

令和 4 年 8 月 31 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22442

研究課題名(和文)超高分解能赤外線スペクトル顕微鏡の開発

研究課題名(英文)Development of ultra-high resolution infrared spectrum microscope

研究代表者

小椋 俊彦(Ogura, Toshihiko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：70371028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、薄膜に入射した走査電子線により放出される赤外線等を用いた走査電子赤外線顕微鏡の開発を行った。走査電子顕微鏡の内部は、真空であるため、耐圧性の高い薄膜により試料を封入することが必須となる。本研究では、生物試料や有機材料を2枚の窒化シリコン薄膜で挟み込み密閉し、薄膜上部に電子線を走査させながら入射させる。これにより、電子線照射位置では局所的な熱スポットが生じ、ここから赤外線を含む様々な物理線が放出される。こうした物理線をサンプルを透過させた後に検出することで画像化を行う。本システムにより、有機材料等の観察を行い、さらに熱によるインピーダンス変化の分析も可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生物試料や有機材料等の高分解能での観察を行うため、薄膜上部の金属層に電子線を走査させながら入射し、ここから生じる赤外線等を試料を透過させた後に検出し、画像化する新たな顕微鏡システムを開発した。これにより、電子線を直接試料に照射すること無く、電子線から変換されたより低ダメージの物理線で観察を行うため、極めて低いダメージで観察が可能である。さらに、電子線の直接照射に比べてコントラストが高く、スペクトル成分の分析も可能とした。そのため、本観察システムでは、溶液中の生物試料や有機材料、ナノ粒子等の直接観察と分析が可能となり、広範囲の産業分野への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, a scanning electron infrared microscope was developed using infrared and other radiation emitted by scanning electron beams incident on a thin film. As the inside of the scanning electron microscope is a vacuum, it is essential to encapsulate the sample with a highly pressure-resistant thin film. In this study, a biological sample or organic material is sealed between two silicon nitride thin films, and electron beams are injected into the upper part of the thin films while scanning. This creates a local heat spot at the electron beam irradiation position, from which various physical rays, including infrared rays, are emitted. These physical rays are transmitted through the sample and then detected to produce an image. This system enables observation of organic materials, etc., and also enables analysis of thermal impedance changes.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：窒化シリコン薄膜 走査電子顕微鏡 赤外線 インピーダンス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで溶液中の生物試料を染色や固定化处理なしに高分解能で観察する方法の開発を行ってきた。これまで細胞を生きたまま観察し、その内部構造をナノメートルの分解能で分析することは極めて困難であった。通常の光学顕微鏡では光の回折限界により、分解能が約 200 nm に制限され、ナノレベルの高分解能での観察は困難である。一方、電子顕微鏡は、1 nm 以下の分解能を有しているが、装置内部を真空にする必要があり、溶液中の生物試料をそのまま観察することは出来ない。さらに、電子線が生物試料に照射されると電子線損傷が生じる問題がある。そのため、現在においても細胞を生きたそのままの状態を観察することは非常に困難である。我々の目標は、生きたそのままの細胞を染色処理や固定化处理なしにナノレベルで観察し、その組成を解析することにある。

### 2. 研究の目的

細胞やバクテリア等の生物サンプルは、主にタンパク質や脂質で構成されており、電子線や X 線に弱く、そのままの生きた状態でダメージ無くナノレベルで観察することは極めて困難である。そのため、細胞内部の構造変化を染色処理や固定化处理なしにナノレベルで観察し、その組成を直接分析する新たな方法が渴望されている(参考文献 1 - 3)。本研究提案では、こうした学术界や産業界の要望に応えるため、従来にない新たな原理に基づく簡便で高分解能な赤外線等を用いた観察・分析システムを開発する。本装置を用いることで、細胞の増殖や分化、ガン化のメカニズム、シナプス増強、薬品による標的タンパク質やその複合体の構造変化、ウイルスやバクテリアの感染メカニズムの解明をナノレベルの分解能で観察し組成分析をも可能とする。本提案の方法は、生物試料の観察だけでなく、セラミック材料や有機材料、食品や化粧品等のナノ粒子の観察と組成分析、さらには環境中のナノレベルの汚染物質の解析にも応用が可能であり、波及効果は極めて広範囲・多岐に渡る。

