

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03471

研究課題名(和文) 生体試料の元素分布非破壊可視化技術の開発

研究課題名(英文) Development of non-destructive elemental-analysis technique for biological samples

研究代表者

阿保 智 (Abo, Satoshi)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：60379310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体試料の元素分布をナノメートル分解能で非破壊三次元可視化する技術を開発した。計測には、弾性反跳粒子検出法(ERD)とラザフォード後方散乱法(RBS)の同時計測を用いた。ERDは軽元素に対して、RBSは重元素に対して感度が高いため、生体主成分の軽元素と微量重元素の高感度検出を両立可能である。高い深さ分解能を実現するため、散乱イオンのエネルギー計測には飛行時間を用いた。複数の検出器を同時に用いることで1時間程度の短時間計測で元素分布を非破壊で計測可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イオンビームを用いた計測技術は、これまで主として半導体材料の評価に用いられてきた。本研究は、この計測技術を汎用化し、生体試料の計測を可能にすることを目的として研究を行った。構成されている元素の種類が非常に少なく、特定の元素のみを高感度に計測する半導体とは異なり、様々な元素で構成されている生体試料では軽元素から重元素までを同時に計測する必要がある。また、計測により試料構造が容易に変化する生体試料を非破壊で計測することも非常に重要である。本研究では、これらが実現可能な計測技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：A non-destructive elemental-analysis technique for three-dimensional structures in biological samples with nanometer resolution has been developed. Elastic recoil detection (ERD) and Rutherford backscattering (RBS) were used simultaneously for the measurement. ERD and RBS are sensitive to light and heavy elements, respectively. Therefore, both major light elements and trace amounts of heavy elements in biological samples can be detected high sensitivity. To obtain high depth resolution, time-of-flight was used to measure the energy of scattered ions. The elemental distribution can be measured non-destructively in a short measurement time of approximately one hour by using multiple detectors.

研究分野：量子ビーム工学

キーワード：元素分析 非破壊計測 イオンビーム分析 生体試料

1. 研究開始当初の背景

生物学の発展のためには、生態の様々な器官やそこに取り込まれるタンパク質などの元素分布の動的挙動を評価する必要がある。生体試料の元素分析には、燃焼法、イオンビームによるSIMS(二次イオン質量分析法)、PIXE(粒子線励起X線放出)、電子ビームによるEDX(エネルギー分散型X線分析)などが一般的に用いられる。燃焼法は、試料を雰囲気ガス中で燃焼するため破壊分析法に該当し、また、元素の3次元的な分布を得ることは原理的に不可能である。SIMSは、マイクロビームを用いることで面内分解も可能であるが、試料はスパッタにより破壊される。PIXEやEDXはプローブビームが入射した領域の元素を同定する手法であり、マイクロ・ナノビームを用いることで二次元的な元素分布の計測は可能であるが、深さ分布の計測は不可能である。電子ビームやイオンビームを真空から取り出し大気中の試料を評価する手法も確立されているが、大気中EDXではバックグラウンドが大きく元素の同定が難しいこと、大気中PIXEでは大気中に取り出すことが可能な高エネルギーイオンビームをナノメートルまで集束できないことが問題である。

試料形状の観察方法としては、光学顕微鏡によるマイクロメートルオーダーでの観察や凍結乾燥後のSEM(走査型電子顕微鏡)によるナノメートルオーダーでの観察が一般的に用いられている。これらの場合には、基本的には試料の表面形状のみが観察可能である。

以上のことから生物学や農学、医歯薬学の発展には、生体試料を破壊せずにナノメートル分解能で3次元的に元素分析する手法の開発が急務である。

2. 研究の目的

生体試料の非破壊元素分布計測のためには、

- 水素・酸素・炭素などの軽元素が主成分である生体試料の元素検出が可能であること
- カルシウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウムなどの微量重元素を高感度検出が可能であること
- 短時間計測が可能であること
- 計測中に生体試料の破損が発生しないこと

