

# 高コントラスト包埋剤の開発

矢矧 東穂（川崎技術支援部 微細構造解析グループ）

## 1. はじめに

顕微鏡による内部構造の観察において試料形態が多孔質、粉体、繊維等の場合は樹脂包埋が一般的に行われている。試料へ樹脂を含浸させた後、樹脂を硬化させることによって、試料の変形を抑えた断面作製を行うことができる。また、電子顕微鏡観察では、得られる像コントラストは試料の原子番号に強く依存している<sup>1,2)</sup>。そのため、包埋に用いる樹脂と試料自体の原子番号が近い場合、明瞭なコントラストを得ることは原理的に難しい。つまり、先述した試料形態をしたカーボン系の試料や高分子試料、生物試料といった軽元素を主成分とする試料をそのまま樹脂包埋した場合、包埋樹脂と試料の間で明瞭なコントラストが付かず、不鮮明な画像となってしまう。この問題の根本的な要因は、包埋樹脂を構成している主成分がC、H、Oといった軽元素であるという点にある。そこで、試料によってはいくつかの方法によってこれらの問題を回避している。主な方法として、試料が高分子試料や生物試料の場合には、試料の分子構造の特定部位に四酸化ルテニウム、四酸化オスミウム、リンタングステン酸、酢酸ウラニル、鉛等の重金属を付加させることによる電子染色が挙げられる<sup>3)</sup>。電子染色を行うことにより、試料に重金属が沈着するため、試料自体のコントラストが向上し、樹脂包埋を行ったとしても視認性が改善される。また、試料の周囲に酢酸ウラニルやリンタングステン酸等の水溶液を滴下した後に観察を行うネガティブ染色法も挙げられる。ネガティブ染色法ではウイルスや細菌の他にセルロースファイバー等もコントラストを改善して観察することができる<sup>4)</sup>。

しかしながら、これらの方法は必ずしも十分ではない。例えば、無機化合物、エンジニアリングプラスチック等では電子染色の効果が小さく、コントラストの向上は期待できない。また、ネガティブ染色法では、対象試料がナノ粒子となり、評価方法も透過電子を用いた方法に限定される。加えてネガティブ染色法では試料を包埋できないため、断面観察には不向きである。そこで、これらの点を顧み、著者は新たな評価手法として高コントラスト包埋剤（特許出願中）を開発した<sup>5)</sup>。開発した包埋剤は重金属を含有しているため、試料を構成している元素の原子番号が小さいほどコントラスト差が大きくなり、明瞭な観察が可能となる。また、固化方法としては自然乾燥を主とする物理的手法（自然乾燥法）とアルデヒド類を用いた化学的手法（架橋法）の2通りの選択肢があり、応用方法の幅も広い。つまり、グラファイトのような軽元素を主成分とする材料に対してこの包埋剤を用いるとその微構造を電子顕微鏡観察下において明瞭に可視化することができる。本報では、市

販のグラファイト粒子を例として高コントラスト包埋剤の効果を検証した結果を報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 グラファイトの微構造観察

定法<sup>5)</sup>に従って調整した高コントラスト包埋剤へ乾燥状態のカーボンペースト粉末（TED PELLA 社、アクアダック）を加えて混合した。その後、自然乾燥法と架橋法により試料を調整した。自然乾燥法では試料はSi ウエハ上で固化させた。比較用には一般的な方法として、同じカーボンペースト粉末をエポキシ樹脂（GATAN 社、G2 Epoxy）へ包埋し、Si ウエハ上で固化させた試料を用意した。

断面観察は次の手順で実施した。自然乾燥法と比較用試料の表面に導電処理としてオスミウムコーター（(株)真空デバイス、HPC-1SW）によりオスミウムをコーティングした。その後、集束イオンビーム装置-走査電子顕微鏡（FIB-SEM；サーモフィッシャーサイエンティフィック社、Scios）により、断面加工と断面観察を行った。加工箇所には予めカーボンデポジションを施した。FIBの加速電圧は30kV、SEMの加速電圧は2kVに設定し、反射電子像を得た。架橋法により作製した試料は数mm角に切り出し、その破片を先述したエポキシ樹脂へ包埋した。その後、試料の端面を機械研磨により露出させ、加速電圧6kVに設定したイオンミリング装置（日本電子(株)、IB-19520CCP）で断面加工と導電処理のためのカーボンスパッタリングを行った。観察はSEM（日本電子(株)、JSM-7800F Prime）により行った。SEMの加速電圧は2kVに設定し、反射電子像を得た。

### 2.2 高コントラスト包埋剤の内部構造確認

試料を含まない高コントラスト包埋剤を調整しSi ウエハ上で自然乾燥法によって固化させたものを試料とした。その試料に対して次の手順で透過電子顕微鏡（TEM）観察を行った。試料表面に導電処理としてカーボンを蒸着した。その後、2-1と同じFIB-SEMにより厚さ100nm以下のTEM試料を作製し、TEM（サーモフィッシャーサイエンティフィック社、Talos）により観察を行った。加工時のFIBの加速電圧は30kV、最終仕上げ時の加速電圧は2kVに設定した。TEMの加速電圧は200kVに設定した。

## 3. 結果及び考察

図1は自然乾燥法と比較試料の断面画像である。図1(a)、(b)の結果より、軽元素のグラファイトの暗色と重金属を含む高コントラスト包埋剤の明色との間で大きなコントラスト差が得られ、観察像の視認性が向上し、グ

ラファイト内部の層状構造を詳細に確認することができる。一方、図 1(c), (d)ではグラファイトとエポキシ樹脂との間でコントラスト差はほとんど得られず、微構造は十分に確認されていない。自然乾燥法は簡便な方法であるが、グラファイトの微構造を SEM で評価する上では十分な効果を示すことが明らかとなった。

