



研究技術紹介

集束イオンビーム (FIB) 加工装置による微細藻類断面の観察

鈴木 秀和¹, 大石 喜久², 檀 紫², 南雲 保³

¹ 青山学院高等部 150-8366 東京都渋谷区渋谷 4-4-25

² (株) 日立製作所テクノリサーチセンタ 312-8504 茨城県ひたちなか市市毛 882

³ 日本歯科大学生物学教室 102-8159 東京都千代田区富士見 1-9-20

Hidekazu Suzuki¹, Yoshihisa Ooishi², Yukari Dan² and Tamotsu Nagumo³ 2001. Observations of microalgal cross sections with a Focused-Ion-Beam (FIB) system. Jpn. J. Phycol. (Sôrui) 49: 7 - 10.

Focused-Ion-Beam (FIB) system is applied to prepare the cross sections of microalgal cell for scanning electron microscope (SEM). This is very useful for the observation on the internal structures and cross sections of various microalgae without being damaged.

Key Index Words: cross-sectioning, FIB, focused ion beam, sample preparation.

¹ Aoyama Gakuin Senior High School, 4-4-25 Shibuya, Shibuya-ku, Tokyo 150-8366, Japan

² Techno Reserch Lab., Hitachi Instruments Engineering Division, Hitachi, Ltd., 882 Ichige, Hitachinaka-shi, Ibaraki 312-8504, Japan

³ Department of Biology, The Nippon Dental University, 1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan

集束イオンビーム (Focused Ion Beam; FIB) 加工観察装置は、微細加工機能と走査イオン顕微鏡 (Scanning Ion Microscope; SIM) による観察機能を持つ最新の機械といえる。近年半導体、金属、セラミックなど、これまで薄切や微細なエッチングなどに膨大な時間が必要とされた分野において、特定箇所の透過電子顕微鏡 (TEM) 観察試料作製や微細断面観察用試料作製のツールとして広く活用されつつある (Ishitani & Yaguchi 1996)。また生物試料においても、柔らかい組織をその構造を壊すことなく断面試料作製が可能であり、さらに部分的に表面物質を除去し内部構造を観察した例も報告されている (Ishitani *et al.* 1995)。

筆者らは主に工業的利用を目的として開発されたこの FIB 装置を用い、普通の方法では得られない、微細藻 (珪藻類, パルマ藻, 円石藻) の断面加工を行い、走査電子顕微鏡 (SEM) による観察を行った。筆者らは既にこの方法によって得られた観察結果を報告しているが (Suzuki *et al.* 2001), 本報では FIB の基本的な原理と観察例を紹介する。

FIB 加工装置の原理

FIB 加工装置の外観は、SEM とほぼ同じである (図 1)。しかし FIB 加工装置は電子ではなく、ガリウム (Ga) イオンを照射する。図 2 に FIB 加工観察装置 (日立: F-3000FB) の概略構成を示す。加速電圧 30 kV のイオン源から引き出したガリウムイオンを集束レンズと対物

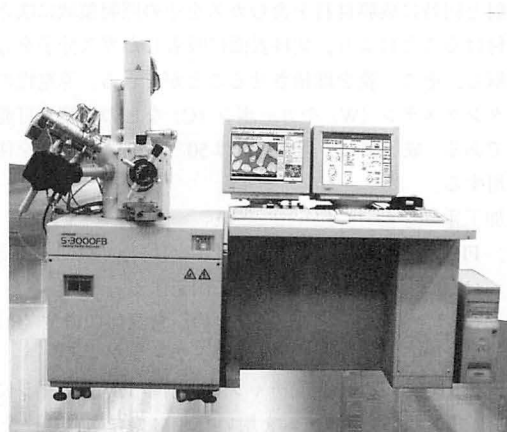


図 1 FIB 加工装置の外観 (F-3000FB)

レンズでFIBを形成し、試料に照射する。この時、試料表面からスパッタリング現象により多くの試料構成原子（中性）と共に二次荷電粒子である電子やイオンも放出される。偏向器でFIBを試料上で走査し、この走査信号と同期させて放出二次荷電粒子（通常は二次電子）の検出器強度を輝度信号として走査画像を形成すると、SIMによる試料表面が観察できる。さらに、ビーム照射の領域を特定することにより観察したい個所の加工ができる。

