

Cryo-SEMの紹介

日本電子株式会社

はじめに

SEM観察において試料が具備すべき条件

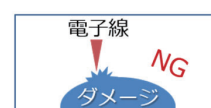
1) 固体であること



2) 真空内で収縮、変形しないこと



3) 電子線の照射により物理的、化学的に安定であること



4) 導電性があること



はじめに

具備すべき条件を満たさない試料でもSEM観察のニーズは多い

- ・ 生物系含水試料（生体、食品等）
- ・ 非生物系含水試料（高分子エマルジョン、医薬品、化粧品、塗料等）
- ・ 融点(T_m)、ガラス転移温度(T_g) の低い材料（ハンダ、ゴム、樹脂等）
- ・ 蒸気圧の高い材料（ナフタリン等）

はじめに

前提条件から逸れた試料のSEM観察法

- ・ 低真空観察
- ・ 低温観察（Cooling stage）
- ・ 化学固定（化学固定→脱水→表面張力の影響しない乾燥）
- ・ 物理固定（凍結状態試料の直接観察）
- ・ その他（環境SEM、大気圧SEMなど）

➡ Cryo-SEM



Cryo-SEMの概要

Cryo-SEM

Cryo-SEMとは

物理固定（凍結）した **含水試料等** を、凍結状態のまま 直接 観察する

電子線照射による **熱損傷を受けやすい試料** の 損傷を 防ぎながら 観察する

Cryo-SEM

Cryo-SEMの種類

クライオシステム（FE-SEM、FIB用）

