

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26246009

研究課題名(和文) MEM液体セルによる液中現象の透過電子顕微鏡その場観察

研究課題名(英文) In Situ Transmission Electron Microscopy of Phenomena in Liquid using MEMS Liquid Cell

研究代表者

藤田 博之(Fujita, Hiroyuki)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：90134642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、MEMS技術を活用してTEM用の高機能液体セルを作り、ナノスケールの液体中現象を「その場」観察した。高い機能を持つ液体セルに関しては、グラフェンの極薄膜を真空/液体隔膜へ適用し、液中で4nm以下の高い分解能を得た。またナノチャネルを集積した一体型液体セルを作り、EELS測定により流路内の水の存在を判定する客観的な検出方法を得た。さらに温度制御用のヒータと温度センサを内蔵した液体セルを作り、ヒータに通電することで溶液を85 程度まで昇温できた。最後に生体分子の反応の観測として、抗体-抗原反応と、カリクサレン粒子が血栓を生成する際の凝固反応とを液中で観察した。

研究成果の概要(英文)：We have developed MEMS-based liquid cells for TEM (transmission electron microscope) in-situ observation, which enabled nano-scale real-time imaging of reactions in liquid. Very high resolution imaging down to 4 nm was achieved by the liquid cell with graphene membranes for a TEM observation window. Also a monolithic liquid cell using a suspended SiN-covered-nano channel allowed the objective detection of water in the channel by EELS measurement as well as an easy and quick encapsulation of the liquid sample. Furthermore, it was possible to raise the sample liquid temperature up to 85 degree C by the integration of a micro heater and a temperature sensor in the liquid cell. Finally, reaction of bio molecules were visualized through the motion of metal nano-particles attached to target molecules. Antibody-antigen binding and aggregation of protein molecules by calixarene were observed in liquid.

研究分野：マイクロ・ナノメカトロニクス

キーワード：マイクロマシン 電子顕微鏡 その場観察 マイクロ加工技術

1. 研究開始当初の背景

生体现象を含む化学反応や、電気メッキ・電池の電極劣化などの工業プロセスにおいて光学顕微鏡の解像限界を超えたナノレベルの現象の観測が求められている。近年の顕微法の進歩により、液中 AFM (原子間力顕微鏡) を用いて生体分子モータの運動の様子を可視化することが可能になり、ミオシン V が 2 本の足を交互に降り出しながら、ハンドオーバーハンド様式で運動する様子がビデオ動画として捕えられている [1]。また、グラフェンの層間にナノ粒子を含む液体を液滴状に挟み込み、粒子の成長や合体を時間分解観測することが可能になった [2]。さらに、いわゆる環境 TEM (透過電子顕微鏡)・SEM (走査電子顕微鏡) では、表面がぬれた試料の観察やガス雰囲気での触媒反応の実時間観測が行える [3, 4]。しかし、AFM では対象とプローブの接触による外乱が生じる点、環境 TEM・SEM では液中の反応が見られない点が問題である。

2. 研究の目的

本研究は、MEMS 技術を活用して TEM 用の高機能液体セルを作り、熱や化学的な刺激に応じて起きるナノスケールの液体中現象を「その場」観察しながら物性の変化を測定することが目的である。さらに、生体分子などの「その場」観測に挑戦する。ナノ科学、特に微小場の化学に新知見をもたらすことを目指す。

3. 研究の方法

TEM 液体セルを用いた液中の観察についての概念図を Fig. 1 に示すが、本研究では申請者が 25 年にわたって培った半導体マイクロマシーニング技術によって、さらに高い機能を持つ液体セルを作る。すなわち、グラフェン等の極限薄膜の真空/液体隔膜への適用や、MEMS 技術で一体集積したナノ流路の利用により、従来の液中ナノ現象観察手法に比して時間・空間分解能を大きく向上する。

