

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310096

研究課題名(和文) テレビジョン撮像管技術に基づく電子走査型実時間ナノ分解能光学顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of real-time nanometer-resolved scanning electron optical microscope based on television imaging tube technologies

研究代表者

宮崎 英樹 (MIYAZAKI, Hideki)

独立行政法人物質・材料研究機構・先端フォトニクス材料ユニット・グループリーダー

研究者番号：10262114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円

研究成果の概要(和文)：過去のものとなったテレビジョン撮像管技術を現代のナノ材料・ナノ計測技術で蘇らせ、表面近傍の光学像を分解能62nm、無染色で撮像する電子走査型超解像光学顕微鏡を開発した。光電子放出に伴う蓄積帯電電荷を読み出すアイコノスコープ方式と、蛍光点を走査して試料を照明するフライングスポットスキャナ方式の構築を目指した。前者については研究期間内に完成形を示すことはできなかったが、後者は市販の走査電子顕微鏡に組み込めるユニットの開発まで成功した。生きた細胞の観察を可能とする環境セルを開発し、位相物体が無染色で撮像できる原理がパーセル効果に由来することを明らかにし、実際に生きたままのヒト肺細胞の観察に成功した。

研究成果の概要(英文)：We revived classical television imaging tube technologies by use of modern nanotechnologies and developed a scanning electron optical microscope that enables us super-resolved optical observation of unstained specimen in the near-field of the imaging surface with a resolution of 62 nm. We considered the construction of an iconoscope, in which the accumulated charges due to the photoelectron emission are read out, and a flying spot scanner, in which a scanned fluorescent spot illuminates the specimen. Although the former is still under development, the latter was successfully completed in the form of a unit attachable to the specimen chamber of commercialized scanning electron microscopes. Luminescent environmental cells that enables the super-resolved observation of living biological cells were developed. The image formation principle of unstained phase objects was determined to be the Purcell effect. Finally unstained living human lung epithelial cells in liquid was observed.

研究分野：複合新領域

キーワード：電子顕微鏡 光物性 可視化

## 1. 研究開始当初の背景

光学顕微鏡技術は、現在、20年前の近接場光学顕微鏡の登場以来の大変革期にある。発光の極度の非線形性を利用した STED (STimulated Emission Depletion) や単一分子検出に基づく PALM (PhotoActivation Localization Microscopy) など、通常のレンズで回折限界を超えた蛍光観察が可能となった(これらの研究には、本研究期間中の2014年にノーベル化学賞が与えられた)。しかしながら、これらのすべての技術は蛍光染色に依存しており、蛍光に依存しない無染色超解像観察をいかにして実現するかは最後に残された課題となっている。

また、光と電子の相互作用を議論するプラズモニクスでは、PEEM(光電子顕微鏡)やCL(カソードルミネッセンス)など、電子顕微鏡を利用した超解像光学顕微鏡が普及しつつある。しかしながら、電子線は真空下を進行するため、生きた生物を観察することはできない。近年、大気中あるいは水中の試料を電子顕微鏡により観察するための環境セル技術が急速に発展しているが、細胞は観察に必要な量の電子線照射には耐えられないので、生きた試料を観察できる電子顕微鏡技術は存在しない。

ところで、テレビジョン放送のために光学像を電気信号に変換する撮像管は、光よりもはるかに波長の短い電子ビームを利用していること、物理的な画素が存在せず、連続膜を撮像面としていることから、本質的に超解像光学撮像の可能性を備えていた。その基本構造はSEM(走査電子顕微鏡)と大差なく、それが手のひらサイズにまとめられ、大量に製造されていたという事実には驚かざるを得ない。しかし、産業的にはCCDなどの固体撮像素子に駆逐されてしまった。とは言え、かつて最先端の知識と技術が投入された撮像管技術には、生きた細胞を回折限界を超える分解能で光学観察する技術を開発するためのヒントが数多く残されていると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、過去のものとなったテレビジョン撮像管技術を現代のナノ材料・ナノ計測技術で蘇らせ、表面近傍の光学像を分解能数10nm、無染色で実時間撮像する電子走査型超解像光学顕微鏡技術へと発展させる。具体的には、光波長よりもはるかに薄い撮像面上に置かれた対象物を照明し、裏面から電子ビームで光波長よりもはるかに小さな空間分解能で走査することにより、近接場光強度分布を電子的に読み出す方式を考える。本研究では、撮像管の成功の鍵となった設計思想(特に信号蓄積機能)の現代的な実現方法を検討し、生きた細胞の観察を可能とする環境セル、位相物体の無染色撮像技術や、必要に応じて新しい電子・光相互作用を導入することにより、