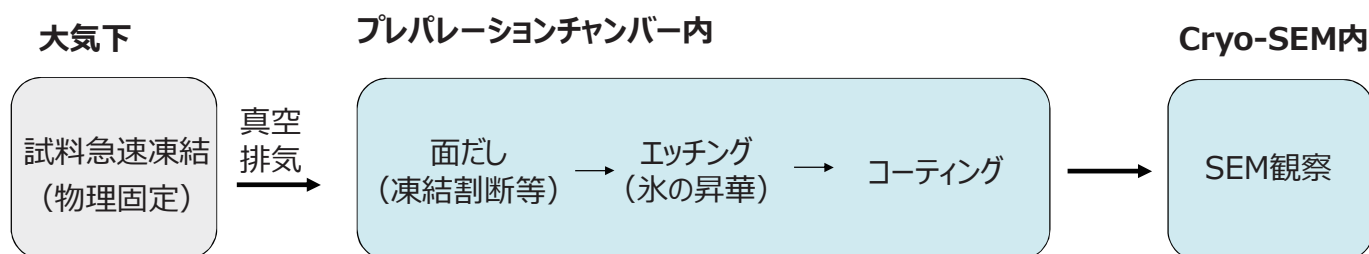
W-SEM等 専用 クライオシステム

LV冷却ホルダー を 使用した 簡易クライオシステム

Solutions for Innovation JEOL

Cryo-SEM

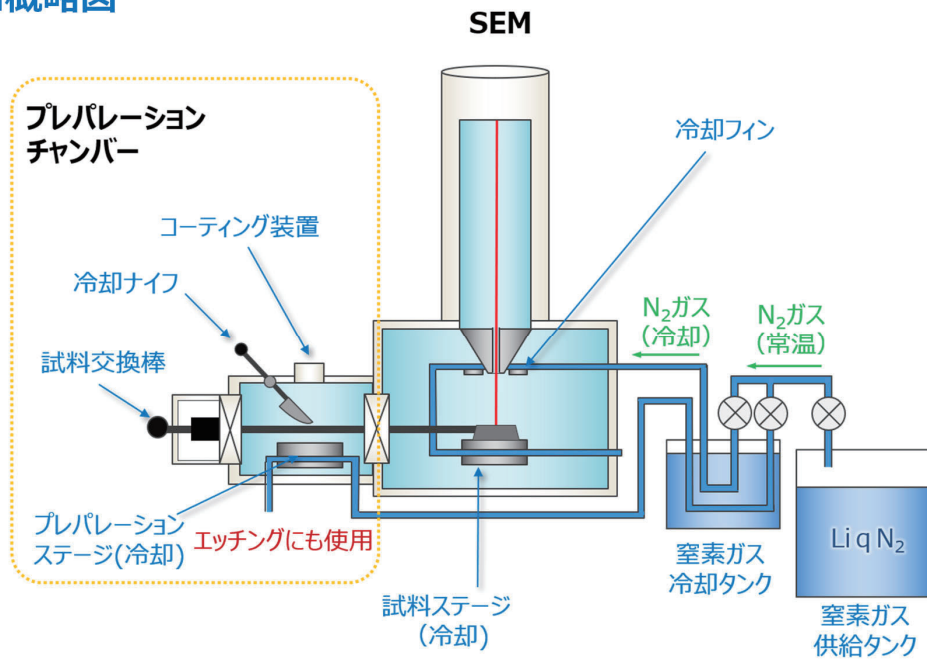
Cryo-SEMによる一般的な含水試料の観察手順



Solutions for Innovation JEOL

Cryo-SEM

Cryo-SEM概略図

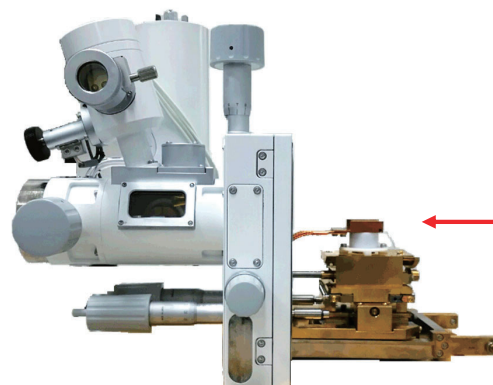


Solutions for Innovation JEOL

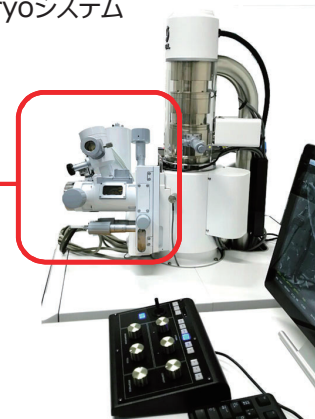
汎用Cryoシステム

Cryoシステム 外観

Cryoシステム



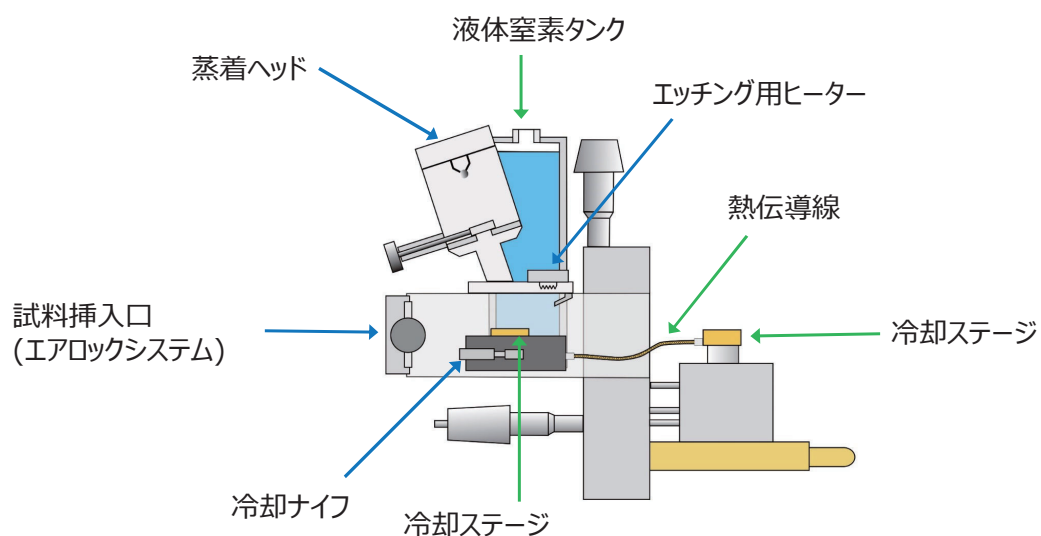
W-SEMに取り付けた
Cryoシステム



Solutions for Innovation JEOL

汎用Cryoシステム

Cryoシステム 概略図



Solutions for Innovation JEOL

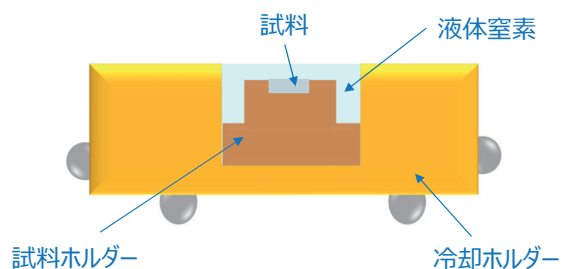
簡易クライオ法

大容量型 LV(低真空)冷却ホルダー

外観



概略図



試料周辺の液体窒素によって試料と大気を遮断し、試料セット時に発生する霜を防ぐ