絞り（可変）は大きさの違うビーム電流/径を作るためのものであり、加工体積に応じて切り換える。適切な加工ビームを選択することにより、効率的な加工ができる。ビームを電界で強制的に曲げる部分をプランカと呼び、絞りの切り換えやステージを使った移動の際、試料表面の不用意なスパッタリングを避けるため使用する。アライナ・ステイグマはFIBの光軸および断面形状を調整するために設けてある。加工面の仕上がりが良否および観察時の像分解能は、これらの調整に大きく依存する。加工ビームは、通常、ビーム電流(Ip)は20pA～15nA、ビーム径(dp)は20nm～1mmである。一方、微細な観察用ビームは、レンズ条件と小径絞りとを組み合わせてよりIpは数pA、dpは約10nmに設定する。

FIB加工は、物理スパッタリング現象を利用した加工であり、加工材料の制限は少ない。加工効率は材料にも依存し、 $0.2\sim 0.8\text{mm}^3\text{nA}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度である。また、機械加工に付随しているマクロ的応力（せん断、圧縮、引張）を伴わないため、応力レスの加工である（図3）。

FIBには、加工（削る）、観察（観る）の他に、成膜（着ける）の機能がある。この成膜（デポジション）は、加工部の表面保護が必要な場合に利用する。FIBの照射と同時に成膜材料を含むガスをその照射領域に吹き付けることにより、試料表面に吸着したガス分子を分解し、そこに膜を堆積させることができる。導電性のタングステン(W)やカーボン(C)などの成膜が可能である。成膜には、通常、Ipは50～200pAのFIBを使用する。

加工手順

FIB断面加工手順を「珪藻」に適用して説明する。

- (1) 試料（珪藻）を試料台に固定する。
- (2) チャージアップを防ぐため試料表面に白金(Pt)を厚さ数10nmプラズマコーティングする。
- (3) 試料台をFIB装置チャンバー内の試料ステージに載せ、観察ビームを用いたSIM像により珪藻を観察する。

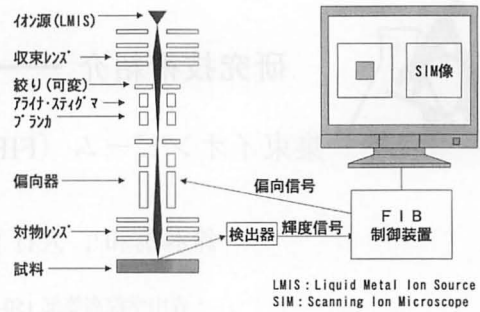


図2 FIB装置の動作原理

(1) 観る (SIM像)	(2) 削る (Sputtering)	(3) つける (Deposition)
FIB 走査 → イオン 電子 試料	FIB 走査 → 原子 試料	FIB 走査 → CO W(CO) ₆ W 試料
<ul style="list-style-type: none"> ・ 表面/断面観察 ・ 加工位置決め 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 断面/薄膜作製 ・ 切断/穴あけ 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 保護膜形成 ・ 配線

図3 FIB装置の機能

(4) FIB加工領域を特定し、加工ビームの選択と加工時間の設定を行う。

(5) 第1の加工（粗加工）では、所望断面の手前部分を除去し、断面を斜め方向からSIM観察ができるようにする。加工途中の形状は、加工ビームによるSIM像でリアルタイムに視覚的にモニターできる。

(6) 第2の加工（仕上げ加工）では、粗加工した断面をさらに平坦に削る。

(7) 試料ステージを傾斜し、仕上げ断面の状態をSIM像で観察する。追加加工が必要な場合は、再度、仕上げ加工を行う。

この加工例における総FIB加工時間は30～60分である。また、FIB成膜は用いていない。本加工例では、FIB加工の特徴である(1)所望位置での断面加工、(2)視覚的な加工プロセス、(3)材料制限の少ない加工、および(4)応力レスの加工、のいずれもが活用されている。