これまでにない超解像光学顕微鏡を構築する。

## 3. 研究の方法

本研究では、(1)撮像原理の検討、(2)環境セルの開発、(3)位相物体の無染色撮像法の検討、の3つの課題に取り組んだ。電子顕微鏡、薄膜技術、材料分析、生物細胞操作など、学際的な多種多様な要素技術が必要となるため、個々の課題について柔軟に専門家に指導を仰ぎ、共同利用設備を利用しつつ推進することとした。

### (1) 撮像原理の検討

撮像管には多種の方法が存在するが、特徴的なものに、アイコノスコープ(光電子放出による金属微粒子の電荷の変化量を読み取る)、イメージオルシコン(光電子放出に伴う2次電子放出による電荷の変化量を読み取る)、ビジコン(高絶縁性光導電膜に生成されたホール像の中和時の電流を読み取る)、フライングスポットスキャナ(電子線蛍光の透過像を光学的に読み取る)などがある。これらの内、近接場超解像光学撮像に適するものを検討し、それを電子顕微鏡で実現するためのシステム構築を行う。

### (2) 環境セルの開発

電子顕微鏡にて生きた細胞を観察するためには、真空環境と大気環境とを隔離しつつ、差圧により破壊されないだけの強度を持ち、近接場撮像を可能とするほど薄いメンブレンにて構成された環境セルの開発が必須である。本研究ではさらにそのメンブレンに撮像面を組み込む必要がある。また、細胞を観察するためには付着性細胞を表面で成長するための表面処理や培養方法の工夫が必要となる。具体的にどのような細胞のどのような現象を観察するのかというターゲットの選択も重要である。

### (3) 位相物体の無染色撮像法の検討

無染色ということは、位相物体の屈折率の差を画像として読み取らねばならない。本研究では、忠実にマックスウェルの方程式に基づくことにより、像形成原理を理論的に検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 電子顕微鏡への光学系の融合

本研究ではフライングスポットスキャナとアイコノスコープの2方式の開発に取り組むこととした。まず初年度に、その基盤システムの構築に注力した。走査電子顕微鏡の電子線操作を外部から完全制御し、撮像面から流れ出る電流を10fAの分解能で測定できるシステムを構築した。また、光ファイバを介して走査電子顕微鏡外部から試料室に照明光を導入したり、試料室内での発光を外部の検出

器、分光器で測定できるシステムを構築した。さらに、撮像面試料を試料室全体の真空を破ることなく短時間で位置再現性良く交換できる機構、撮像面の発光を試料室に内蔵した光電子増倍管(PMT)で測定できるユニットも開発した。

## (2) フライングスポットスキャナ方式電子線走査光学顕微鏡の開発

### ①概要

最初の2年間で、フライングスポットスキャナ方式を取り上げ、環境セルの開発から像形成理論の確立まで一通りの技術開発を行った。なお、同様の電子顕微鏡と光学顕微鏡の融合については提案時より世界的な注目が高まっており、本方式については、本研究開始時に既に類似研究が存在した[W. Inami et al., *Opt. Express* 18, 12897 (2010)]。しかし、従来研究は、環境セルを用いる方式ではなく、走査電子顕微鏡を倒立型にした大がかりなシステムに依存しており、また観察している細胞が生きていることは示されていなかった。また、超解像観察が可能になり得る原理も示されていなかった。本研究では、発光膜を組み込んだ環境セルとコンパクトな検出ユニットにより、市販の標準的な走査電子顕微鏡で実現できる超解像観察技術の構築を目指した。細胞の生死判定についても蛍光試薬を用いた明確な方法を導入した。また、像形成については系統的な理論計算に基づき、屈折率分布による放射パターン制御(パーセル効果と言えり)により超解像観察が確かに可能であることを示し、また、実験的にも屈折率の既知のナノ粒子を用いて原理確認をした。本顕微鏡を電子線走査光学顕微鏡(Scanning Electron Optical Microscope, SEOM)と名付けた。