Solutions for Innovation JEOL

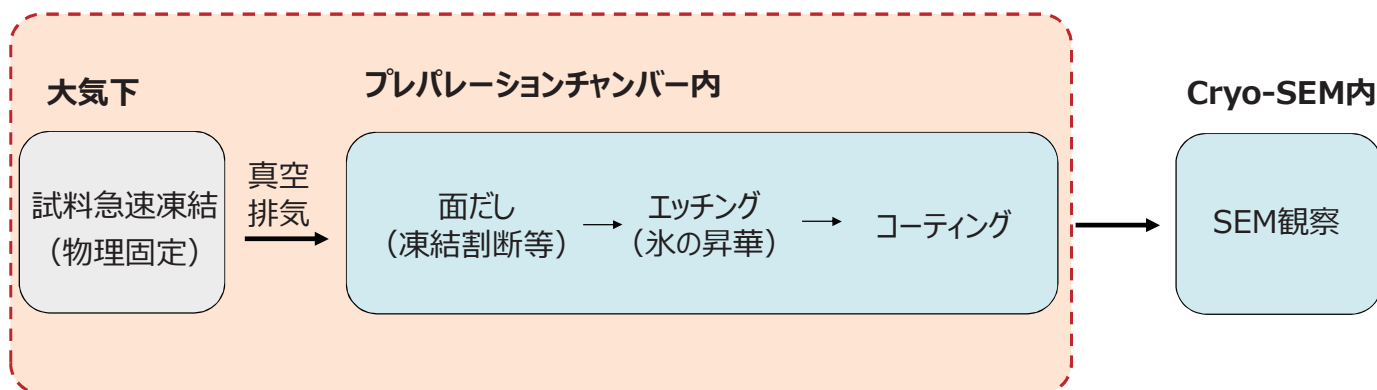


前処理

Cryo-SEM

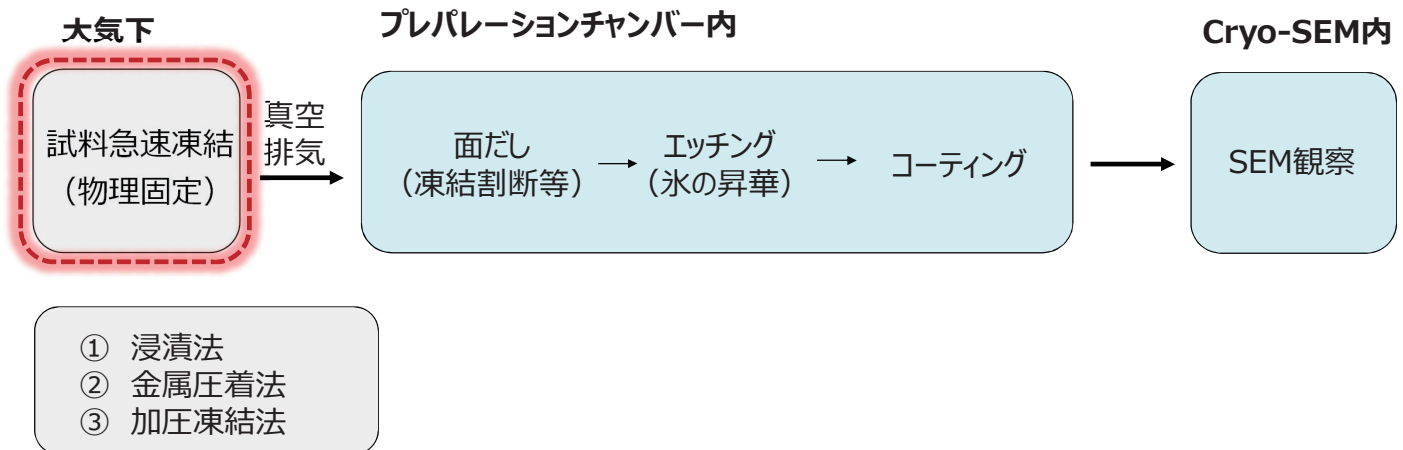
一般的なCryo-SEM観察の手順

前処理部分



Cryo-SEM

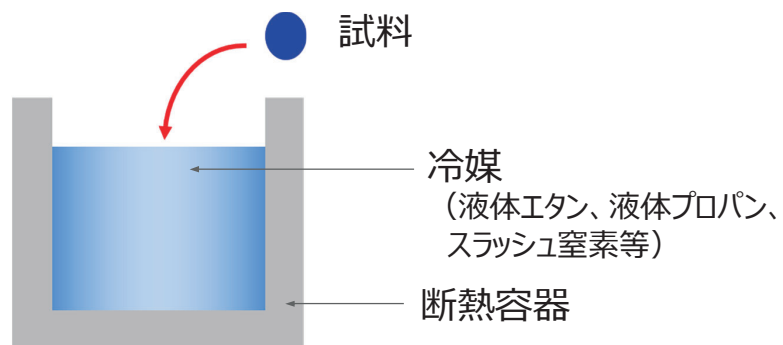
一般的なCryo-SEM観察の手順



Solutions for Innovation JEOL

急速凍結

① 浸漬法

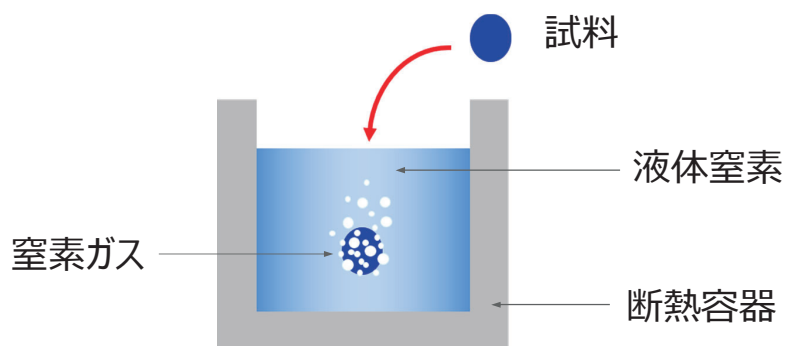


微細形態が保持される深度 ⇒ 表面から 5~10 μm 程度

Solutions for Innovation JEOL

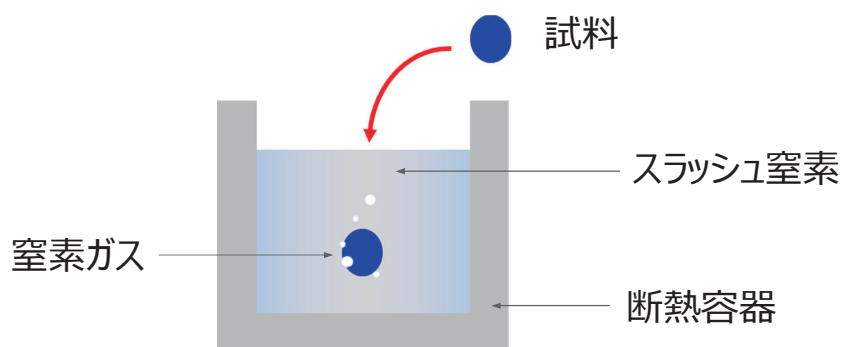
急速凍結

① 浸漬法（スラッシュ窒素）



急速凍結

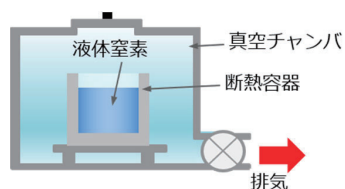
① 浸漬法（スラッシュ窒素）



急速凍結

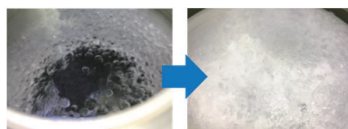
① 浸漬法（スラッシュ窒素）

1) 液体窒素を入れた真空チャンバーを減圧



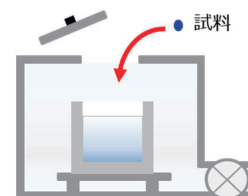
チャンバーを閉じて排気
(真空引き)

