

## 位相コントラスト STEM Phase Plate STEM

箕田 弘喜

Hiroki Minoda

東京農工大学

**要旨** 軽元素で構成されている生物分子は、電子との相互作用が小さく、TEM で高いコントラストが得られないため、デフォーカスにより、分解能を犠牲にして位相コントラストを向上させている。正焦点条件で、分解能を損なわずに位相コントラストを向上させるための方法として、我々は、位相差走査型透過電子顕微鏡 (P-STEM) 法を開発した。本稿では、その結像原理とその応用例について紹介する。

キーワード：位相差顕微鏡法，STEM，位相コントラスト

### 1. はじめに

高分解能 TEM 観察における像コントラストの主因は、位相コントラストである。より高品質の高分解能像を得るためには、高分解能で高コントラストな像を得るための光学系を実現する必要がある。一般的に、高分解能を実現する光学系としては、球面収差が小さな対物レンズを利用することが望ましいが、球面収差がゼロの対物レンズでは、レンズの位相コントラスト伝達関数 (PCTF) が全ての空間周波数成分でゼロとなってしまう、像コントラストが得られず、像が見えなくなることになる。球面収差係数が数 mm の汎用の装置では、オングストロームレベルの空間周波数成分に対する PCTF は比較的大きな値をとるため、像コントラストを得ることはできるが、さらに分解能を向上させるために、正焦点条件ではなくシュルツァーデフォーカスの条件で観察を行っている。また、球面収差補正装置付きの TEM の場合、実際には正焦点での観察はしておらず、適切な値にデフォーカスを設定することで、原子分解能で像コントラストを得ている。

一方、生体内でさまざまな機能を発現する生物分子は軽元素で構成されており電子に対する位相物体と見なせるが、これらの試料を TEM 観察してもほとんど像コントラスト (位相コントラスト) が得られないことが知られている。生物試料は nm 以上の比較的大きなサイズのものが多く、正焦点条

件の汎用 TEM の PCTF は  $1 \text{ nm}^{-1}$  を超えるあたりから 1 に近い値をとるが、それより低空間周波数ではゼロに近い値である。生物試料の試料サイズに対応する  $0 \sim 1 \text{ nm}^{-1}$  の空間周波数領域において、PCTF の値が非常に小さいことが生物分子の像コントラストが得られない理由である。この場合も、高分解能観察の場合と同様に適切な値にデフォーカスを設定すれば、nm 以上のサイズの領域の PCTF を比較的大きな値に変化させることが出来る。しかし、生物分子の観察の場合、設定すべきデフォーカスの値は数千 nm にもなるため、高い分解能を期待することはできない。

このように、原子分解能での観察でも nm 程度以上の試料の観察でも、デフォーカスを変えて望みの空間周波数領域の PCTF の値が大きくなるように制御することで、高い位相コントラストを実現している。原子分解能レベルから nm を超えるサイズまでの広い空間周波数領域に亘って大きな PCTF の値を有するような光学条件を実現することは従来の装置ではできないことから、これを実現することは有用である。これを実現する方法として、位相板を用いた位相差電子顕微鏡法がある。この方法では、位相板により PCTF を変えることで、原子分解能レベルから nm を超えるサイズまでの広い空間周波数領域に亘って大きな PCTF を得ることができる。本稿では、位相差電子顕微鏡法のうち、最近我々が開発した位相差走査型透過電子顕微鏡法 (P-STEM) の原理とその応用例について紹介する<sup>1)</sup>。

### 2. 位相差 STEM の原理

位相差法は、20 世紀の前半に Zernike により提案され、光学顕微鏡法においては実現されているが<sup>2)</sup>、TEM 法に対しては、21 世紀になるまで、実用化することができなかった。しかし、近年の微細加工技術の発展により、TEM 法で使える位相板が実用化され、多くの応用成果が得られている<sup>3~8)</sup>。

位相差 TEM 法では対物レンズの後焦点面に位相板を設置し、これを用いて電子波に位相変調を与える。最も成功している位相板は、薄膜タイプの炭素膜位相板で、膜の中央に穴が開いている Zernike 位相板と呼ばれているものである。位相板を用いない通常 TEM 法では、PCTF は、

$$PCTF(\vec{k}) = \sin(\gamma(\vec{k})) \quad (1)$$

と書かれる。ここで、 $\gamma$  は、収差関数で、球面収差係数の大きさやデフォーカスの値に依存する関数である。それに対し、Zernike 位相板を用いると、位相板は非散乱波をそのまま通し、散乱波は位相板を透過する際に位相変調を与えられる。その結果、散乱波と非散乱波の間に位相差  $\Delta\pi$  を与えることで、PCTF を変化させる。位相板により変調を受けた PCTF は、

$$PCTF(\vec{k}) = \sin(\gamma(\vec{k}) + \Delta\pi) \quad (2)$$

と変更を受ける。電子波は位相板物質の平均内部ポテンシャルによって位相変調を受けるため、位相板に使う膜の材質と厚さによって位相変調量が決まる。よく使用される非晶質の

〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16  
TEL: 042-388-7114; FAX: 042-388-7694  
E-mail: hminoda@cc.tuat.ac.jp  
2016 年 4 月 14 日受付, 2016 年 7 月 20 日受理

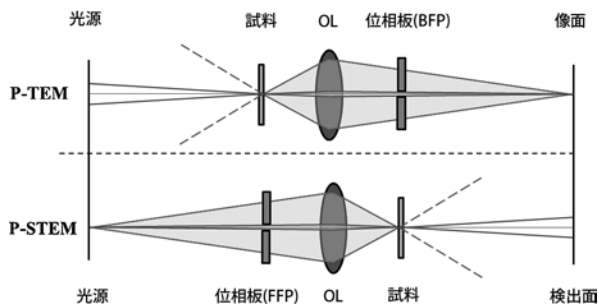


図1 位相差 TEM (上) と P-STEM (下) の光学系の比較

炭素膜の場合、25 nm 程度の膜厚で、200 kV の加速電圧の電子波に対して  $\pi/2$  の位相変調を与える。この場合、PCTF は、通常法でよく知られる  $\sin$  型の関数から  $\cos$  型の関数へと変化するため、ゼロ近傍の小さな空間周波数の散乱波に対して大きな値を持つように変化する。この結果、nm サイズより大きな構造物に対して像コントラストが向上する。

しかし、この方法の問題点として、位相板を設置することが出来る装置に制約があることが挙げられる。位相板は対物レンズの後焦点面に設置する必要があるが、分解能の高い装置では、対物レンズのポールピースギャップが狭いため、ギャップ間に位相板を設置することが出来ない。この問題を解決するために、我々は、P-STEM の開発を行うことにした。

相反定理により、図1に示すように STEM 法は TEM 法と等価な光学系を実現することが出来る。対物絞り位置に位相板を設置する場合、幾何学的な制約は大きいですが、コンデンサー絞り (CL 絞り) 位置であれば、その制約は少なく、ギャップの小さな対物レンズでも位相板設置に伴う問題がない。位相差 TEM (P-TEM) の光学系では、試料に散乱されない非散乱波は、そのまま位相板の穴を通り抜け、試料に散乱された波は位相板によって位相変調を受ける。したがって、位相変調を受けない非散乱波と位相変調を受ける散乱波が干渉することによって位相コントラストを生じる。

一方、P-STEM においては、試料による散乱と位相板による位相変調の順番が逆になる。すなわち、位相板の穴を通り抜けて位相変調されずに試料に到達した波のうちの一部は試料に散乱されずに、そのまま明視野検出器に向かう。一方、あらかじめ位相板を透過して位相変調を受けた波のうちの一部が、試料で散乱、偏向されて明視野検出器に向かう。この2種類の波が干渉して位相コントラストを生じる。ただし、P-TEM と光学的に等価な光学系を実現するためには、位相板は対物レンズの前方焦点面 (FFP) に設置する必要がある。CL 絞り位置は、FFP と光学的に共役な位置ではないので、STEM 明視野像の光学条件のまま、CL 絞り位置に位相板を設置しても、P-STEM の光学系が実現できるわけではない。そこで STEM 明視野条件では使用されていないコンデンサーミニレンズ (CM レンズ) を使用して、CL 絞り位置を FFP と共役にするような光学条件の調整が必要になる (図2)。

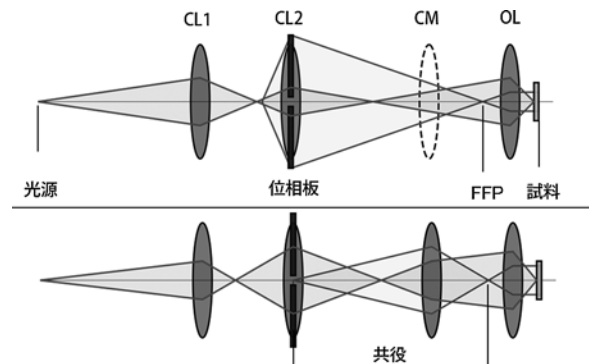


図2 CM レンズを使用しない通常 STEM の光学系(上図)では、P-TEM 法が実現できないので、CM レンズを利用することで、P-STEM 条件を実現することが出来る (下図)。