### ②環境セルと検出ユニット

図1(a), (b)には主要部の構造を示す。環境セル入射面は厚さわずか15~20nmのSiNメンブレンである。SiNメンブレンはこれほどの薄さでも1気圧の差に十分に耐えるほど強靱で、気密性も良い。その内面に発光膜が塗布してありこれを合わせてもメンブレン厚さは50nmである。試料はその表面に付着させておく。メンブレン表面を電子線で走査することにより試料表面近傍にて光源が走査される。環境セル反対面は透明な石英窓であり、その直下のPMTにて蛍光強度をフォトンカウンティングモードで計測する。図1(c)は環境セルである。入射面と出射面を重ね合わせてネジで固定することにより密閉できる。密閉時には2個の空気穴を利用して内部の気泡を抜き取り、液体(生きた細胞を観察する場合)には培地で充填した後、ポリイミドシートで密閉する。

発光膜にはZnO:Zn, ZnS:Mn, ZnS:Ag、プラスチックシンチレータ、量子ドットなど多数の候補を評価したが、均一性の観点から有機物を選択せざるを得ず、クマリン6ドープ・

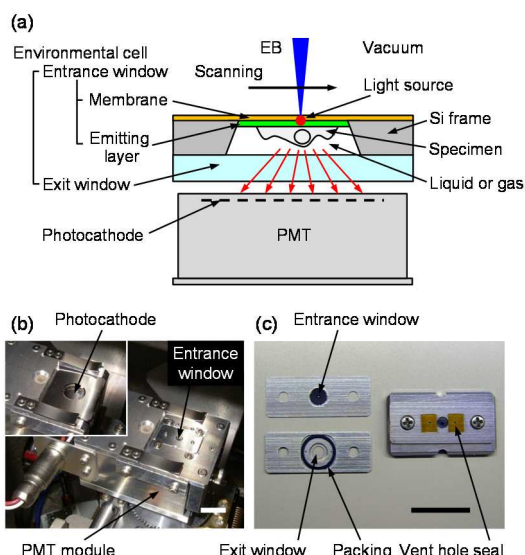


図1 電子線走査光学顕微鏡 (Bar: 10mm)

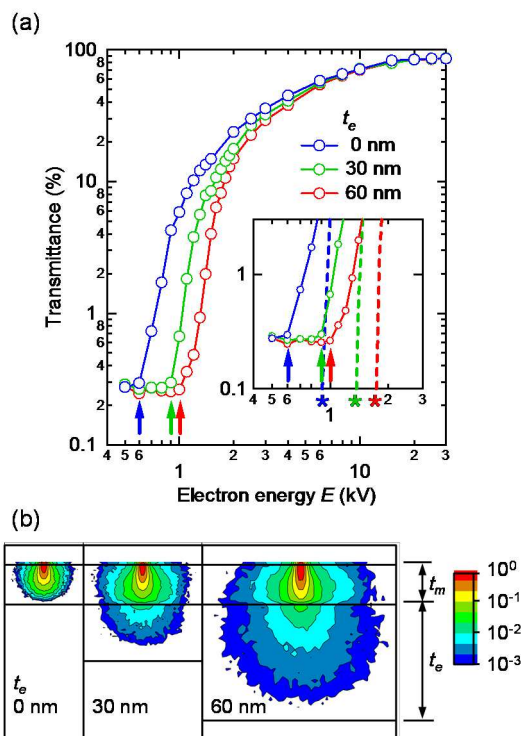


図2 電子線の透過と散乱の様子

ポリビニルカルバゾールを選択した。

図2には加速電圧によるメンブレンの電子線透過率を示す。低加速電圧では電子線はメンブレンを透過せず、蛍光だけを発して試料には電子が照射されない状況が実現できる。

### ③超解像撮像原理

図3(a)には試料近傍を微小な蛍光点が通過する際の放射角度分布を示す。物体の屈折率が高いほど放射量自体が増大する。これは物体の存在による輻射場状態密度の改変の結果であり、本顕微鏡はパーセル効果により超解像光学像を得るものと理解できる。図3(b)は微粒子の見え方をシミュレーションした結果である。光の波長よりも小さな粒子が実寸に