2) スラッシュ窒素の作製



半固体窒素になるまで排気と
リークを繰り返す

3) 試料の凍結

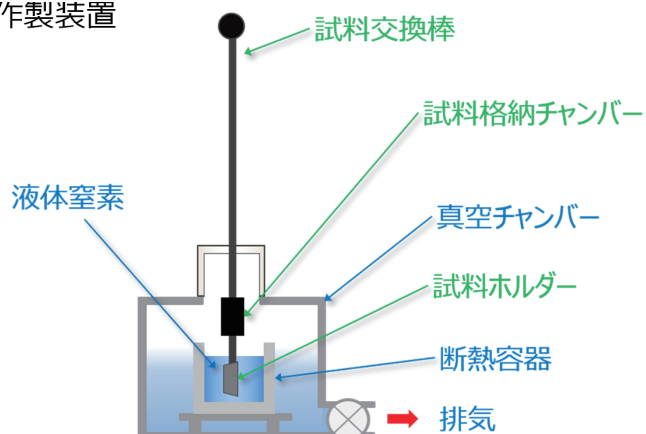


大気に戻して試料を投入

急速凍結

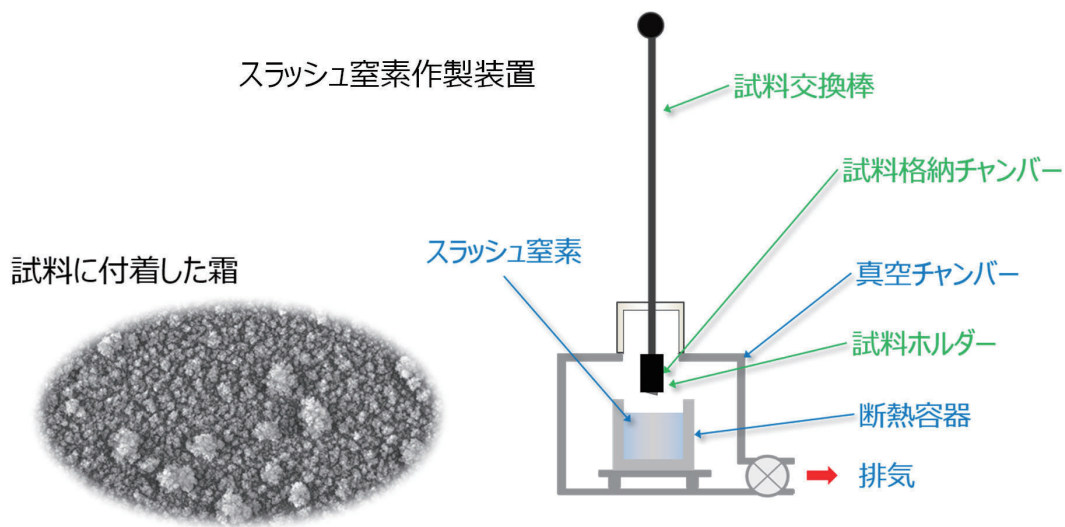
① 浸漬法（スラッシュ窒素）

スラッシュ窒素作製装置



急速凍結

① 浸漬法（スラッシュ窒素）

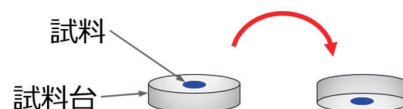


Solutions for Innovation JEOL

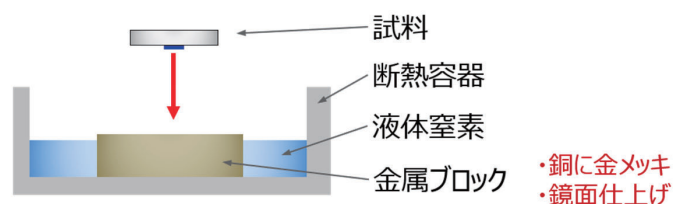
急速凍結

② 金属圧着法（メタルコンタクト）

1) 試料台に試料をできるだけ薄く塗り、逆さに向ける



2) 冷却しておいた金属ブロックに、試料を垂直に圧着する



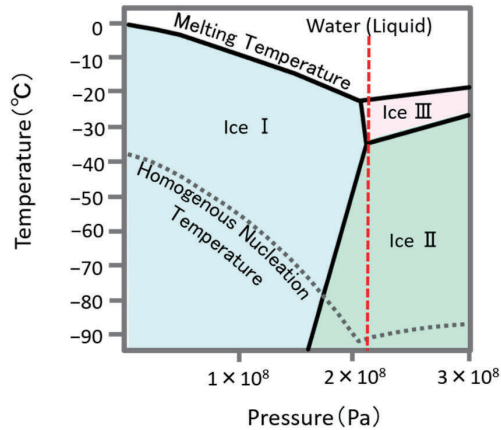
微細形態が保持される深度 ⇒ 表面から 20 μm 程度

Solutions for Innovation JEOL

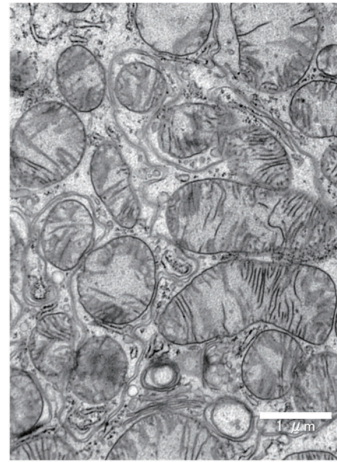
急速凍結

③ 加圧凍結法

水の状態図



ラット腎臓