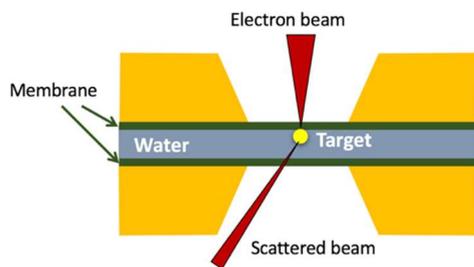


Fig.1 液体セル概要(断面図)

さらに、観察中のある時点で加えた刺激に対する反応過程を観察可能にするため、MEMS 技術で作ったマイクロヒータ、マイクロセンサ等を液体セルに組込んで動作させる。

最後に生体分子の「その場」観測を試みる。生体分子は TEM で直接観察することができないため、金属ナノ粒子を付加して標識とする。ナノ粒子を付加した分子同士が反応した場合、粒子の間隔は反応して生成した分子の大きさ

を反映するはずである。抗体-抗原反応を例に、このような測定を試みる。また、生体分子の相互作用により生じる凝集反応を、ナノ粒子の動きから観測し、反応の動特性を調べる。

4. 研究成果

4-1 グラフェン膜を用いた液体セル

電子線の散乱を抑えてコントラストの高い TEM 像を獲得するため、隔膜ができるだけ薄い液体セルを作成した。薄い膜として知られるグラフェンを隔膜に選んだ。この MEMS 液体セルの概要を Fig. 2 に示す。トップチップとボトムチップ(以下、合わせてシリコンチップと呼ぶ)と、スペーサー(ピンク)で構成されている (Fig. 2A)。シリコンチップ中央部には大量の穴が空いたグリッド部 (Fig. 2B) があり、穴の上をグラフェン(緑)が覆っている。この穴を通して、TEM の電子線が透過する。トップチップとボトムチップを張り合わせると (Fig. 2C)、チップの間にスペーサーの厚みの空間が形成される。注入口からその空間に水をいれ、注入口を樹脂でふさいで封止する。

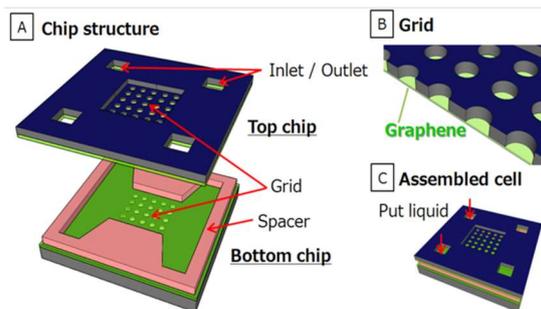


Fig.2 グラファイト膜での液体セル

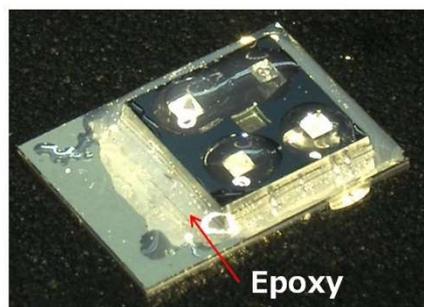


Fig.3 グラフェン膜の間に水を封止した液体セルの写真: 液体状のものは紫外線硬化したエポキシであり、チップ外周と液体注入口 4 か所を密封している。チップは 1 辺 4mm。

金は原子番号が大きいため、TEM 像において高いコントラストが得られ、観察し易い。このため、観察用のナノ粒子として、直径が 100 nm と 15nm の金ナノ粒子を含んだ水を液体セルに封入した。高真空の STEM チャンバーの汚染を避けるため、高真空状態でも液体を保持できることを確認した後に、液体セルを TEM に挿入して観察した。

得られた TEM 画像を解析し、分解能を検討した。画像解析ソフト ImageJ を用いて、金ナ

ノ粒子上のライン分析を行い、各位置における白黒の濃淡の値を 256 階調で得た。まず、直径 15nm の金ナノ粒子について解析を行った。Fig. 4. A-1 の赤線上のライン分析の結果が Fig. 4. A-2 である。横軸は位置 (nm)、縦軸は濃淡の値を 1 で正規化した信号強度 (a. u.) である。次に、直径 100nm の金粒子について同様の解析を行った (Fig. 4. B-1, B-2)。