が重要である。

本研究では、生体試料のナノメートル分解能での非破壊3次元元素分析手法の開発を目的にした。

3. 研究の方法

ナノメートル分解能で3次元元素分析を行うためには、ナノメートルまで絞ったプローブによる計測が必要である。ナノメートルのプローブとしては、電子ビームやイオンビームが考えられるが、電子ビームによる元素分析(EDX)では、深さ分解が出来ないことを考え、本研究では集束イオンビームを用いた。イオンビームを用いた元素分析には、SIMS、PIXE、RBS(ラザフォード後方散乱法)、ERD(弾性反跳粒子検出法)などがあるが、本研究では、重元素に対して高感度なRBSと軽元素に対して高感度なERDを組み合わせると同時に計測を行い、全元素での元素分析を実現した。RBSやERDでは、入射イオンと試料原子が弾性散乱し、後方散乱もしくは弾性反跳した粒子のエネルギーを計測することで、試料元素と元素の深さを同定する手法である。RBSやERDの元素分解能と深さ分解能は、検出器のエネルギー分解能によって決定する。通常のRBSとERDで用いられる半導体検出器では、深さ分解能が20nm以上となるため、本研究では、散乱イオンのエネルギー分析に(TOF)飛行時間を用い、深さ分解能10nm以下を目指した。短時間計測のため、プローブビームのエネルギーを下げ、散乱断面積を向上させた。また、散乱イオンの検出に半導体検出器よりも大型のマイクロチャンネルプレート(MCP)を複数用いることでも計測時間を短縮した。

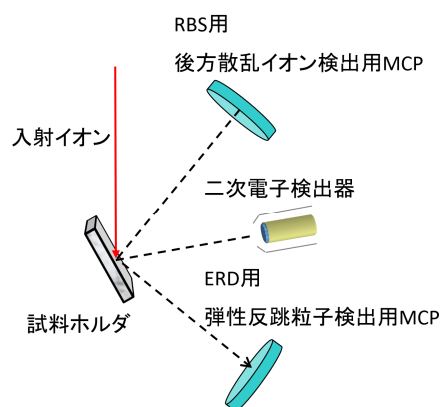


図1 本研究で用いた検出器の配置

図1に本研究で用いた検出器の配置図を示す。試料に入射したことで発生する二次電子を高速二次電子検出器で計測し、TOF計測のスタートシグナルに用いた。試料からの散乱イオンは、それぞれの散乱角に設置したMCPで検出し、TOF計測のストップシグナルに用いた。

本研究では、現有の10nmにまで集束可能な150keV集束イオンビーム(FIB)装置を用いて、主に以下の3点を行った。

複数のMCPと二次電子検出器が互いに干渉しない配置を実現可能な計測用真空チャンバーの設計・作製

ERD計測のため試料を大きく傾斜可能なゴニオステージを設計・作製

作製した真空チャンバーとゴニオステージを用いて、RBSによる重元素計測、ERDによる軽元素計測の検証と分解能の評価

4. 研究成果

複数のMCPと二次電子検出器が互いに干渉しない配置を実現可能な計測用真空チャンバーの設計・作製

TOF-RBSと**TOF-ERD**の散乱断面積、散乱イオンのエネルギー・飛行時間、元素の深さ同定に用いる阻止能は、使用するプローブイオンの種類、エネルギー、散乱角に大きく依存する。しかし、これらは互いに影響を及ぼすため、個々の条件だけを考えた場合の最適値を用いることは出来ない。例えば、エネルギー分解能を向上させるため、散乱イオンの飛行距離を大きくすると、検出器の立体角が小さくなり収量が減少する。また、計測の時間ウィンドウを大きくする必要があり、入射粒子数を減らすことに繋がるため、短時間計測の実現が不可能になる。短時間計測を考えて、散乱イオンの飛行距離を小さくすると、エネルギー分解能が足りず、元素分離や深さ分布の同定が難しくなる。実際には、これらの理論的な条件のみではなく、真空チャンバー内で、検出器同士や試料ホルダが互いに干渉しない条件で、これらの設置を行う必要がある。これらを考慮して、**TOF-RBS**では、MCPを飛行距離**140 mm**、散乱角**125°**の位置に、また、**TOF-ERD**では、MCPを飛行距離**300 mm**、散乱角**60°**に位置に設置することが良いことがわかった。