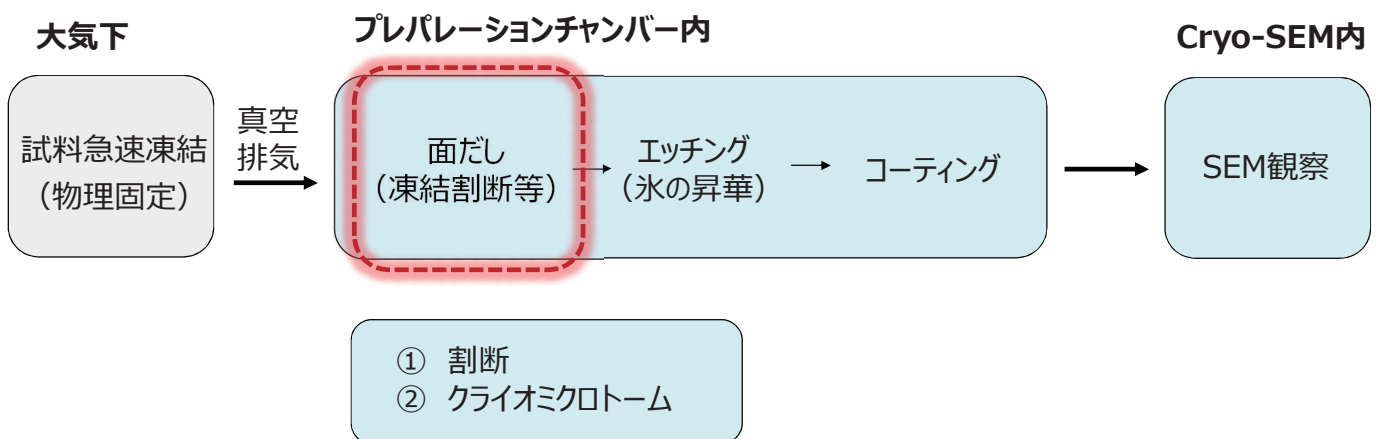
試料：ラット腎臓
加圧凍結 凍結置換法
酢酸ウラン・クエン酸鉛染色
TEM像

微細形態が保持される深度 ⇒ 表面から 200 μm 程度

Solutions for Innovation JEOL

Cryo-SEM

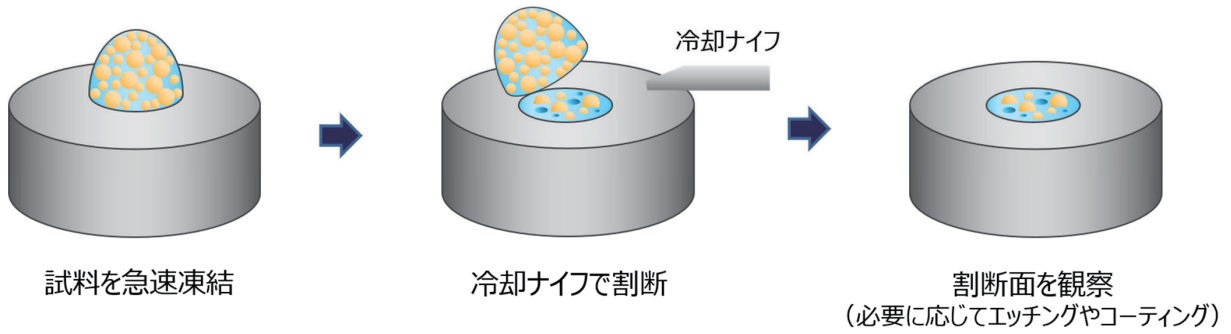
一般的なCryo-SEM観察の手順



Solutions for Innovation JEOL

面だし法

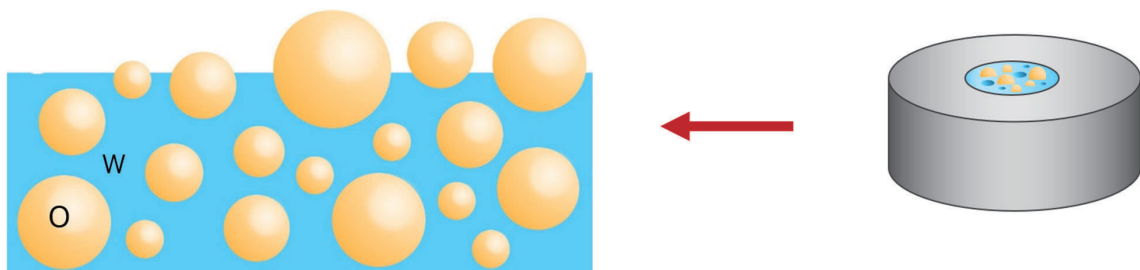
① 凍結切断法



面だし法

① 凍結切断法

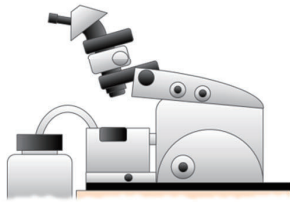
切断した試料の断面図



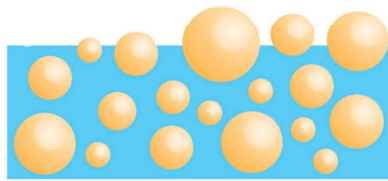
面だし法

② クライオミクローム

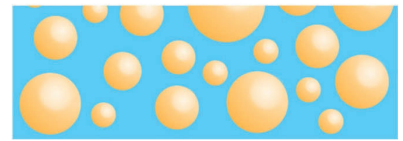
クライオミクローム 概略図



界面で割る ⇒ 凍結切断



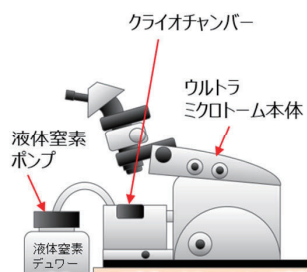
断面を出す ⇒ クライオミクローム



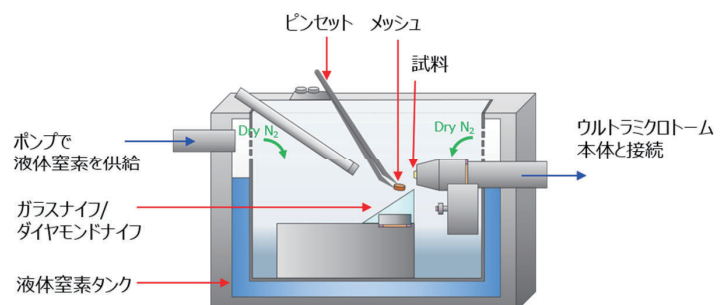
面だし法