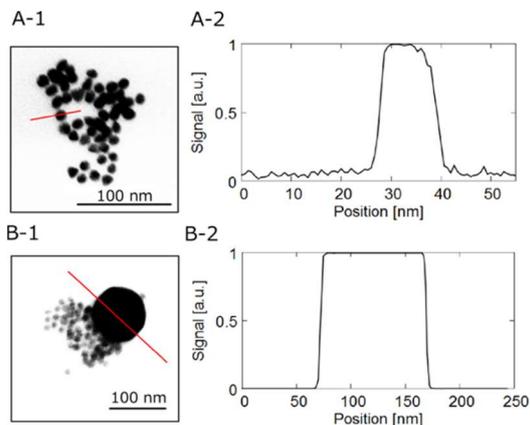


Fig. 4 金ナノ粒子の TEM 観察

ライン分析をもとに分解能の評価を行った。TEM 画像では物体の端部が鮮明に見えることが大切であるので、Fig. 5 のように、信号の立ち上がり部分 (および立ち下り部分) を直角三角形で近似した。直角三角形の底辺の長さ  $d$  は、STEM 画像における粒子の輪郭のぼやけた部分の大きさを表しており、分解能の指標となると判断した。以下、本研究の解析においては  $d$  を分解能として定義し、 $d$  は近似直線から幾何学的に三角形の底辺として求めた。以上の計算処理を、15nm の粒子 29 個と、100nm の粒子 5 個について行った。得られた  $d$  の値は、粒子の大きさによらず全て 10nm 以下となった。15nm 粒子と 100nm 粒子における  $d$  の平均値は、それぞれ 4.0nm と 3.6nm である。このことから、グラフェン隔壁液体セルは 4nm の分解能を到達したと言える。

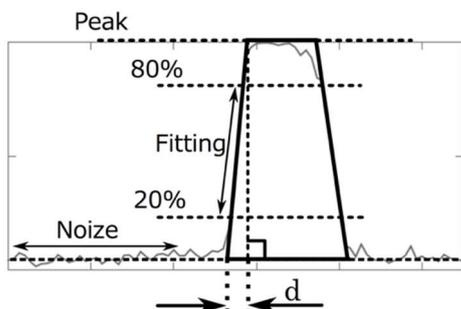


Fig. 5 分解能の計算

グラフェン隔壁の液体セルは作製時に致命的な問題があり、歩留まりが極めて低いことが分かった。作製において、二つのチップをエポキシで張り合わせる際に、ピンセットによる手作業の組み立てが必要となる。この時に、グラフェン面を下にしてチップケース上に置くことが避けられず、グラフェンの一部

が破れてしまう。Fig. 6 は破れたグラフェンの SEM 画像である。グラフェンが破れたグリッド孔は貫通穴となり、封入した水がリークする。張り合わせる直前に SEM で確認し、破れの無いチップのみを用いて張り合わせを行ったが、張り合わせた後はグラフェンの破れを確認する方法は無い。この問題のため、グラフェン隔壁液体セルの歩留まりは非常に低く、安定した観察を行えなかった。

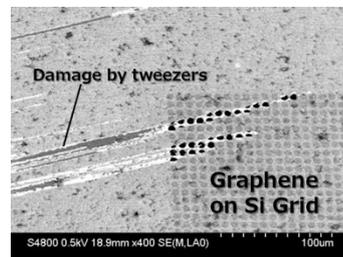


Fig. 6 グラフェンが破れてしまう：シリコン上に転写されたグラフェンの SEM 画像。ピンセット操作で傷が付いている。グリッド孔が貫通してしまっていることが分かる。