### 3. 位相板の穴径と位相差 STEM 光学条件

このようにして、電子線照射系の光学条件を調整することで、P-STEM の光学条件が実現できることがわかる。我々は、P-STEM の光学系の実現を目指して開発を進めた。使用した装置は、加速電圧 200 kV の電界放出電子銃付の装置、日本電子社製 JEM2100F である。位相板としては、Zernike 位相板を用いた。これは、直径 50  $\mu\text{m}$  の穴を有する絞りに 25 nm 程度の厚さのアモルファスの炭素薄膜を貼ったもので、膜の中央に直径 1  $\mu\text{m}$  の穴を開けている。

Zernike 位相板の穴径は、散乱波に対して位相変調を与える最小の空間周波数 (カットオン周波数) と対応している。穴径が大きくなるとカットオン周波数が大きくなる。この周波数より小さな空間周波数を持つ散乱波に対しては、PCTF は  $\sin$  型のままであり、位相差法の光学条件にはなっていないことになる。したがって、位相板の穴径を小さくしてこの周波数をなるべく小さくすることが望ましい。実際、位相差法の TEM に対する初期の応用の試みは、小さな穴の開いた位相板の作製上の困難から十分な成果を得ることはできなかった<sup>9)</sup>。位相差 TEM 法においては、極低位相板の穴径を小さくするために、集束イオンビームを用いて数百 nm サイズの穴径の位相板が作られている。また、焦点距離の長いレンズを使えば穴径の同じ位相板を用いても、実効的に位相板の穴径を小さくすることができ、コントラスト増強効果が大きいことも示されている<sup>10)</sup>。

しかし、P-STEM の場合、穴径を必要以上に小さくすることができないという問題点がある。位相板を通して集束電子を試料に照射すると、位相板の影が検出面に投影される。共役条件は、この影が検出面上でボケなく投影されるという条件に対応している。検出面では透過ディスクと散乱ディスクが重なり、その結果干渉像を得ることになる。このとき、位相差条件を満たす電子は、透過波には位相変調を与えず、散乱波に位相変調を与えている波が重なる穴の影の内側に相当する比較的小さな検出角度の領域に限られている。この位相差条件の電子波のみを利用して P-STEM 像を得るためには、



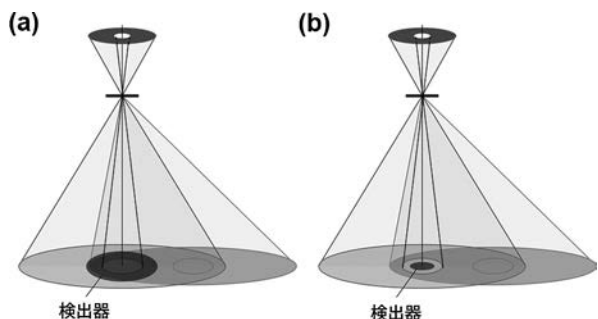


図3 位相板の穴径に対する検出器サイズの関係。(a)では、検出器の方が検出面に投影される位相板の穴より大きく、(b)では、検出器の方が検出面に投影される位相板の穴より小さい。(b)の条件でないと、十分な位相コントラスト増強効果は期待できない。

検出面に投影される位相板の穴径と等しいサイズの検出器を準備する必要がある。このため、位相板の穴径を小さくすると、位相差条件を満たす電子が減ってS/Nが小さくなり観察には適さない。これが、穴径を小さくする場合の問題点である。

検出面に投影される穴径より検出器サイズを大きくすればシグナル強度は増加するが、位相差条件を満たす電子波と、位相差条件を満たさないSTEM明視野条件の電子波を同時に検出することになる(図3(a)の場合)。検出器サイズを大きくして、後者の電子波の割合が大きくなると、十分な像コントラストを得ることができない。一方、検出器のサイズが穴径以下の場合には(図3(b))、結像に使われる電子は、すべて位相差条件を満たしておりコントラストの向上効果が期待される。

#### 4. 位相差 STEM によるナノ粒子のイメージング

上述のように穴径を小さくすると、位相差条件を満たす空間周波数の領域は低周波側に広がる。すなわち、大きなサイズの試料に対しても位相差法の効果を期待することができるようになる。しかし、穴径を小さくすると検出角度を小さくしなければならないため、位相差条件を満たす電子波の強度は弱くなる。この結果、得られる像は、コントラストは高いが強度は弱く、S/Nの低い像になってしまう。したがって、コントラストを増強し、かつ、ある程度S/Nの高い像を得ようとするには、穴径を適切に選ぶ必要があることになる。これが、穴径に対する制約条件である。