② クライオミクローム

クライオミクローム 概略図

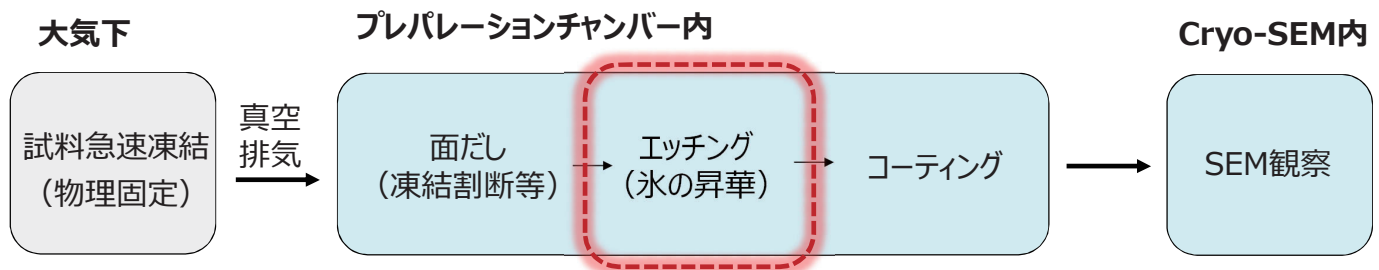


クライオチャンバ断面図



Cryo-SEM

一般的なCryo-SEM観察の手順

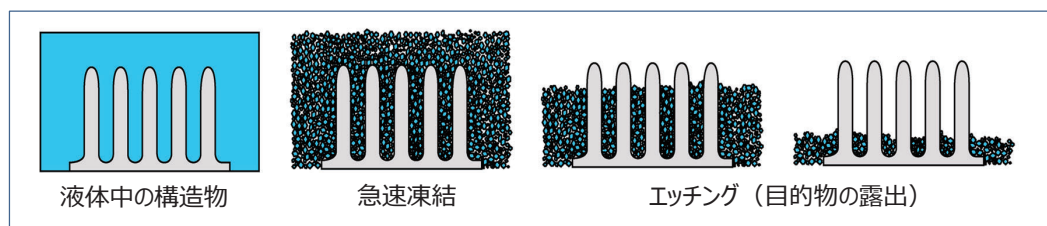


Solutions for Innovation JEOL

エッチング

凍結試料表面や内部の氷を昇華させる

エッチングにより、氷に覆われていた試料内部の構造物を露出させて形状を観察する



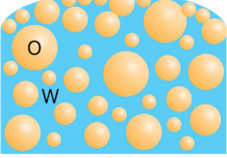
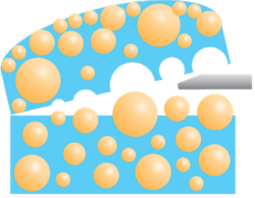
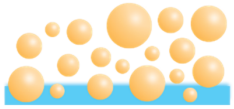
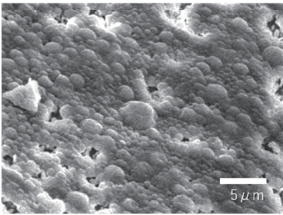
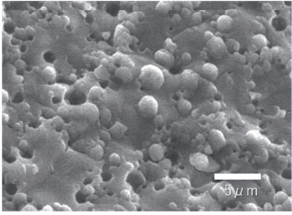
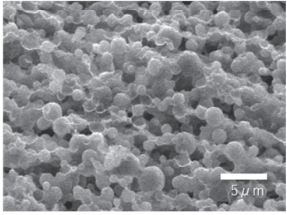
エッチングの方法

- 方法1 冷却ステージ温度設定
→ 冷却ステージの温度を -90°C ~ -100°C に設定する
- 方法2 輻射熱
→ 試料の上に設置したヒーターで試料表面の温度を上げる