#### 4-2 ナノチャネルデバイス

グラフェン隔壁だけでなく、シリコン窒化膜の隔壁をもつチップでも、二枚のチップを手作業で張り合わせる工程は、リークなどの問題が生じやすい。そこで、一体集積化型の液体セルを作ることとした。この液体セルはシリコン基板とガラス基板から構成されている (Fig. 7A)。中央部には TEM 電子線が透過する貫通穴 (観察窓) があり、貫通穴を横切るようにナノチャネルが宙吊りに配置されている。ガラス基板には注入口となる穴があり、注入口から導入した水がナノチャネル内部に充填される。

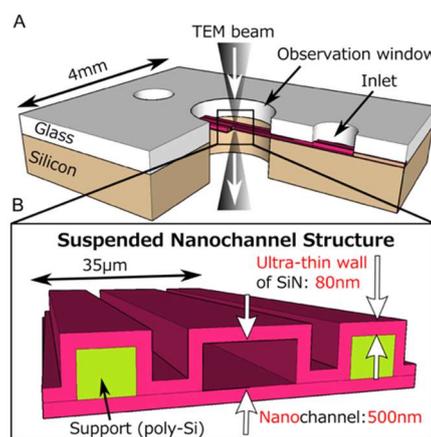


Fig. 7 ナノチャネルデバイス

次に、ナノチャネル型リキッドセルの中核部分である、宙吊りナノチャネル構造について述べる (Fig. 7B)。宙吊りナノチャネル構造は壁面の SiN 薄膜 (ピンク色) と支持材のポリシリコン (黄緑色) で構成されている。2 層の SiN 壁面で四方を囲まれた高さ 500nm の空間が流路となり、内部に観察試料を含んだ水を封入する。流路の両サイドには流路と同じ高

さ(500nm)のポリシリコンが支持材として設けてあり、流路の変形や破損を防ぐ。SiN壁面と流路を合わせた厚さは660nmと十分に薄いいため、電子線が透過する。流路が基板から浮いて宙吊りになっている点と、流路の厚さが数百ナノメートルである点から、本構造を宙吊りナノチャンネル構造と呼ぶ。

ナノチャンネル構造は以下の手順で作成した。まずシリコン(100)基板に厚さ210nmの熱酸化膜を形成した。次に、ナノチャンネルの底面となる厚さ80nmのSiN層をLPCVDにより成膜した。SiN層の上に、TMAHエッチングの犠牲層となる厚さ500nmのポリシリコンを成膜し、SF<sub>6</sub>ガスを用いてエッチングした。Fig. 6A上面図におけるポリシリコン部分(緑)のうち中央のひょうたん型の部分は、後のTMAHエッチングにより取り除かれ、流路空間となる。その後、チャンネルの上側の壁面となる厚さ80nmのSiN層と、厚さ100nmのSiO<sub>2</sub>層をLPCVD成膜した(Fig. 8B)。熱酸化膜とSiO<sub>2</sub>層は後のTMAHエッチング時にSiN層の保護膜となる。次に、CHF<sub>3</sub>ガスでSiN層とSiO<sub>2</sub>層をエッチングした(Fig. 8C)。このエッチングによって、TMAH溶液がポリシリコンにアクセスする経路ができる。また流路に隣接する部分のシリコン基板を露出させ、そこから基板をエッチングすることによって流路を宙吊り構造にした。