このことを確認するために、非晶質の炭素薄膜を試料として、実効的な検出器サイズを変えた場合の、PCTFの違いを実験により検証したのが図4である。実験的に検出器サイズを変化させることは難しいので、検出器サイズを変える代わりに、カメラ長を変化させた。図4(a)～(c)は、それぞれ、位相板の穴径が、検出器の径の100%、80%、50%の場合の位相差STEM像で、図4(d)は明視野STEM像である。それぞれの電頭像の右上に、像のフーリエ変換(FFT)パターンを示した。試料は薄い炭素膜であることから、概ね

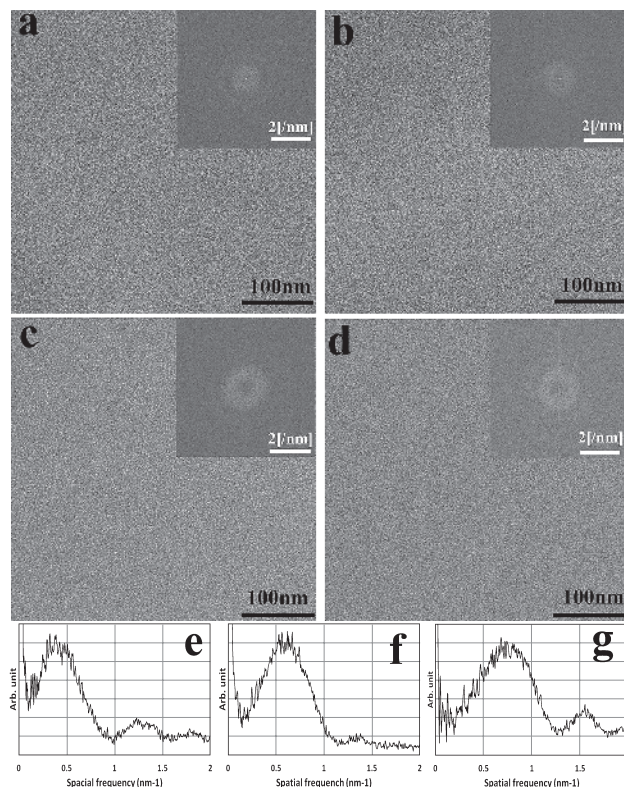


図4 P-STEM像のPCTFの検出器サイズによる像とフーリエ変換パターンの比較。(a)検出器径は、投影された位相板の径と同サイズ。(b)直径80%、(c)直径50%、(d)明視野STEM像(e),(f),(g)は、(a),(b),(d)のパワースペクトル。ピークの位置が、(e),(f),(g)の順に高い周波数側に移動している。

位相物体であると考えられるので、像コントラストの成因は位相コントラストであると考えられる。4つの像は同一視野の像ではないが、炭素膜一面に膜地の模様が見えている。像の見え方は、位相差法の光学条件の電子波の割合が高い(a)や(b)では、比較的膜地によるコントラストが見られるのに対し、割合の低い(c)や(d)では、比較的一様な像に見える。対応するFFTパターンを比較すると、(a)では中心付近のみに強い強度が見られ、cos型のPCTFを示唆している。検出器サイズが(a)から(c)へと大きくなると、中心付近の強度が低下して、径が50%の(c)では明視野STEM光学条件(d)とほぼ同程度の半径のリングパターンが見えている。また、(a),(b),(d)の像に対応するパワースペクトル(e),(f),(g)では、ピーク位置がより高空間周波数側に見えており、PCTFがcos型からsin型へと変化して行く様子が分かる。(e),(f)では低周波数側でくぼみが見えているが、これは位相板の穴によるカットオン周波数がこのくぼみの位置程度であることを示唆している。

検出される電子は、位相差STEM条件と明視野STEM条件の電子波の重み付きの和になるが、検出器サイズが大きいほど後者の重みが大きくなる。cos型のPCTFに対しsin型のPCTFは、より高周波数側で極大値1を取ることで、明るいリングの半径が大きいほどsin成分が大きいことを意味し

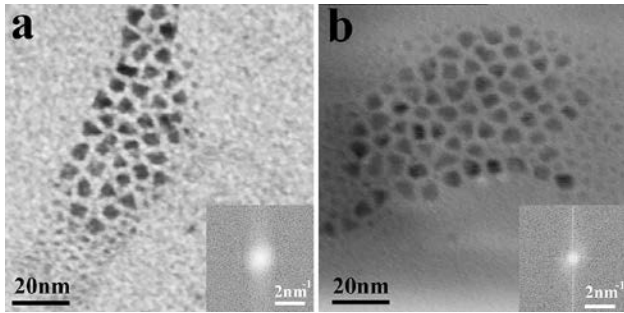


図5 P-STEM法と通常STEM法を用いて撮影されたCdS/CdSe量子ドットの像の比較. P-STEM像で、粒子の像コントラストが高いことが明瞭に見て取れる。