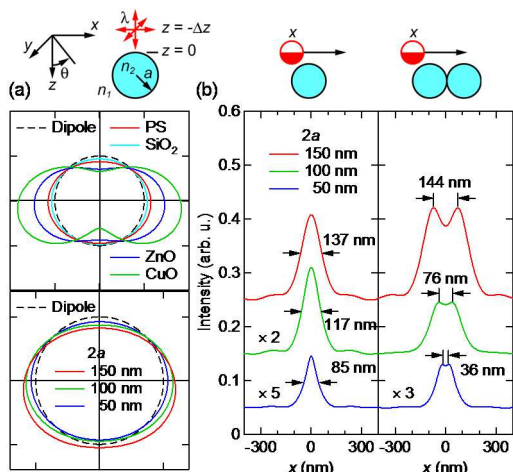


図3 超解像光学観察の原理

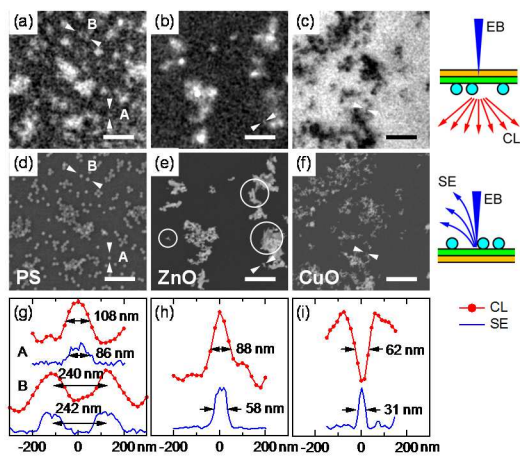


図4 ナノ粒子の観察結果 (Bar: 1μm)

近い大きさで観察できること、2個の隣接する粒子が識別できることがわかる。

図4には屈折率、大きさのわかっているナノ粒子の観察結果を示す。計算で予測した通り、屈折率が高いほどコントラストが高く、回折限界を超える微粒子が実際のサイズに近い大きさで観察されている。唯一予想外だった点は、吸収性粒子(CuO)である。計算では明るく見えると予測したが、実際には逆のコントラストで観察された。これは色素分子からCuO粒子へのエネルギー移動のためと解釈している。

#### ④水中の細胞の観察

ポリLリシン処理により細胞の付着性を高めた環境セル蛍光面表面に、ヒト肺表皮細胞A549を播種・培養し、適度に成長した時点で密閉した。適宜位相差顕微像も取得し、SEOM像と比較した。本研究の目的は生きた細胞の観察であるが、生きた細胞は位相差観察からSEOM観察までの数10分の間に变形するため、両者の厳密な比較が必要な場合には、細胞をパラホルムアルデヒドにて固定した。図5(a)(b)には固定した細胞のSEOM像と位相差像を示す。蛍光面表面近くの細胞内顆粒が観察できている。その大きさは205nmで確かに無染色の水中の細胞の無染色超解像観察が

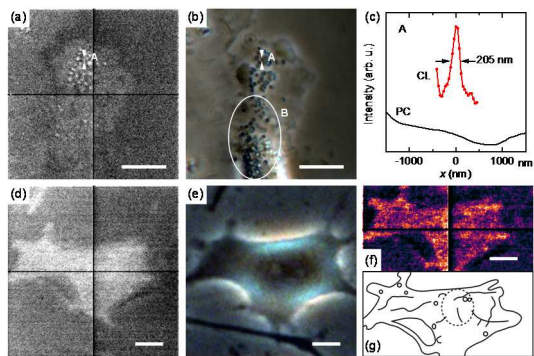


図5 無染色細胞の観察結果 (Bar: 10μm)