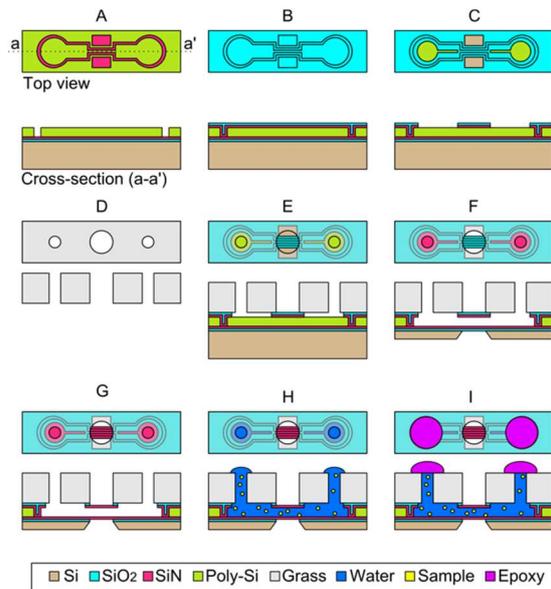


Fig. 8 ナノチャンネル型液体セルのプロセスフロー

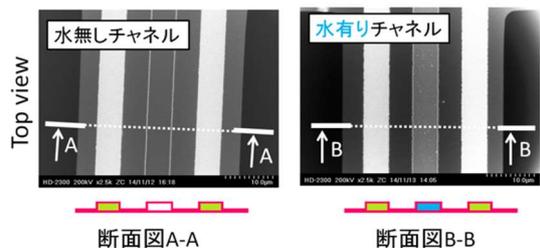


Fig. 9 チャンネル部分の低倍率でのTEM像. チャンネル部分のコントラストが明らかに違うことから水の有無を確認した. チャンネル幅は5 μm

作製したナノチャンネル型液体セルに水が封入されていることは画像のコントラストから推定できる(Fig. 9)。しかし、水の存在を客観的に示すため、EELS測定を行った。EELS測定では、まず流路外の遮蔽物の無い真空領域において、キャリブレーションを施した。次に、水を封入していない液体セルのEELS測定を行った(Fig. 9 結果A)。SiN壁部分(A. 1)と、水が充填されていない流路部分(A. 2)のEELSスペクトルを示す。EELSスペクトルでは右肩下りのバックグラウンド線が現れる。例として、A. 2のバックグラウンド線を緑実線で示した。バックグラウンド線の上に試料の元素の情報を反映したピークが現れ、ピーク的位置を読み取ることによって元素の情報を得ることができる。既存のEELS測定結果によると、Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>の結晶に対しては410eVと435eV付近において窒素に由来するN-K端のピークが、水に対しては535eV付近から酸素に由来するO-K端のピークがある。

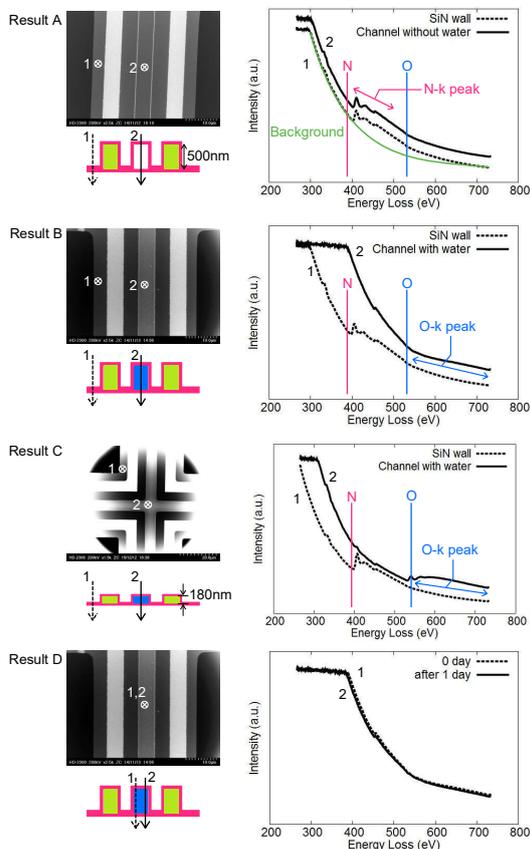


Fig. 10 EELSの観察結果. チャンネル幅は5 μm

結果A. 1では410eV付近に最大のピークが、410-530eVにかけてはブロードなピークがある。410eVという値は、先行研究でのN-K端のエネルギー損失値とほぼ同じ値である。すなわち、A. 1ではSiN薄膜の窒素に由来するN-K端のピークが得られたと言える。

