshi)
 大阪工業大学大学院・電気電子機械工学専攻・教授

縄稚 典生 (NAWACHI, Norio)
 広島県立総合技術研究所・西部工業技術センター加工技術研究部・部長

塩野 忠彦 (SHIONO, Tadahiko)
 広島県立総合技術研究所・食品工業技術センター食品加工研究部・主任研究員

松下 修司 (MATSUSHITA, Shuji)
 広島県立総合技術研究所・西部工業技術センター技術支援部・主任研究員