

[H30-4]

## MeV 級 $C_{60}$ イオンを用いたアミノ酸薄膜の透過型 SIMS イメージング Transmission SIMS Imaging of an Amide-Acid Thin Film Using MeV $C_{60}$ Ions

中嶋薫<sup>#,A)</sup>, 森本和基<sup>A)</sup>, 中村圭介<sup>A)</sup>, 平野貴美<sup>B)</sup>, 山田圭介<sup>B)</sup>, 千葉敦也<sup>B)</sup>, 鳴海一雅<sup>B)</sup>, 斎藤勇一<sup>B)</sup>

Kaoru Nakajima<sup>#,A)</sup>, Kazuki Morimoto<sup>A)</sup>, Keisuke Nakamura<sup>A)</sup>, Yoshimi Hirano<sup>B)</sup>, Keisuke Yamada<sup>B)</sup>,

Atsuya Chiba<sup>B)</sup>, Kazumasa Narumi<sup>B)</sup>, Yuichi Saitoh<sup>B)</sup>

<sup>A)</sup> Department of Micro Engineering, Kyoto University

<sup>B)</sup> National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

### Abstract

Transmission SIMS imaging using MeV  $C_{60}$  primary ions, which was developed by our group, can provide a sensitive molecular imaging for organic materials including biological samples with sub-micron lateral resolution. It requires for the sample to be an electrically conductive thin film and to be a good electron emitter under irradiation of the primary ions. In this work, test samples consisting of phenylalanine as the analyte were analyzed using 9 MeV  $C_{60}^{2+}$  ions to search for an optimal antistatic film. Double-layer film consisting of aluminum inner layer and gold top layer was found to be effective for preventing charging of the sample and for improving the yield of secondary electrons.

**Keyword:** Imaging, transmission SIMS,  $C_{60}$ , phenylalanine

### 1. はじめに

薬剤や代謝物の動態解析や疾病の診断等に利用するために、生体組織中の物質の空間分布を可視化する分析技術の研究開発が盛んに進められている。対象の分子を染色したり蛍光物質で修飾したりせずにその空間分布を可視化する方法として、分子を試料から脱離・イオン化させて質量分析を行いイメージングする方法（質量分析イメージング）が注目されている。高分子に対する高い感度を持つため現在主流となっている、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) を用いた質量分析イメージングは、横方向分解能が数-10  $\mu\text{m}$  程度である。この分解能は 1 細胞レベルのイメージングを行うには十分ではない。

当研究室では、透過型の二次イオン質量分析（透過型 SIMS）[1,2]を用いた、原理的にサブ  $\mu\text{m}$  の横方向分解能を実現可能なイメージング装置を開発した。本装置では、Fig. 1 に示すように極薄のアモルファス窒化シリコン (SiN) 自己支持膜に担持された薄膜状の試料を用いる。試料の支持膜 (SiN) 側から高速の  $C_{60}$  イオンを一次イオンとして照射し、1 個の一次イオンごとに試料の前方に放出される二次イオンと後方に放出される二次電子を同時計測して、二次イオ

ン種の特定および放出位置の決定を行う。実際に生体組織試料をサブ  $\mu\text{m}$  の横方向分解能でイメージングするためには、最適な薄膜試料の作製方法の開発が課題である。具体的には、生体分子の特定に有用な高質量の二次イオン種の収率向上・試料の帯電防止・二次電子収率向上を同時に実現する試料の構成を見出すことが必要である。

本研究では、試料の帯電を防止するために SiN 支持膜に堆積させる導電性薄膜に焦点を当てて、高質量の二次イオンの高収率と同時に、二次電子の高い収率をもたらす帯電防止膜の構成を調べた。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試料の作製

試料は SiN 自己支持膜（薄膜サイズ 4×4 mm<sup>2</sup>、厚さ 50 nm、Silson 社製）の両面に各種物質を真空蒸着することで作製した。イメージング実験時に一次イオンの入射面（上流側）になる面には、試料の帯電防止のためにアルミニウム、または金とアルミニウムの二層膜を蒸着した。一方、一次イオンの出射面（下流側）になる面には、分析対象としてフェニルアラニン (Phe) を蒸着した。さらにその上に、2 次元マイクロパターンを作製するために、Cu グリッドメッシュ (300 mesh) をマスクにしてアルミニウムを蒸着した。Table 1 に 2 種類の試料の構成と各蒸着膜の厚さ（設計値）を示す。

Secondary electrons → position

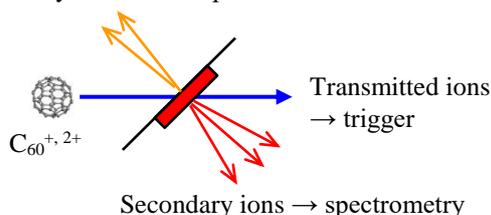


Figure 1. Schematic of the concept of transmission SIMS imaging.