この条件で**150 keV Be⁺**をプローブイオンに用いた場合の散乱イオンの散乱断面積と飛行時間を図2, 3に示す。**TOF-ERD**で原子番号**14番 Si**までの計測を行うと考えると、この領域では**TOF-RBS**と比較して、**TOF-ERD**の散乱断面積が**1桁程度大きくRBS**で計測が難しい軽元素の計測が可能であることがわかる。また、飛行時間の点では、**TOF-ERD**で軽元素、**TOF-RBS**で重元素を計測することで、時間ウィンドウを**1000 ns**以下に設定可能である。さらに、検出器を複数用いることで、短時間計測が可能である。

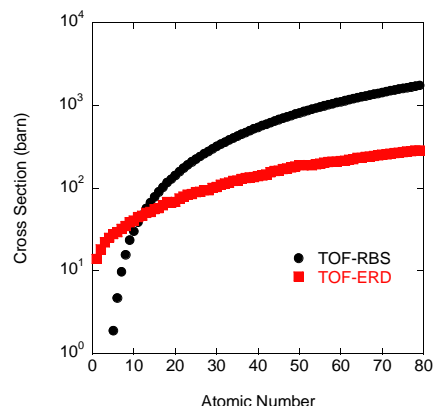


図2 TOF-RBSとTOF-ERD計測での検出器の立体角も考慮した散乱断面積

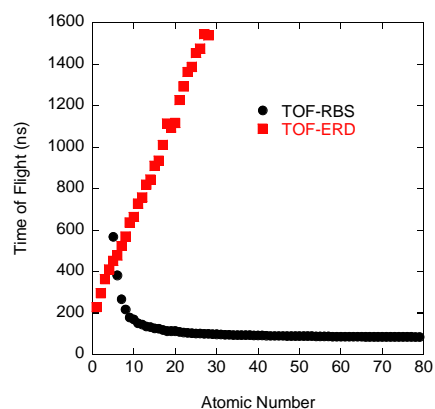


図3 TOF-RBSとTOF-ERD計測での散乱イオンの試料から検出器までの飛行時間

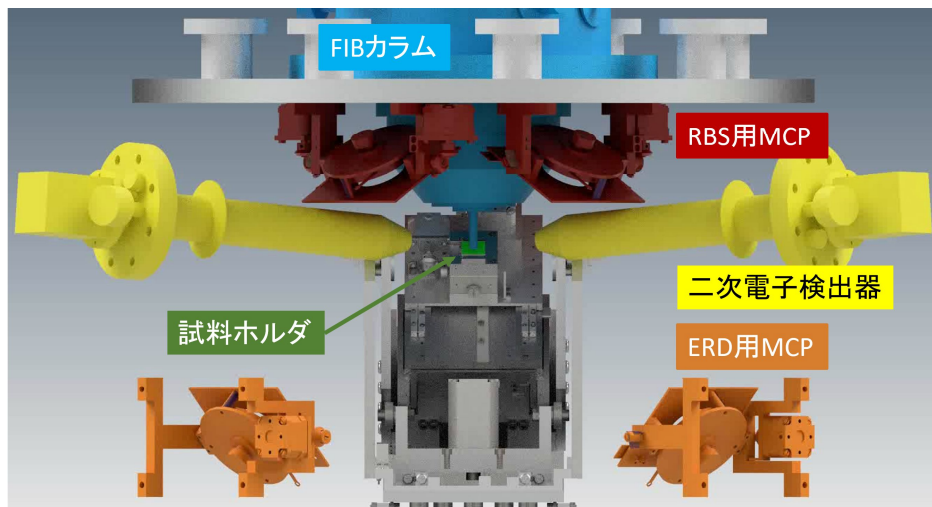


図4 設計したゴニオステージおよび検出器の配置

ERD 計測のため試料を大きく傾斜可能なゴニオステージを設計・作製

で考えた検出器に干渉しない構造で、大きく傾斜が可能な 5 軸ゴニオステージを以下の方針に従って設計した。

ゴニオステージによってプローブイオンの照射位置まで試料を移動させるため、**X, Y, Z** 方向にはマイクロメートル以下の位置精度が必要である。また、本計測技術を生体試料のみではなく、結晶性評価などへも拡張することを考えると **Tx, Ty** については 0.1° 程度の分解能と位置再現性が必要である。この分解能を実現した上で、**Ty** 方向を 45° まで傾斜可能な構造が必要である。

真空チャンパー外側から回転導入器や直線導入器を用いて制御する方法では、計測に必要な位置再現性の達成が不可能であったため、超高真空チャンパー内にステッピングモーターを導入し、これらにより制御する方式にした。**X, Y, Z, Tx, Ty** の 5 軸を完全に独立して制御可能である。

図 4 に設計した真空チャンパー内の検出器およびゴニオステージの配置を示す。複数の検出器と傾斜状態のゴニオステージが互いに干渉していないことがわかる。この構造の検出器ホルダ・ゴニオステージ・真空チャンパーを作製し、既存の 150 keV-FIB に組み込んだ。