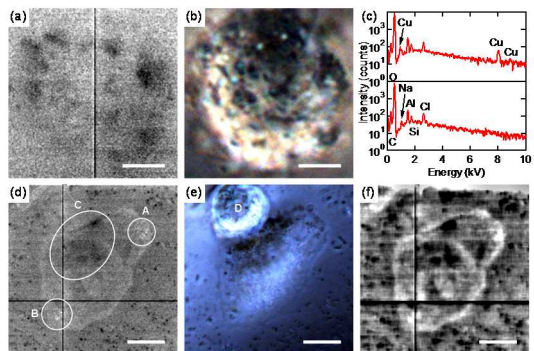


図6 CuO ナノ粒子の取り込み状態の観察 (Bar: (a)–(b) 5μm, (d)–(f) 10μm)

可能なことが示されている。図5(d)(e)には固定していない生きた細胞のSEOM像と位相差像を示している。SEOM像を強調処理すると、位相差像では視認できない顆粒や細胞内骨格が観察されている。これらの構造は蛍光面との付着面近傍にあると思われる。

ナノ粒子の毒性を明らかにするために、ヒト肺表皮細胞がナノ粒子を取り込む様子の解明が様々な方法に基づいて取り組まれているが、今なお決定的な手法がない。本研究では特に関心の持たれているZnO、CuOの取り込みの様子をSEOMを用いて調べた。細胞が取り込んだCuOを顆粒状に集積した状態で蓄えている様子を可視化することができた(図6)。

#### ⑤細胞の生死確認

開発したSEOMは発光面に有機材料を使ったため、1回の電子線走査で発光面が損傷を受け、動画を撮ることができなかった。従って、細胞の動きや分裂を直接的に捉えて細胞の生死を判断することはできなかったが、SEOM観察した細胞を事後に生死判定試薬で染色して生死を確認することはできた。様々な加速電圧、ドーズ量で観察した165個のA549細胞の生死判定結果の分析により、加速電圧1.2kV、ドーズ量10electrons/nm<sup>2</sup>以下の条件であればA549細胞は生きたまま観察できることがわかった。図5(d)の細胞も、SEOM像取得後にこの方法で細胞が生きていることを確認した。

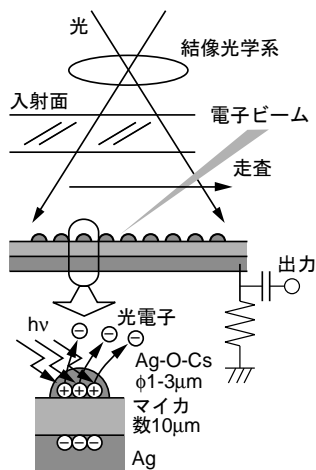


図7 アイコノスコープの原理

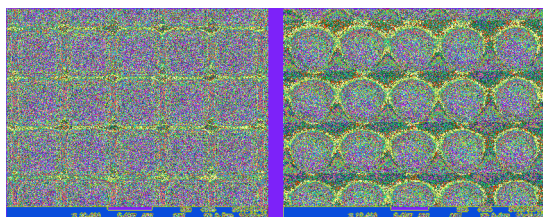


図8 制御された Au ナノ粒子アレイ

### (3) アイコノスコープ方式電子線走査光学顕微鏡の開発

#### ① 概要

最終年度はアイコノスコープ方式を取り上げ、撮像機構の基礎的検証に注力した。撮像管が実用化した重要な鍵は、信号蓄積機能を持たせたことであった。アイコノスコープはその代表例である。具体的には、図7に示すように、ピクセルの役割を果たす Ag 粒子が絶縁体を挟んで Ag 薄膜と対峙している。Ag 粒子に光学像が投影されると光電効果で Ag 粒子が帯電し、それを電子線で走査すると、帯電量に応じた電流が流れるので光学像を電子的に読み出すことができる。本研究の場合は、絶縁体を SiN メンブレンとし、Ag 薄膜の代わりに(半)透明電極膜として、この上に試料を付着させる。近接場にある Ag 粒子が光電子放出により帯電し、その量を電子線走査時の(半)透明電極電流から読み出す。