### 3. 研究の方法

本研究提案では、溶液中の生物試料や有機材料を 2 枚の窒化シリコン薄膜で挟み込み密閉する。上部の窒化シリコン薄膜には、金属薄膜が積層されており、ここに集束した電子線を走査させながら入射させる。電子線照射位置では局所的な熱スポット等が生じ、ここから赤外線を含む様々な物理線が放出される。こうした赤外線等を薄膜直下のサンプルを透過させた後に検出器により検出することで画像化を行う。例えば、電子線による熱の赤外線は、2 ~ 6  $\mu\text{m}$  の波長にブロードに広がっており、生物試料中のタンパク質や脂質等の有機物の種類により赤外線の吸収が大きく異なる。そのため、赤外線フィルターを用いて分光することで、複数の赤外線波長による画像を撮像し、スペクトル成分を分析することが可能となる。照射する電子線の直径は 3 nm と極めて小さいため、熱発生スポットの直径も 10 nm 以下に絞ることが可能である。そのため、赤外線等の観察画像の分解能も 10 nm 程度となり、従来の赤外線顕微鏡よりも極めて高い分解能を達成することが可能となる。また、電子線の電流量を増やすことで、高輝度の熱スポットとすることができ、高感度観察が可能となる。一方、電子線は走査されるため、熱発生スポット等は比較的早く薄膜上を移動し、熱によるサンプルのダメージを抑えることができる。本研究提案の 3 年間で電子線を用いた微小領域からの赤外線等の検出方法の確立とスペクトル分析の先導的実験方法の確立、さらにはこれまで開発を行ってきた走査電子誘電率顕微鏡との同時観察を行う。

### 4. 研究成果

(1) 本研究提案で開発した走査電子赤外線顕微鏡では、走査電子線による熱を観察試料に間接的に照射することで観察を行う。溶液中の生物試料や有機材料等は、2 枚の窒化シリコン薄膜で挟み込み密閉する。ホルダ上部の窒化シリコン薄膜には、金属薄膜層が形成されており、ここに集束した電子線を走査させながら入射させる。電子線照射位置では局所的な熱スポットが生じ、ここから赤外線が放出される。この赤外線を薄膜直下のサンプルを透過させた後に検出することで画像化を行う。初年度は、走査電子顕微鏡内へ赤外線センサーを導入し、電子線入射に伴う金属・窒化シリコン薄膜からの赤外線の検出し画像化の原理検証システムの開発を行った。赤外線センサーは、波長が 2 ~ 6  $\mu\text{m}$  まで高感度検出が可能な InAsSb 光起電力素子を使用し、これに超高感度かつ高帯域の初段アンプを独自に設計することで、高感度・広帯域の観察システムを開発した。さらに、窒化シリコン薄膜上の金属に関しても、より効率的に電子線から赤外線を放出する薄膜構成を検討した。これまで SiN 膜上に積層した金属は、金、プラチナ、タングステン及びチタンであり、それぞれの観察結果から最良の金属薄膜構成の分析を進めている。観察に用いたサンプルは、プラスチック粒子や金属粒子等であり、それぞれ特徴的な観察画像を示し、赤外線による組成分析の可能性を示唆する結果が得られた。さらに、マイクロサイズの描写が可能なスーパーインクジェットプリンターを用いて、SiN 膜上に直径 10  $\mu\text{m}$  の金や銀のスポットを形成し、電子線による赤外線放出量の検討を行った。これにより、金や銀、銅などのスポットでの赤外線放出量に大きな違いがある事が示された。これらの結果は、赤外線による高分解能の観察が可能であり、さらに組成分析の可能性を示している。

(2) 電子線の照射に伴う赤外線放出量は極めて弱く、SN 比が低いため、入射電子の電子線の電

流を増加させる必要がある。電子線の電流増加は、電子線の直径の増加を招き、空間分解能の低下に繋がる。さらに、薄膜内の局所的な熱の大幅な上昇は、有機材料等のダメージも生じる。こうした、初年度からの装置の立ち上げと基礎データの蓄積により、様々な問題点が明らかとなった。そのため、SiN 膜への電子線入射による熱スポットの新たな物理的变化についても検討した。通常の絶縁物質は、熱を加えると絶縁性が低下する。これは、交流信号においても同様であり、SiN 膜への電子線照射による熱で薄膜のインピーダンスは変化する。そのため、このインピーダンス変化をサンプル下面からの交流電場により測定する事が可能となる。こうした原理に基づく、新たな熱に起因するインピーダンス観察方法の開発を進めた(図1)(研究成果1)。

図1は、テストサンプルとして薄膜下にポリスチレンビーズを付着させて、下部電極に交流電場を印加させ、上部のタングステン層が形成された SiN 膜に電子線を照射する事で局所的な熱を発生させ、これによるインピーダンス変化を検出し画像化したものである。この方法では、8 波長を同時に金属端子へと印加し、それぞれの波長成分を検出する事で、各 8 波長の画像を得る事が可能である。さらに、ポリスチレンビーズやトレハロース層の周波数特性の違いも確認されており、観察画像のスペクトルから組成の解析が可能である事が確認された。