ている。(c)と(d)のパターンはほとんど変わらず、直径50%程度の段階で、位相板の効果はほとんど見えていないことが示唆される。

図4で示したように、位相板を用いて適切な光学条件に設定することで、PCTFが変化することを明瞭に示すことができた。そこで、この光学条件で量子ドットを観察し、位相差法の効果を像として示す。図5(a)と(b)は、非晶質の炭素薄膜の上に、CdS/CdSeの量子ドットを分散させた試料をP-STEM条件とSTEM明視野条件で撮影した像を比較したものである。設定したbrightnessやcontrastの条件は2つの像で同じ値である。(a)はP-STEM像、(b)は明視野STEM像で、暗く見えているのが量子ドットである。それぞれの像の右下に、対応するFFTパターンを示した。図4と同様に、P-STEMの光学系で得られた像では、FFTパターンの中心付近の強度が高く、明視野STEM像では、非散乱波由来の電子波強度の周りはすぐに強度が減衰しており、位相差法のような中心の強度分布は見られない。像を見ると、暗く見える量子ドットの周りが比較的明るいP-STEM像に比べて、明視野STEM像の(b)では量子ドットが暗い像として見えているが、下地も(a)ほど明るい像としては見えておらず、(a)における像コントラスト増強効果は明瞭にわかる。

また、10 nm以下程度の比較的サイズの大きな量子ドットに加えて、その周りがある2, 3 nm程度の量子ドットに由来すると思われる比較的細かな粒子由来の像も数多く見えている。P-STEM法による位相コントラスト誦経効果をナノサイズの粒子の観察に利用した例はこれが始めてであり、この方

法が今後、ナノ材料の構造解析において、効果的な解析手法であることを示す結果である。

## 5. おわりに

本稿では、最近、我々が開発したP-STEM法について、その原理とそれを用いた応用例を紹介した。CL絞りに位置に位相板を設置し、CMレンズを用いてCL絞りに位置をOLのFFPと共役な条件で、試料に対して集束電子を照射し、適切なサイズの検出器により電子検出をしてイメージングをする。これにより、位相コントラスト伝達関数が、 $\cos$ 型に変化し、位相コントラストが向上し、ナノメートルサイズの量子ドットの像コントラストが増強することが示された。この方法の発展が期待される。

## 謝 辞

本研究開発は、AMED先端機器開発・要素技術開発プログラムから委託を受けて研究開発を遂行した。ここに感謝する。また、本研究は、東京農工大・玉井崇之氏と株式会社日本電子の飯島寛文氏を中心に進めたものである。

## 文 献

- 1) Minoda, H., Tamai, T., Iijima, H., Hosokawa, F. and Kondo, K.: *Microscopy*, **64**, 182–187 (2015)
- 2) Zernike, F.: *Physica.*, **9**, 686–698 (1942)
- 3) Danev, R. and Nagayama, K.: *J. Phys. Soc. Jpn.*, **70**, 696–702 (2001)
- 4) Danev, R., Okawara, H., Usuda, N., Kametani, K. and Nagayama, K.: *J. Biol. Phys.*, **28**, 627–635 (2002)
- 5) Yamaguchi, M., Danev, R., Nishiyama, K., Sugawara, K. and Nagayama, K.: *J. Struct. Biol.*, **162**, 271–276 (2008)
- 6) Hosogi, N., Shigematsu, H., Terashima, H., Homma, M. and Nagayama, K.: *J. Struct. Biol.*, **173**, 67–76 (2011)
- 7) Dai, W., Fu, C., Raytcheva, D., Flanagan, J., Khant, H.A., Liu, X., Rochat, R.H., Haase-Pettingell, C., Piret, J., Ludtke, S.J., Nagayama, K., Schmid, M.F., King, J.A. and Chiu, W.: *Nature*, **502**, 707–710 (2013)
- 8) Inayoshi, Y., Minoda, H., Arai, Y. and Nagayama, K.: *Micron*, **43**, 1091–1098 (2012)
- 9) Kanaya, K., Kawakatsu, H., Ito, K. and Yotsumoto, H.: *J. Appl. Phys.*, **29**, 1046–1049 (1958)
- 10) Minoda, H., Okabe, T. and Iijima, H.: *J. Electron Microsc.*, **60**, 337–343 (2011)