# nakajima.kaoru.4a@kyoto-u.ac.jp

Table 1. Layer Structure of the Samples

	Sample 1	Sample 2
Upstream	Al 15 nm	Au 5 nm Al 20 nm
	SiN 50 nm	SiN 50 nm
Downstream	Phe 40 nm Al 20 nm	Phe 40 nm Al 20 nm

## [H30-4]

## 2.2 透過型 SIMS イメージング実験

9 MeV の  $C_{60}^{2+}$  イオンを一次イオンとして、試料表面に対して  $45^\circ$  の角度で入射した。試料を透過したイオン（入射した  $C_{60}$  イオンは試料中で解離して単原子の C イオンの集団として出射する）を試料の下流側に設置したシリコン表面障壁型検出器（SSBD）で検出し、その信号を二次イオンの飛行時間質量分析のための start 信号として使用した。透過イオンによって試料の下流側の表面から放出された二次正イオンを、リニア型の飛行時間型質量分析計で質量分析した。一方、試料の上流側の表面から放出された二次電子を、二次電子顕微鏡によって蛍光アノードを組み込んだマイクロチャンネルプレート（MCP）上に拡大・結像させて、その放出位置に対応する蛍光アノードの輝点を高速 CMOS カメラで写真撮影した。SSBD による透過イオン検出の信号を CMOS カメラのシャッタートリガーとして用いることで、1 個の一次イオンの入射にともなう二次電子の放出位置の写真を、対となる二次イオンの飛行時間のデータとともに収録できる。なお、本顕微鏡は Focus 社製の光電子顕微鏡（PEEM）を本装置用に一部改造した物である。顕微鏡の主な運転パラメータは、引出電圧: 10 kV、コントラストアパーチャ径: 150  $\mu\text{m}$ 、視野径（公称値）: 138  $\mu\text{m}$  であった。また CMOS カメラの露光時間は 1.6 ms で、写真は 750×750 pixel の画像として保存した。

## 3. 結果および考察

## 3.1 二次イオンの質量スペクトル・収率

Fig. 2 は各試料の二次イオン質量スペクトルである。フェニルアラニン分子からカルボキシ基 (-COOH) が脱離したイオン ( $m/z$  120)、分子にプロトンが付加した擬分子イオン ( $m/z$  166)、二量体にプロトンが付加したイオン ( $m/z$  331) などが観察される。低質量領域に観察されるピークはフェニルアラニンが細かく断片化したフラグメントイオンである。両試料のスペクトルを比べると、Sample 1 のスペクトル

(Fig. 2(a)) では各イオンのピークの幅が太いことが分かる。Sample 1 の実験で一次イオン照射による試料の帯電が起こり、試料電位が変動したことが原因である。試料の帯電防止のために Sample 1 に堆積した厚さ 15 nm のアルミニウムの蒸着膜が、期待した機能を果たすには不十分であることを示している。

フェニルアラニン由来と特定できる、上述の 3 種類の二次イオン ( $m/z$  120, 166, 331) の合計の収率を求めると、Sample 1 は 0.64、Sample 2 は 0.47 であった。Sample 2 の収率の方が少し低いのは、Sample 1 に比べて試料が厚いことが影響していると考えられる。

## 3.2 二次電子の収率

上述のように、1 個の一次イオンの照射によって試料の上流側の表面から放出された二次電子は、二次電子顕微鏡で MCP 上に結像される。多くの場合は 1 個の一次イオンによって複数の二次電子が放出さ

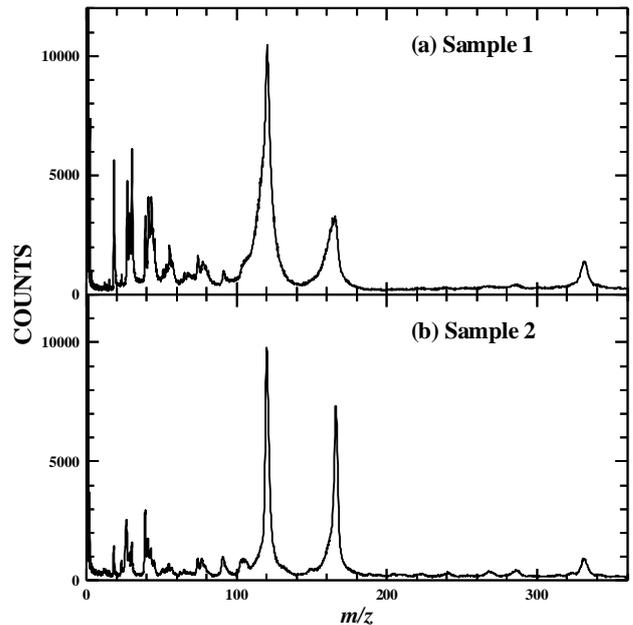


Figure 2. Mass spectra of positive secondary ions from (a) Sample 1 and (b) Sample 2, respectively.