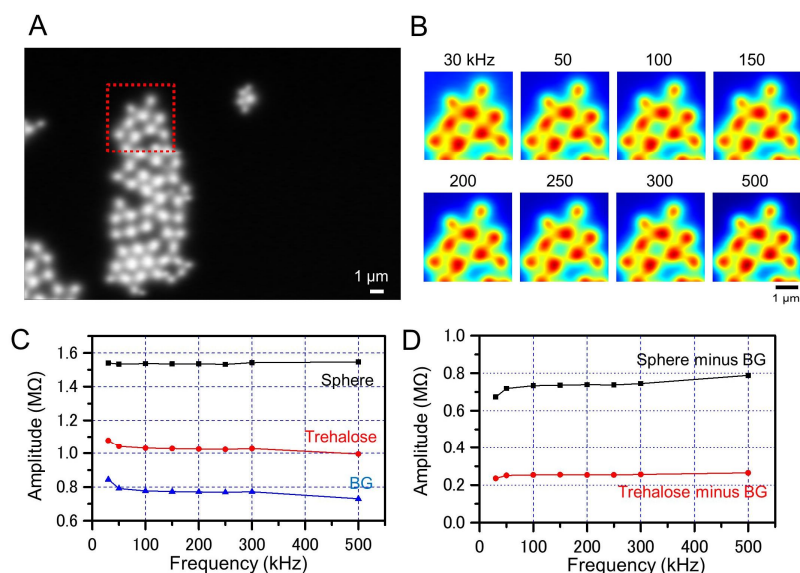


図1 SiN 膜下のトレハロースとビーズの電子線走査による観察画像とスペクトル

< 参考文献 >

Ogura, T., 2008. A high contrast method of unstained biological samples under a thin carbon film by scanning electron microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 79-84.

Ogura, T., 2010. Direct observation of unstained biological samples by scanning-electron generation X-ray microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391: 198-202.

Ogura, T., 2012. High-contrast observation of unstained proteins and viruses by scanning electrons microscopy. *PLoS ONE* 7: e46904(7pp).

< 研究成果 >

Ogura, T., 2022. Development of multi-frequency impedance scanning electron microscopy. *PLoS ONE* 17: e0263098.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ogura Toshihiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Development of multi-frequency impedance scanning electron microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0263098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0263098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okada Tomoko, Iwayama Tomoaki, Murakami Shinya, Torimura Masaki, Ogura Toshihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Nanoscale observation of PM2.5 incorporated into mammalian cells using scanning electron-assisted dielectric microscope	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80546-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okada Tomoko, Ogura Toshihiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Scanning Electron-Assisted Dielectric Microscopy Reveals Autophagosome Formation by LC3 and ATG12 in Cultured Mammalian Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1834 ~ 1834
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22041834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ogura Toshihiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Direct observation of unstained biological samples in water using newly developed impedance scanning electron microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0221296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0221296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda Eriko, Mori Masatoshi, Shiku Hiroshi, Miyahara Yoshihiro, Kawamura Yoshifumi, Ogawa Koji, Ogura Toshihiko, Goshima Naoki	4. 巻 25
2. 論文標題 Development of INSOL tag for proteome wide protein handling and its application in protein array analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 41 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12735	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwayama Tomoaki, Okada Tomoko, Ueda Tsugumi, Tomita Kiwako, Matsumoto Shuji, Takedachi Masahide, Wakisaka Satoshi, Noda Takeshi, Ogura Taku, Okano Tomomichi, Fratzl Peter, Ogura Toshihiko, Murakami Shinya	4. 巻 5
2. 論文標題 Osteoblastic lysosome plays a central role in mineralization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaa0672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax0672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小椋 俊彦、伊藤 徹次、岡田 知子
2. 発表標題 High-resolution imaging of proteins and cells under aqueous condition using scanning-electron assisted dielectric microscopy
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小椋 俊彦
2. 発表標題 革新的液中ナノ顕微鏡開発と細胞外微粒子の包括的解明
3. 学会等名 日本分析化学会第69回年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小椋 俊彦、岡田 知子
2. 発表標題 Nanoscale observation of biological specimens in aqueous condition by scanning-electron assisted dielectric microscopy
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019 conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小椋 俊彦、岡田 知子
2. 発表標題 Nanoscale imaging of unstained biological specimens in water using newly developed scanning-electron assisted dielectric microscopy
3. 学会等名 5th International Kyushu Colloid Colloquium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小椋 俊彦、岡田 知子
2. 発表標題 走査電子誘電率顕微鏡によるナノ・マイクロプラスチックの細胞への影響解析
3. 学会等名 産総研・シンポジウム「マイクロプラスチックの計測・評価を考える」(招待講演)
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	山本  条太郎  (Yamamoto Johtaro)  (20585088)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員    (82626)	

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
---------	---------