#### ② 撮像面の作製

本研究では、見通しの良い系で検証を進めるため、Ag 粒子の代わりに、微細加工により制御された Au ナノ粒子アレイを作製した(図8)。Au ナノ粒子アレイは 50nm 厚  $\text{Al}_2\text{O}_3$  膜を挟んで Au 薄膜と対峙している。Au で光電効果を起こすには約 5eV 以上の光子エネルギーの深紫外光を照射すれば良いが、その代わりに、適切な加速電圧の電子ビームによる予備走査で電荷蓄積状態を作っておき、それを電子ビーム走査時の微小電流により読み出す方式を試みた。しかしながら、現時点で有意なレベルの信号を得るに至っていない。本研究

は研究期間終了後も継続し、引き続きアイコノスコープ方式電子線走査光学顕微鏡の原理検証を進めていく予定である。

#### (4) まとめ

本研究では、過去のものとなったテレビジョン撮像管技術を現代のナノ材料・ナノ計測技術で蘇らせ、表面近傍の光学像を分解能 62nm、無染色で撮像する電子線走査型超解像光学顕微鏡へと発展させた。具体的には、信号蓄積機能に基づいたアイコノスコープ方式については、研究期間内に完成形まで示すことはできなかったが、光波長よりもはるかに薄い撮像面上に置かれた対象物を電子線で形成した光波長よりもはるかに小さな輝点により走査照明するフライングスポットスキャナ方式の電子線走査光学顕微鏡の構築に成功した。生きた細胞の観察を可能とする環境セルを開発し、位相物体が無染色で撮像できる原理がパーセル効果に由来することを明らかにし、実際に生きたままの細胞の観察に成功した。しかし、蛍光膜に有機蛍光分子を採用せざるを得なかったため、実時間観察は実現できなかった。実時間観察可能なフライングスポットスキャナ方式の実現と、アイコノスコープ方式の原理検証が今後の課題である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① H. T. Miyazaki, T. Kasaya, H. Oosato, Y. Sugimoto, B. Choi, M. Iwanaga, and K. Sakoda, Ultraviolet-nanoimprinted packaged metasurface thermal emitters for infrared  $\text{CO}_2$  sensing, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 査読有, Vol.16, 2015, 035005/1-4. DOI: 10.1088/1468-

② Y. Nishimura, T. Kawano, Y. Kunichika, K. Kasahara, T. Yaji, N. Ikeda, H. Oosato, H. Miyazaki, and Y. Sugimoto, Observation of the enhancement of electric fields normal to the surface using mid-infrared slot antennas and an atomic layer deposition technique, *Optics Communications*, 査読有, Vol. 349, 2015, 98-104. DOI: 10.1016/j.optcom.2015.03.063 6996/16/3/035005

③ H. T. Miyazaki, T. Kasaya, M. Iwanaga, B. Choi, Y. Sugimoto, and K. Sakoda, Dual-band infrared metasurface thermal emitter for  $\text{CO}_2$  sensing, *Appl. Phys. Lett.*, 査読有, Vol.105, 2014, 121107/1-4. DOI: 10.1063/1.4896545

④ T. Yatsui, W. Nomura, T. Mano, H. T. Miyazaki, K. Sakoda, T. Kawazoe, and M. Ohtsu, Emission from a dipole-forbidden energy state in a GaAs

quantum-ring induced by dressed photon, Appl. Phys. A, 査読有, Vol. 115, 2014, 1-4. DOI: 10.1007/s00339-013-7905-y

⑤ H. T. Miyazaki, T. Kasaya, T. Takemura, N. Hanagata, T. Yasuda, and H. Miyazaki, Diffraction-unlimited optical imaging of unstained living cells in liquid by electron beam scanning of luminescent environmental cells, Optics Express, 査読有, Vol. 21, 2013, 29198-28218. DOI: 10.1364/OE.21.028198