結果A. 1とA. 2を比較する。A. 1ではSiN薄膜(160nm厚)のみ、A. 2ではSiN薄膜(80nm)+空隙(500nm)+SiN薄膜(80nm)を測定したが、得られたEELSスペクトルはほとんど同じであることから、EELSスペクトル形は流路の空

隙の有無によらずに測れることが分かった。

次に水無し流路と水有り流路を比較した。結果 B は水を封入した液体セルに対して行った EELS 測定の結果である。SiN 壁部分 (B. 1) と水が充填されている流路部分 (B. 2) の EELS スペクトルを示す。B. 1 は SiN 薄膜のみを測定したため、A. 1 と同じスペクトルが得られた。B. 2 では 530eV 付近からブロードなピークが現れた。これは先行研究の 0-K 端の値と同様であり、流路内の水に含まれる酸素に由来するピークだと判断した。

結果 A. 2 と B. 2 を比較すると、水の無い流路 A. 2 では水に由来する 0-K 端が現れていない。一方、水の有る流路 B. 2 では 0-K 端が現れている。この差は明らかに水の有無によるものである。このことから、530eV 付近の 0-K 端を確認することで、流路内の水の存在を検出できると結論した。すなわち、流路内の水の存在を判定する客観的な検出方法を得た。これは隔膜型の液体セルでは得ることのできない成果である。また、液体の封入に必要な時間を一時間程度にし、2 チップを組み立てる方式に比べ大幅に短縮できた。

#### 4-3 試料の加熱

試料の観察部分のみを加熱し、温度変化による試料の変化を TEM で観察する液体セルを作成した。TEM 観察用の SiN 隔膜がある二枚のシリコンチップをフォトレジストのスペーサを介して張り合わせた。一方のシリコンチップ上に金属配線をほどこし、加熱用のヒータと温度センサを作った。この加熱用液体セルの模式図 (Fig. 11) と写真 (Fig. 12) を示す。

ペルチエ素子を用いてデバイス全体の温度を制御し、各温度における電気抵抗値を計測した。この結果をもとにセンサ抵抗値から温度を計測する校正データ (Fig. 13) を得た。さらに、ヒータに通電しその時の温度を測った。Fig. 14 に示すように、ヒータで消費される電力と温度に良い相関があった。