Solutions for Innovation JEOL

割断とエッチング

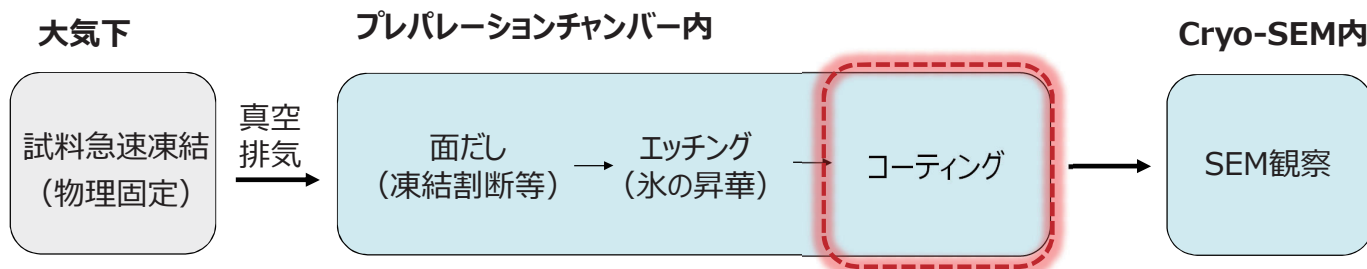
割断前後とエッチング前後の画像の違い

	割断前	割断面 (エッチング前)	割断面 (エッチング後)
エマルジョン 断面模式図	O/Wエマルジョン 		
SEM像			 試料：生クリーム

Solutions for Innovation JEOL

Cryo-SEM

一般的なCryo-SEM観察の手順

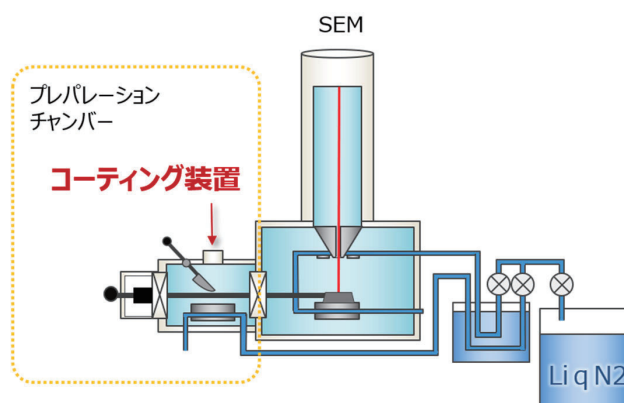


Solutions for Innovation JEOL

コーティング

必要に応じてAu、Pt、C等をコーティング

- ・ プレパレーションチャンバーに 蒸着装置 または スパッタ装置 を 装着可能
- ・ コーティングせずに、低加速電圧や 低真空モードで 観察することもある

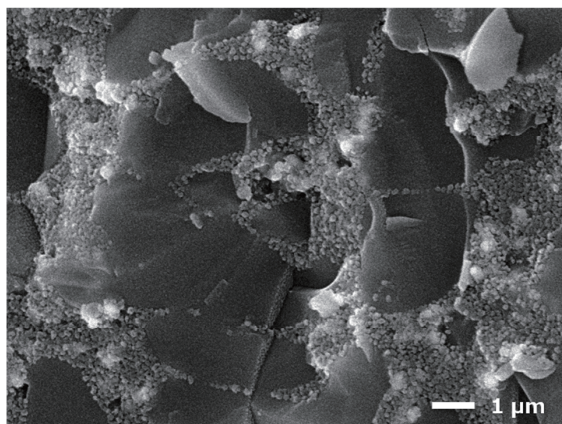


Solutions for Innovation JEOL 

アプリケーション

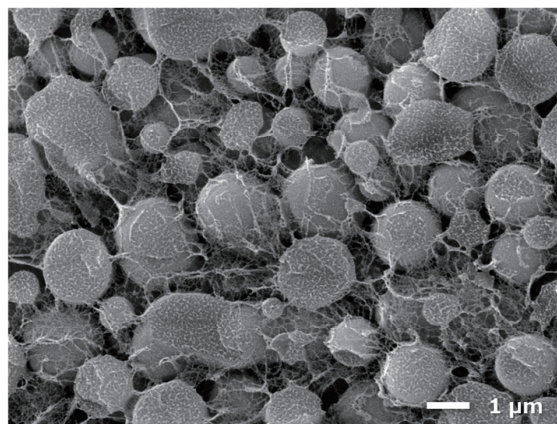
アプリケーション 1

水性塗料（アクリル樹脂系）



急速凍結（液体窒素） 凍結切断
エッチング Au蒸着 Cryo-SEM観察

木工用接着剤（酢酸ビニル55：水45）