[学会発表] (計 8 件)

① 宮崎英樹, 笠谷岳士, 杉本喜正, 崔峯碩, 岩長祐伸, 迫田和彰, UV ナノインプリント法による赤外熱放射メタ表面の作製, 2014 年第 75 回応用物理学会秋季学術講演会, 2014 年 9 月 17 日, 北海道大学 (北海道・札幌市)

② 宮崎英樹, 笠谷岳士, 崔峯碩, 岩長祐伸, 杉本喜正, 迫田和彰, CO<sub>2</sub> 濃度計測のための赤外熱放射メタ表面, 2014 年第 61 回応用物理学会春季学術講演会, 2014 年 3 月 17 日, 青山学院大学 (神奈川県・相模原市)

③ 久保敦, 諸徳寺匠, 江口美陽, 笠谷岳士, 宮崎英樹, 金ナノ粒子配列構造の表面プラズモンダイナミクス, 日本物理学会 2013 年秋季大会, 2013 年 9 月 26 日, 徳島大学 (徳島県・徳島市)

④ B. Choi, M. Iwanaga, H. T. Miyazaki, Y. Sugimoto, and K. Sakoda, Plasmonic enhancement of electric and magnetic dipole emissions at telecommunication wavelengths on metasurfaces, 2013 年秋季第 74 回応用物理学会学術講演会, 2013 年 9 月 18 日, 同志社大学 (京都府・京田辺市)

⑤ 西村悠希, 森透, 笠原健一, 家路豊成, 宮崎英樹, 池田直樹, 杉本喜正, 中赤外光アンテナの膜厚方向での光電界増強に関する検討, 2013 年秋季第 74 回応用物理学会学術講演会, 2013 年 9 月 18 日, 同志社大学 (京都府・京田辺市)

⑥ K. Tsushima, S. Mori, Y. Nishimura, K. Hishii, K. Kasahara, T. Yaji, H. Miyazaki, N. Ikeda, M. Ochiai, H. Oosato, and Y. Sugimoto, Observation of the enhancement of the electric field normal to the surface of mid-infrared slot antennas, 7th International Congress on Advanced Electromagnetic Materials in Microwaves and Optics - Metamaterials 2013, 2013 年 9 月 16 日, Bordeaux 大学 (フランス・Talence 市)

⑦ T. Yatsui, W. Nomura, T. Mano, H. Miyazaki, K. Sakoda, T. Kawazoe, and M. Ohtsu, Emission from a dipole-forbidden energy state in a GaAs

quantum ring induced by a near-field interaction with a fiber probe, The 9th Asia-Pacific Conference on Near-field Optics (APNFO2013), 2013 年 7 月 3 日, Riverview Hotel (シンガポール)

⑧ T. Yatsui, W. Nomura, T. Mano, H. Miyazaki, K. Sakoda, T. Kawazoe, and M. Ohtsu, Emission from a Dipole-Forbidden Energy State in a GaAs Quantum-Ring Induced by Dressed Photon, CLEO/QELS 2013, 2013 年 6 月 9 日, San Jose Convention Center (米国・サンノゼ市)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: リフトオフ法, 超微細 2 次元パターン  
アレイおよびプラズモンデバイス

発明者: 宮崎英樹, 笠谷岳士

権利者: 物質・材料研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2014-170264

出願年月日: 平成 26 年 8 月 25 日

国内外の別: 国内

名称: 近接場光学観察装置、試料含有環境セル作製方法、走査電子光学顕微鏡及び走査電子光学顕微鏡の使用法

発明者: 宮崎英樹, 笠谷岳士, 安田剛

権利者: 物質・材料研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2013-158680

出願年月日: 平成 25 年 7 月 31 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.nims.go.jp/units/apm/plasmonics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 英樹 (MIYAZAKI, Hideki)

物質・材料研究機構・先端フォトニクス材料ユニット・グループリーダー

研究者番号: 10262114

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

笠谷 岳士 (KASAYA, Takeshi)