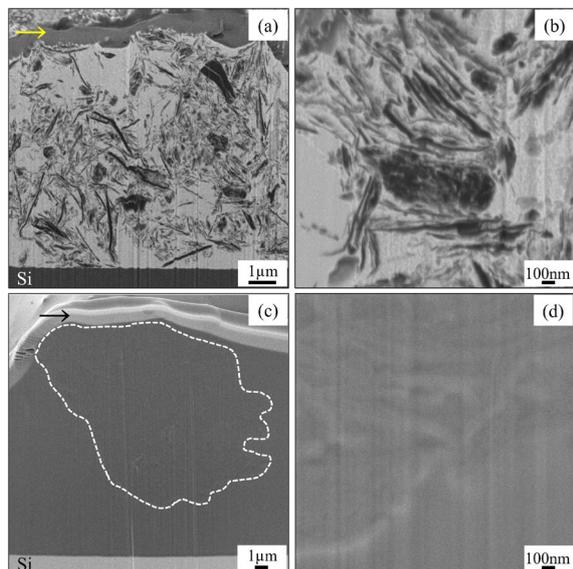


図 1. グラファイトの断面画像。(a), (b) : 自然乾燥法による断面画像。(c), (d) : エポキシ樹脂包埋した試料の断面画像。矢印 : FIB により形成したカーボンデポジション。(c)の白線内にグラファイトの塊が存在している。

図 2 は架橋法による結果である。架橋法では図 2(a)に示すようにペレット状の固化物が得られる。図 2(b)-(d)の結果より、架橋法においても自然乾燥法と同様に軽元素のグラファイトの暗色と重元素を含む包埋剤の明色との間で大きなコントラスト差が得られ、観察像の視認性が向上し、微構造を詳細に確認できる。架橋法ではペレット状の固化物が得られるため、自然乾燥法よりも大型の試料や広範囲の評価への適用が可能となる。

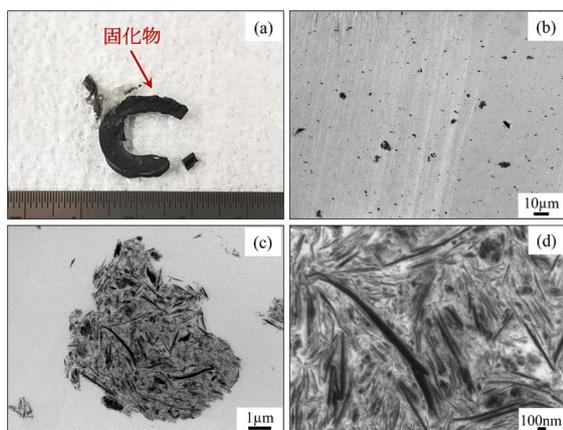


図 2. 架橋法によるグラファイトの断面画像。(a) : 固化物の外観画像。(b) : 固化物内に分散包埋されているグラファイト。(c), (d) : グラファイトの拡大画像。

図 3 は自然乾燥法で得た包埋剤の TEM 像である。図 3(a)

に示す通り、包埋剤内を確認すると 1nm 以下の極めて微細な構造が確認されるが、内部は比較的均質で 1nm 以上の析出物や相分離構造は確認されない。また、図 3(b)の電子線回折の結果からは非晶質パターンが得られた。粗大な析出物や相分離構造が確認されず、さらに非晶質である点は包埋剤としては有利な特徴となる。

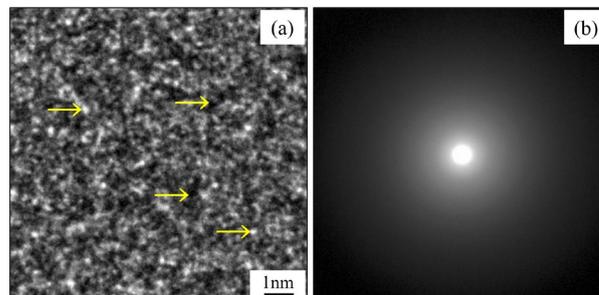


図 3. 高コントラスト包埋剤の内部構造。(a) : TEM 像。(b) : 電子線回折像。矢印 : 包埋剤内部に散見される微細な構造。

#### 4. まとめ及び今後の展開

開発した高コントラスト包埋剤を用いることにより、SEM 観察において、グラファイト粒子を一般的な方法よりも詳細に観察できることが明らかとなった。一般的にグラファイトは数 nm~10nm の層が積層された構造をしている。グラファイトの積層構造はリチウムイオン電池の負極材や固体潤滑剤として用いる際には性能や寿命を左右するパラメーターの一つである。開発した包埋剤はグラファイトの微細な層構造の内部まで含浸されており、一般的な方法よりも各層の形態や厚みの評価を詳細に実施できる。本研究では高コントラスト包埋剤の効果を検証するため、市販のグラファイト粉末を使用した。本技術は他の軽元素を主成分とした材料の微構造評価への応用も期待できる。今後は窒化ホウ素をはじめとしたホウ化物、カーボンコーティング材等への展開、TEM を使った評価法への展開を視野に入れながら新たな材料評価法として普及を進めてゆく。

#### 【参考文献】

1. D. Kaczmarek, *Scanning*, **19**, 310–315 (2006).
2. E. Abe, *Mater. Trans*, **44**, 2035–2041 (2003).
3. M. L. Watson, *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, **4**, 475–478 (1958).
4. R. Zuluaga, J.-L. Putaux, A. Restrepo, I. Mondragon, P. Gañán, *Cellulose*, **14**, 585–592 (2007).
5. T. Yahagi, *Microscopy*, (2023).  
<https://doi.org/10.1093/jmicro/dfad020>

【外部発表】 口頭発表 1 件，論文等発表 1 件