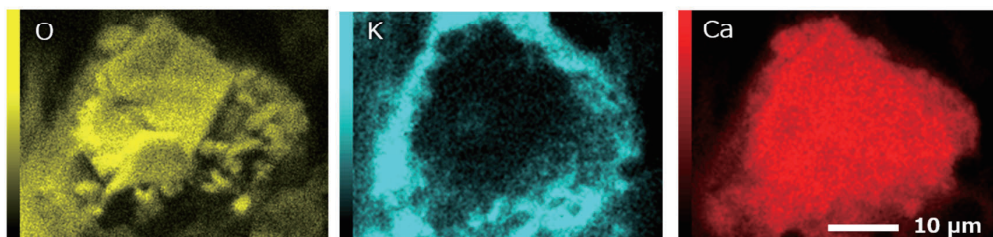
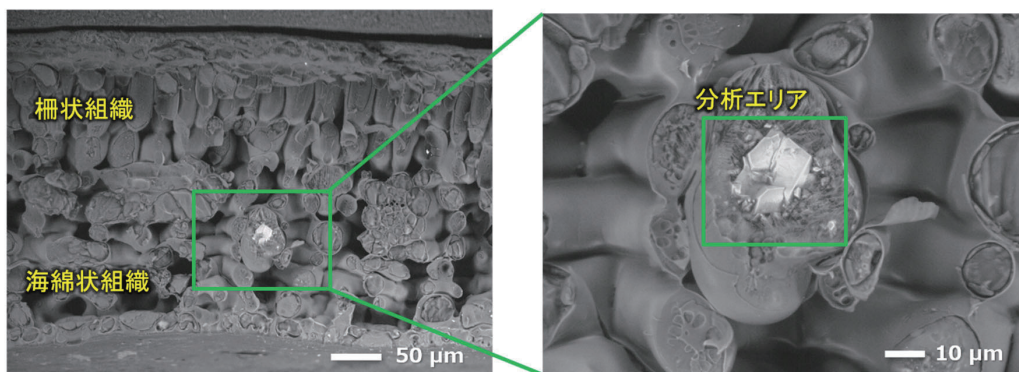


急速凍結（液体窒素） 凍結切断
エッチング Au蒸着 Cryo-SEM観察

Solutions for Innovation JEOL

アプリケーション 2

サザンカの葉

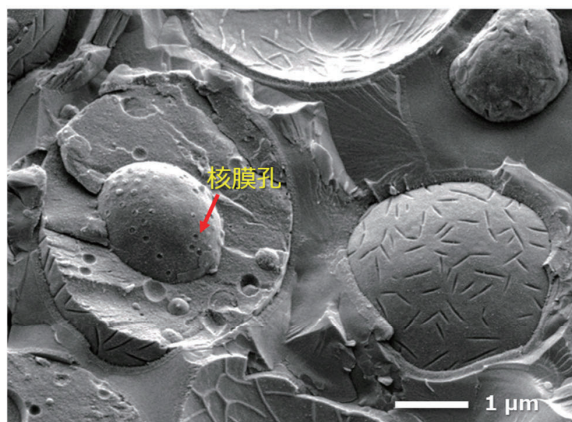


急速凍結（スラッシュ窒素）
凍結切断 エッチング Ptスパッタ
Cryo-SEM観察/EDS分析

Solutions for Innovation JEOL

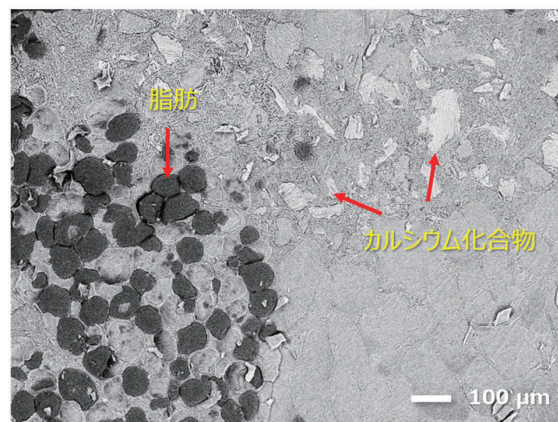
アプリケーション 3

パン酵母



急速凍結（液体窒素） 凍結切断
Ptスパッタ Cryo-SEM観察

ハム



急速凍結（液体窒素）
無蒸着 Cryo-SEM観察（低真空モード）

Solutions for Innovation JEOL

まとめ

Cryo-SEM

- ・ 物理固定（凍結）した **含水試料等** を、凍結状態のまま 直接 観察する
- ・ 電子線照射による **熱損傷を受けやすい試料** の 損傷を 防ぎながら 観察する
- ・ 観察目的に合わせた前処理（急速凍結、切断、エッチング、コーティング）
- ・ 化学固定とは異なる知見が得られる

Solutions for Innovation JEOL

ご清聴ありがとうございました