作製した真空チャンパーとゴニオステージを用いて、RBS による重元素計測、ERD による軽元素計測の検証と分解能の評価

Au 薄膜堆積試料を用いて TOF-RBS の動作検証を行った。この計測では、ゴニオステージを傾けず、試料に対して垂直にプローブイオンを入射している。図 5 に Au 薄膜堆積試料の TOF-RBS スペクトルを示す。150 keV の Be⁺ をプローブイオンとして用いている。ゴニオステージや検出器の配置が変わったことで、分解能の悪化が懸念されたが、従来と同様の TOF-RBS 計測が可能であること、また、従来と同様に、試料ホルダに数十 V の電圧を印加することで時間分解能が向上することを示した[1, 2]。

次に、B 注入 Si 試料を用い、ゴニオステージを 45° まで傾斜させた状態で、TOF-ERD 計測を行った。ゴニオステージを傾斜させることで、二次電子の発生効率や軌道が変化し、二次電子検出器での検出効率や時間分解能悪化の可能性があった。TOF-ERD 計測では、注入 B に起因するピークが検出できた。しかし、試料に対して検出器を垂直に設置した状態では、B のピークは非常にブロードであり時間分解能は 10 ns 以上と非常に大きかった。これは、本研究では短時間計測のために大型の MCP を用いているため、TOF-ERD の散乱角が 60°±4° と拡がりを持っていることが原因である。試料の組成により、検出器の設置角を変えることで時間分解能の改善が可能であることを示した。

また、今回用いた試料は、いずれも大気曝露後であっても再度真空中に導入することで、同様の計測が可能であり、これは本計測技術により軽元素から重元素までの非破壊計測が可能であることを示している。

以上により、軽元素から重元素までの全元素の非破壊三次元可視化が可能であることを示した。

参考文献

- [1] S. Abo, Y. Hamada, A. Seidl, F. Wakaya, M. Takai, Nucl. Instr. Meth. Phys. B 348 (2015) 29-33.
- [2] S. Abo, A. Seidl, F. Wakaya, M. Takai, Nucl. Instr. Meth. Phys. B 456 (2019) 12-15.