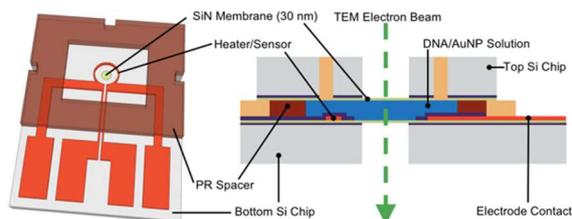


Fig. 11 加熱用液体セル

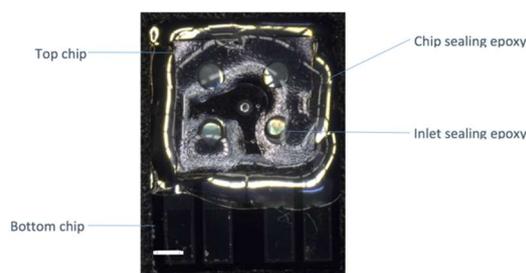


Fig. 12 組み立て後の加熱用液体セルの写真

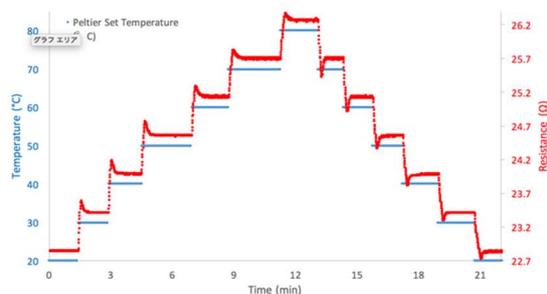


Fig. 13 ヒータに異なる電圧を印可して温度を変え、そのときのセンサの抵抗値を計測。

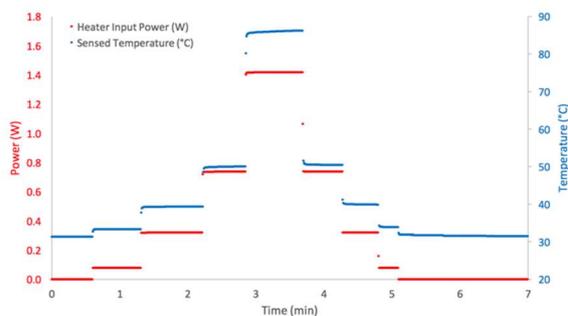


Fig. 14 ヒータの消費電力と温度の関係

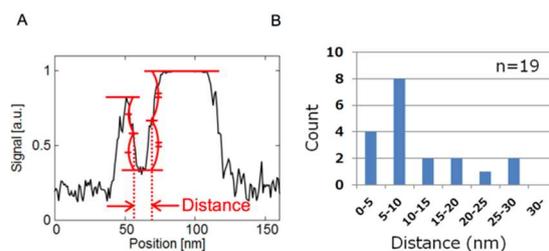


Fig. 15 粒子間隔の計測結果

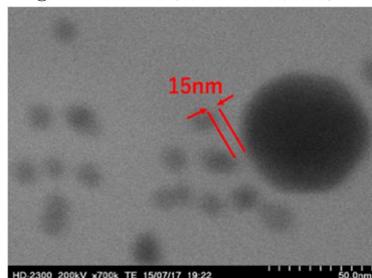


Fig. 16 Au ナノ粒子を TEM で観察。黒い影が Au ナノ粒子に相当する。Au ナノ粒子の間隔は理論値と一致している。

#### 4-4 生体試料の観察

##### 4-4-1 抗体-抗原反応試料の観察

作成したナノチャンネルデバイスを用いて、生物学的に重要なサンプルをいくつか観察した。まず、TEM 像の可視化マーカーとして金ナノ粒子を使用した。抗体に直径 60nm、抗原に直径 15nm の粒子を付加し、反応させた。抗体-抗原反応の結果、大きな粒子の周りに小さな粒子が付着した像を溶液中で得ることができた (Fig. 15)。大小の粒子の間隔を 19 例について測定したところ、5-10nm の間隔が 8 例、0-5nm の間隔が 4 例見られた。抗体分子と抗原分子の長さは、それぞれ 10nm と 5nm であるた

め、複合分子の長さはおよそ 15nm と推定できる。実験で得た間隔は、この考察から導かれた値と概ね一致している。これらの測定は、試料乾燥後ではなく液体中で行ったため、より実際に即した状態を観察できたと言える。

#### 4-4-2 カリクサレンとタンパクの反応の観察

銀ナノ粒子カリサレン複合体は、血栓の形成に關与するタンパク質と相互作用をすることが知られている[5]。タンパクの溶液に、銀ナノ粒子カリサレン複合体の溶液を混合しナノチャンネルデバイスに封入した。カリクサレンが、たんぱく質を介して結合することで銀ナノ粒子同士が凝集する過程を TEM で観察できた。この反応は数から十時間にわたって徐々に進むことが分かった。

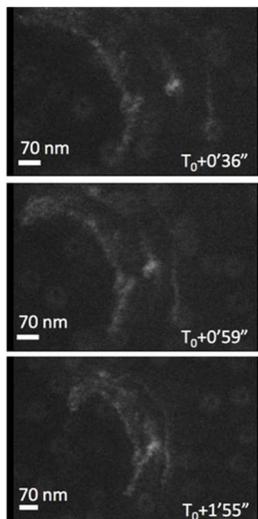


Fig. 17 Ag ナノ粒子の TEM 像の結果。Z コントラストモードで観察したため、Ag ナノ粒子は白く表示させる。Ag ナノ粒子がカリクサレンの効果によって集まった。