観察例

1) 珪藻類

珪藻の分類・同定において殻あるいは被殻の断面を観察することは、種の特徴や近縁属との類縁を検討す

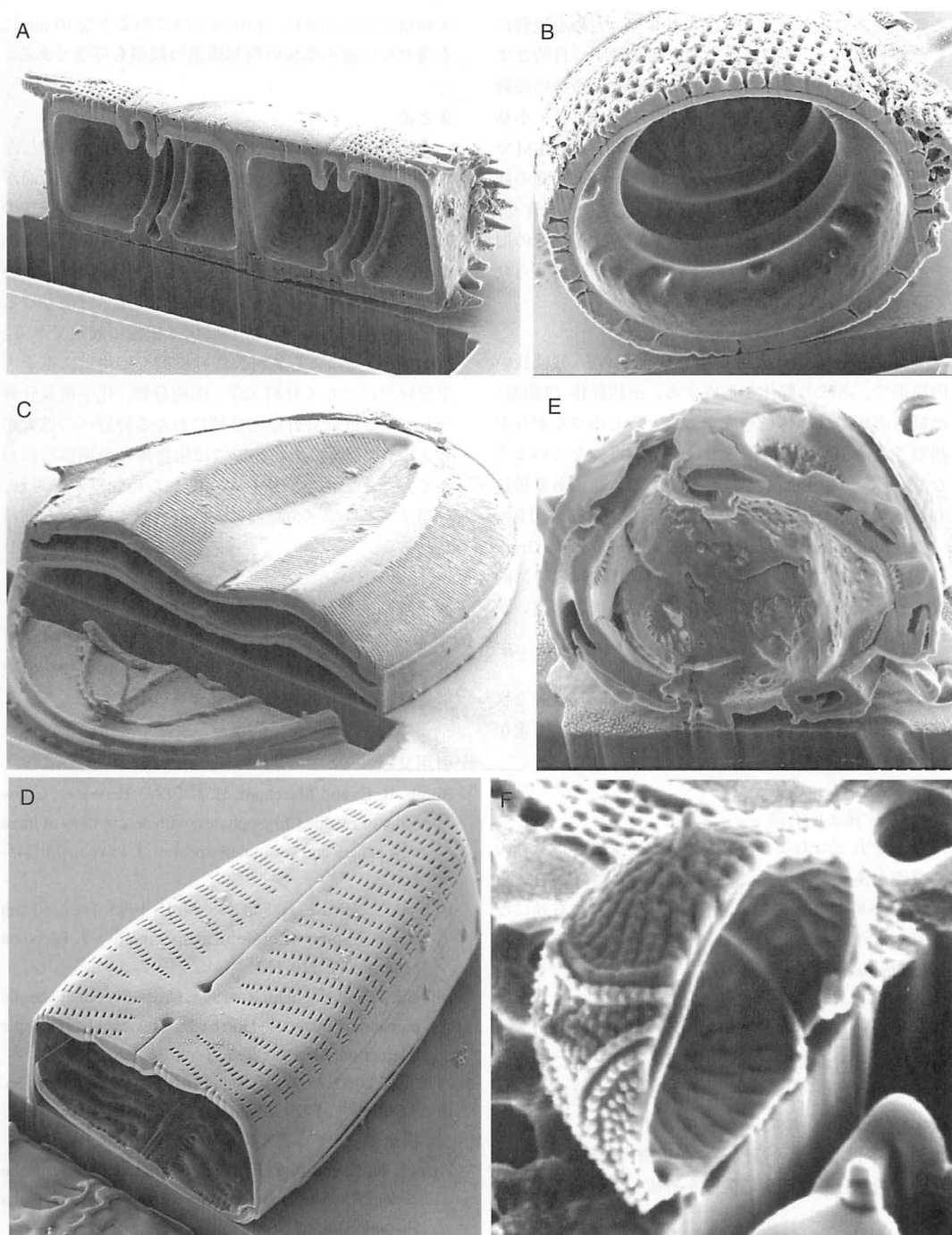


図4 A. *Aulacoseira* sp. (珪藻) の被殻縦断面 (2細胞)
 B. *Aulacoseira* sp. (珪藻) の殻横断面
 C. *Cocconeis pseudomarginata* var. *intermedia* (珪藻) の被殻横断面
 D. *Navicula reinhardii* (珪藻) の被殻横断面
 E. *Emiliana* sp. (円石藻) の細胞断面
 F. *Tetraparma* sp. (バルマ藻) の断面

る際に重要である。筆者らはこれまで、先端を鋭利にした針を用いて、珪藻被殻や殻を顕微鏡下で目的とする部分を目がけて割る、あるいは超音波洗浄機の波動によって割るという方法を用いてきた(南雲・小林 1979)。しかしこの方法では完全な殻の断面を SEM で観察することは不可能であった。そこで従来断面の観察には、TEM 試料作成法を用い、樹脂包埋試料を作り、薄切片を作成した後、樹脂を溶かし(脱樹脂)、その面を SEM で観察するという時間の掛かる方法がとられていた(Pocock & Cox 1982)。

Aulacoseira sp.