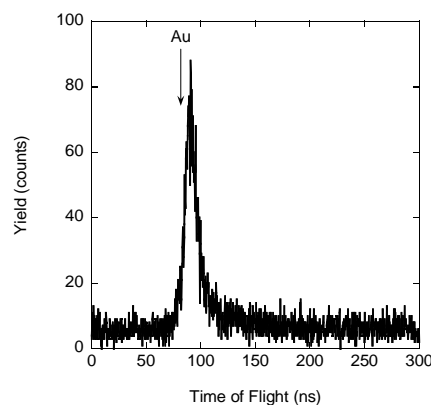


図 5 Au 薄膜堆積試料の TOF-RBS スペクトル
(試料ホルダ印加電圧：80 V)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abo Satoshi, Seidl Albert, Wakaya Fujio, Takai Mikio	4. 巻 456
2. 論文標題 Tertiary electrons in single-event time-of-flight Rutherford backscattering spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms	6. 最初と最後の頁 12 ~ 15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nimb.2019.06.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Seidl Albert, Abo Satoshi, Takai Mikio	4. 巻 450
2. 論文標題 Simulation of fine focus time-of-flight Rutherford backscattering spectrometry using TRIM backscattering data	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms	6. 最初と最後の頁 163 ~ 167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nimb.2018.06.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Satoshi Abo, Kenichi Tani, Fujio Wakaya, Shinobu Onoda, Yuji Miyato, Hayato Yamashita, Masayuki Abe	4. 巻 1844
2. 論文標題 Measurement of the Lateral Charge Distribution in Silicon Generated by High-Energy Ion Incidence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of 22nd International Conference on Ion Implantation Technology, IEEE-CFP	6. 最初と最後の頁 156 ~ 159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Satoshi Abo, Kenichi Tani, Fujio Wakaya, Shinobu Onoda
2. 発表標題 Lateral Charge Distribution in Si by High-Energy Ion Incidence
3. 学会等名 30th Annual Meeting of MRS-J（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Abo, Takuya Fujimoto, Fujio Wakaya
2. 発表標題 Development of ToF-RBS and -ERDA simultaneous measurements with 150 kV FIB
3. 学会等名 24th International Conference on Ion Beam Analysis (IBA2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿保智, 藤元拓哉, 若家富士男
2. 発表標題 集束イオンビーム装置でのToF-RBSとERDAの同時計測法の開発
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Abo, Albert Seidl, Fujio Wakaya
2. 発表標題 Nondestructive analysis technique by ion scattering spectroscopy using 150 kV FIB
3. 学会等名 29th Annual Meeting of MRS-J (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿保 智, 若家 富士男, 高井 幹夫
2. 発表標題 イオン散乱法を用いた非破壊三次元元素分析技術
3. 学会等名 日本学術振興会 第158委員会 第131回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Satoshi Abo, Albert Seidl, Fujio Wakaya, Mikio Takai
2. 発表標題 Tertiary electrons in single-event time-of-flight Rutherford backscattering spectrometry
3. 学会等名 16th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Abo, Kenichi Tani, Fujio Wakaya, Shinobu Onoda, Yuji Miyato, Hayato Yamashita, Masayuki Abe
2. 発表標題 Measurement of charge distribution in silicon generated by high energy ion incidence
3. 学会等名 22nd International Conference on Ion Implantation Technology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿保 智
2. 発表標題 シングルイベント飛行時間型ラザフォード後方散乱法による非破壊三時現元素分析技術の開発
3. 学会等名 日本学術振興会 第132委員会 第233回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿保 智、谷 憲一、若家 富士男、小野田 忍、山下 隼人、宮戸 祐治、阿部 真之
2. 発表標題 高エネルギーイオン入射によるSiでの生成電荷分布計測(II)
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	若家 富士男 (Wakaya Fujio) (60240454)	大阪大学・基礎工学研究科・准教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	マクテブルグステンダル応用科学大学		