本研究の結果、以下のような成果を得た。

- (1) グラフェンを隔壁に用いた TEM 液体セルについては、4nm の高い分解能を達成することができた。
- (2) ナノチャンネルを集積した一体型液体セルでは、EELS 測定が可能で、流路内の水の存在を判定する客観的な検出方法を得た。また、液体の封入に掛かる時間を大幅に短縮し、封止の信頼性も向上できた。
- (3) 温度制御用のヒータと温度センサを内蔵した液体セルを作り、ヒータに通電することで溶液を 85°C 程度まで昇温できた。
- (4) 金ナノ粒子を可視化マーカーとして、抗体-抗原反応試料を溶液中で観察した。反応によりナノ粒子のペアが生成したが、粒子同士の間隔は反応で生成する分子の大きさと概ね一致した。
- (5) カリクサレンとタンパクの反応過程を連続的に観察することによって、カリクサレン粒子が血栓を生成する際に凝固する動特性を知ることができた。

#### 参考文献

- [1] N. Kodera, et. al. *Nature* **468** (2010) 72-76.
- [2] J.-M. Yuk, at al., *Science* **366** (2012) 61.
- [3] T. Fujita, et al., *Nat. Mat.* **11** (2012) 775-780
- [4] C.Sato, et. al. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **417** (2012) 1213-1218
- [5] Y.Tauran, et. al. *Molecules* **18**(5) (2015) 5993-

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) T. Sato, E. Tochigi, T. Mizoguchi, Y. Ikuhara, H. Fujita, “An experimental system combined with a micromachine and double-tilt TEM holder” *Microelectronic Engineering*, Vol.164, pp 43–47, 2016 (査読有り)
- (2) G.Perret, P.Ginet, M.C. Tarhan, A. Baccouche, T. Lacornerie, M. Kumemura, L. Jalabert, F. Cleri, E. F. Lartigau, B. J. Kim, S. L. Karsten, H. Fujita, Y. Rondelez, T. Fujii, D. Collard “Nano systems and devices for applications in biology and nanotechnology” *Solid-State Electronics*, Vol. 115, Part B, pp.66-73, 2016(査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

- (1) H.Fujita, “Bio-Conjugated MEMS for Progress in Medicine” *IEEE-NANOMED*, Kaohsiung, Taiwan, 2014
- (2) G.Valet, T.Sato, L.Jalabert, M.Egawa, Y. Takayama, H.Fujita “Toward a Lab-In-TEM by Combining Application Specific MEMS with TEM” 7th Asia-Pacific Conf. on Transducers and Micro/Nano Technologies, Daegu, Korea, 2014
- (3) T. Sato, E. Tochigi, T. Mizoguchi, Y. Ikuhara, H. Fujita, “Experimental system combined with a micromachine and double-tilt TEM holder” *MNE2015*, Hague, Netherlands, 2015
- (4) G.Valet, M.Kumemura, L.Jalabert, Y. Takayama, T.Sato, H.Fujita, “マイクロ流体バルブを集積した TEM 観察のための液体セル” 第 3 1 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 島根, 2014
- (5) 松井遼平, 高山由貴, 久米村百子, 藤田博之, “SiN 製薄膜ナノチャンネルによる液中の金ナノ粒子の TEM 観察” 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 32 回研究会講演要旨集, 福岡県北九州市, 2015
- (6) 松井遼平, 高山由貴, Laurent Jalabert, 佐藤隆昭, 藤田博之, “水中生体分子の高分解能アクティブ観察に向けたグラフェン隔壁を持つ TEM 用 MEMS リキッドセル” 平成 27 年電気学会センサ・マイクロマシン部門大会 第 32 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム論文集, 新潟, 2015

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 博之 (FUJITA, Hiroyuki)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：90134642