れるので、二次電子の収率が高いほど明るい輝点が蛍光スクリーンに観察される。その結果、MCP のダークノイズとの区別が容易になり、一次イオンの照射によって生じた二次電子と判別される確率が高くなる。加えて、二次電子の収率が高いと、二次電子の完全な集束が得られない場合でも、輝点の強度分布の重心を計算すれば小さい誤差で電子の放出位置が決定できるという利点もある。

まず、CMOS カメラで撮影された写真のうち、一次イオン照射によって試料から放出された二次電子の像と考えられる輝度の高い輝点が 1 個だけ写っている写真、または輝度の高い輝点が複数あるが狭い領域に集中している写真を選別した。次にそれらの写真について、輝点の強度分布の重心を求めることにより、二次電子の放出位置を決定した。各試料で 1 個の透過イオンの検出 (1 イベント) に対して二次電子の放出位置が決定できた割合はそれぞれ 0.067 (Sample 1)、0.35 (Sample 2) であった。

Sample 1 は二次電子を放出する上流側の表面がアルミニウムであるのに対して、Sample 2 は最表面が金であるため、Sample 1 に比べて二次電子収率が高いと期待される。このことがより高い確率で二次電子の放出位置を決定できた一因である。さらに前節で述べたように、Sample 1 は実験中に帯電し、電位が変動していた。このために顕微鏡の像がぼやけて、MCP のダークノイズと判別可能な強度の高い輝点が観察される確率が低下したと考えられる。

## 3.3 イメージング結果

フェニルアラニン由来と特定される二次イオン種（主に  $m/z$  120, 166, 331）の検出と同時に撮影された

[H30-4]

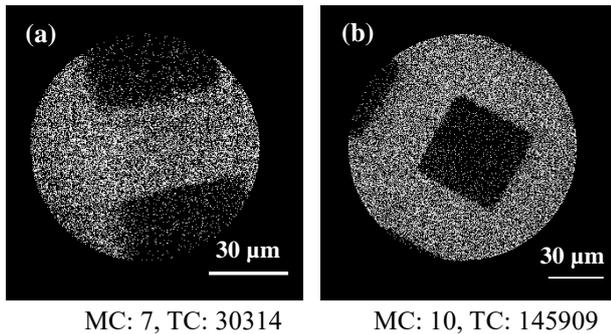


Figure 3. Image on the spatial distribution of phenylalanine obtained from (a) Sample 1 and (b) Sample 2, respectively. (MC: maximum counts, TC: total counts)

顕微鏡写真を抽出し、前節で説明した要領で求めた輝点の重心をプロットすることにより、フェニルアラニンの空間分布を表すイメージを作成した。Fig. 3(a)が Sample 1 から得られたイメージ、3(b)が Sample 2 から得られたイメージである。明るく表示されている点がフェニルアラニン由来の二次イオンが放出された位置を表している。正方形の暗い部分は試料の下流側の表面にグリッドメッシュを通してアルミニウムを蒸着した領域に対応している。Sample 1 のイメージでは、視野が公称値よりかなり小さく（約  $87\ \mu\text{m}$ ）、パターン境界がいくらかぼやけているように見える。一方、Sample 2 のイメージは視野が公称値に近く（約  $125\ \mu\text{m}$ ）、パターン境界が明瞭である。Sample 1 のイメージの歪みは試料が実験中に帯電していたことが原因である。この結果からも、Sample 2 は実験中の帯電が効果的に抑えられていることが確かめられる。

Fig. 3(b)に示したイメージについて、得られたパターンエッジの幅から横方向分解能を評価した。エッジに直角な方向の強度プロファイルを作成し、エッジ部分を相補誤差関数でフィッティングすることでエッジの幅を求めた結果、約  $1.4\ \mu\text{m}$  の値が得られた。ただし、実際のフェニルアラニンの分布が完全に急峻なエッジを持たないことや、エッジのラインが完全に直線でないことを考慮すると、本来の横方向分解能はこの値より小さい。

ここに示したイメージは、それぞれ透過イオンの検出数（イベント数）が約 69 万（Sample 1, Fig. 3(a)）、約 86 万（Sample 2, Fig. 3(b)）である。両者のイメージ作成に用いられた信号のカウント数（total counts）を 1 イベント当たりの比として比較すると、Sample 2 の方が約 4 倍高い値である。前節で述べた、二次電子収率の違い・試料の帯電の影響による二次電子の放出位置特定確率の差がこの結果に大きく影響している。

#### 4. まとめ

当グループで開発した透過型 SIMS イメージングに適した試料の構成を探るために、一次イオンが入

射する薄膜試料の上流側に形成する帯電防止膜の構成が異なる試料について透過型 SIMS イメージング実験を行った。アルミニウムの単層膜を堆積した試料は一次イオンを照射したときに帯電が起こり、二次電子収率も低かったため、効率が悪くぼやけたイメージしか得られなかった。それに対して、最表面に極薄の金を蒸着したアルミニウムとの二層膜を堆積した試料は帯電が抑制され、明るくシャープなイメージが得られた。

#### 参考文献

- [1] K. Boussofiane-Baudin, et al., “Non-linear sputtering effects induced by MeV energy gold clusters”, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B **88** (1994) 61.
- [2] K. Nakajima, et al., “Transmission secondary ion mass spectrometry using 5 MeV  $\text{C}_{60}^+$  ions”, Appl. Phys. Lett. **104** (2014) 114103.