本属は淡水産の代表的な中心珪藻である。殻は長い円筒形で、糸状の群体を形成する。糸状群体(2細胞)の縦断面観では群体を形成する殻どうしのつながりが観察される(図A)。手作業では絶対不可能なこのような試料作製が FIB 加工では容易である。肋にある種特有の唇状突起の形態とその位置が観察される(図B)。

Cocconeis pseudomarginata Greg. var. *intermedia* Grun.

着生珪藻の代表的な属の一種である。本属に特徴的な、上殻と下殻の厚さの違いや、湾曲の程度の違いが観察される(図C)

Navicula reinhardtii Grun.

典型的な羽状珪藻の形態をもつ種である。上下2枚の殻の組み合わせ部、および縦溝や胞紋の断面構造が観察される(図D)。

2) パルマ藻と円石藻

それぞれピコおよびナノプランクトンと呼ばれ極めて微細な藻類であり、これらの種の同定には SEM や TEM は不可欠なものであり、FIB 加工も今後有効になるであろう。

Emiliania sp.

円石藻はハプト藻綱に属し、炭酸カルシウムを主成分とする細胞外被である円石(coccolith)を持つ。円石には同心円および放射状の模様があり、種に固有の様々な形態に分化している。この微細形態は種の記載において重視されている特徴の1つである(河地 2000)。本種では上下2枚の盤が中央の円柱で連結し、互いに噛み合って球形の被殻を形成しているのが観察される(図E)。

Tetraparma sp.

パルマ藻は現時点で黄金色藻綱に属しているが(Booth & Marchant 1987)、分類・系統上の位置についての手がかりが全く得られていない。珪酸質でできた複数の鱗片が互いに隙間なく連結し合うプレート構造

が観察される(図F)。FIB 加工はこのような 10 μm にも満たない微小藻類の内部構造の観察も可能である。

まとめ

今回用いた FIB 加工は複雑な処理工程や熟練した"技"を必要とせず、ごく短時間に観察したい切断面が得られる。また本報で紹介した珪藻類のような中空の試料においても、その構造を損傷することなく断面加工を施すことができる。さらに FIB は、断面試料作製でなく材料表面を指定した領域および深さで削り取ることも可能である。しかも形状は任意に設定できる。FIB 加工技術による試料製作の展開や応用は、電子工学分野だけでなく材料工学、医療分野、化学産業分野そして基礎研究分野など多岐にわたる分野への拡大が考えられる。特に生物分野では生物体の形態観察において、今までにない新しい角度からの知見が得られ、分類学や系統学への発展に大いに貢献するものと期待される。

謝 辞

本報をまとめるにあたり、貴重な試料をご提供下さった筑波大学生物科学系井上勲教授、国立環境研究所河地正伸主任研究員に感謝する。

引用文献

- Booth, B. C. and Marchant, H. J. 1987. Parmales, a new order of marine Chrysophytes, with descriptions of three new genera and seven new species. *J. Phycol.* 23: 245-260.
- Ishitani, T., Hirose, H. and Tsuboi, H. 1995. Focused-Ion Beam digging of biological specimens. *J. Electron Microsc.* 44: 110-114.
- Ishitani, T. and Yaguchi, T. 1996. Cross-Sectional sample preparation by focused ion beam: a review of ion-sample interaction. *Microsc. Res. Tech.* 35: 320-333.
- 河地正伸 2000. ハプト藻類. 月刊海洋 号外 (21): 51-56.
- 南雲保・小林弘 1979. *Pinnularia sundaensis* Hust. の縦裂構造について. 日本歯科大学紀要 1979: 149-161.
- Pocock, K. L. and Cox, E. 1982. Frustule structure in the diatom *Rhabdonema arcuatum* (Lyngb.) Kütz. *Nova Hedwigia* 36: 621-641.
- Suzuki, H., Tanaka, J. and Nagumo, T. 2001. Morphology of the marine diatom *Cocconeis pseudomarginata* Gregory var. *intermedia* Grunow. *Diatom Res.* 16: in press.