

## 低エネルギーホログラフィー 電子顕微鏡の開発

### Development of Low Energy Holography Electron Microscope

新竹 積, 安谷屋秀仁, 山下 真生,  
マーティン・フィリップ・チャン

Tsumoru Shintake, Hidehito Adaniya, Masao Yamashita  
and Martin Phillip Cheung

OIST 沖縄科学技術大学院大学

**要旨** 生体サンプルに対して高いコントラストを得るために低エネルギーとし、さらに位相情報を得るために In-line Holography を採用。FFT により波の伝搬を計算して物体波の複素振幅を得ている。これにより高い位相コントラスト像が得られる。分解能はまだ高くないが、氷包埋したウイルス等のナノ粒子の観察ができつつある。現在この顕微鏡に適したサンプルの作製手法の開発に取り組んでいる。

**キーワード** : In-line Holography, Gabor, ホログラフィー, 低エネルギー, 電子線回折

#### 1. はじめに

1948 年 Nature に掲載された Gabor の論文<sup>1)</sup>に端を発して、ホログラフィーはレーザーの発展と共に各方面に応用されてきた。その中で電子線ホログラフィー (Off-axis Electron Holography) は、故外村彰先生が先駆的研究を指揮され、AB 効果 (Aharonov-Bohm effect) 論争に決着をつけるという輝かしい業績をあげられた。現在、我々は OIST 大学にて Gabor が提唱した In-line Holography に基づいて生物試料向けにホログラフィー電子顕微鏡を開発している。

さてこのホログラフィー電子顕微鏡の大きな特徴として、

- (1) 3次元の物体を2次元の画像に記録することが可能。
- (2) 撮影後にもイメージの焦点を任意にコンピューター上で変更することができる。
- (3) サンプルの横方向への平行移動に対してホログラムが鈍感なため、例えば氷包埋されたサンプルを TEM 観察する場合に問題となる氷の変形移動や振動に対して許容度が大きい

〒904-0495 沖縄県国頭郡恩納村谷茶 1919-1

TEL: 090-1905-8379

E-mail: shintake@oist.jp

2017年1月17日受付, 2017年3月12日受理

という際立った特徴がある。

(4) 点光源を作るための収束レンズの収差は容易に補正可能であり、分解能は収差により制限されない。

(5) また実用上重要な事として、サンプルの下流には対物レンズが存在せず、サンプルの周辺に広い自由空間が確保できるため、環境ガスやナノプローブ等のツールを持ちこむことが可能となる。

(6) 生体サンプルなどの低元素の物体は位相物体となり通常の TEM では原理的にコントラストがゼロとなってしまう。そこで通常、意図的に焦点を  $1\mu\text{m}$  程度ずらしてコントラストを上げて撮像するということが行われているが、これによる分解能の低下を免れない。ホログラフィーでは複素振幅が直接得られるため、この問題がない。位相板を用いたイメージングと同等またはそれ以上の可能性がある。

したがってホログラフィー電子顕微鏡が実現すれば、生体サンプル等の3次元構造を観察する有効な手段となる。

Gabor の In-line Holography では、電子ビームを一旦収束し、微小な点光源を形成させ、ここから  $100\mu\text{m}$  程度下流にサンプルを置く。散乱された物体波と点光源からの元々の参照波とが重なり干渉し、その強度に周期的な縞模様が見れ、ホログラムとなる。これを CCD 等の2次元検出器により記録する。フーリエ変換の手法により、サンプル位置での複素振幅を再生することにより、サンプルの像を得ることができる。

我々は、さらに高いコントラスト (複素振幅) を得るために低エネルギーの電子ビームを用いたホログラフィー顕微鏡を開発した。電子の最高エネルギーは 30 kV, 最低エネルギーは 100 V である。氷包埋の生体サンプルは、通常 20~30 kV にて観察している。現在、細菌の鞭毛や分泌装置の観察を準備中である。これらのサンプルは、病理学的に大変重要であり、構造解析をめぐる研究が世界中で盛んに行われている。

#### 2. 基本構成

図1に我々が開発したホログラフィー電子顕微鏡を示す。左にコヒーレントな電子源としてカールツァイス社の Gemini カラムを搭載。SEM 機能によりサンプルの表面観察も可能。Gemini の電子源はショットキー型電子銃 (Schottky FE: Schottky Field Emission Gun, 電気化学工業 DENKA TFE174C SE) である (図2)。タングステン表面に ZrO のコーティングが施してあり、仕事関数をタングステン単体の 4.2 eV から 2.7 eV に下げている。さらにショットキー効果 (電界による障壁の低下) によって実効的な仕事関数を下げて 1800 K のカソードから効率的に熱電子を引き出している。図2は分解能が低下したため交換したカソードであり、左右に微細な有機物が炭化したと想定される付着物が発見された。交換後すぐに通常運転に戻った。なおショットキー型電子銃はフラッシングなしで安定したビームが得られるという特徴があり、日常の実験をスムーズに行う事ができている。

電子放出面 (直径約 200 nm) はタングステンの [100] 結晶面であり極めて平坦な面から電子が放出される。周辺領域

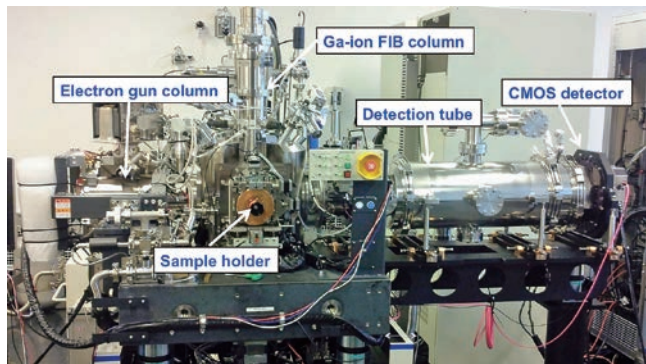


図1 低エネルギー・ホログラフィー電子顕微鏡

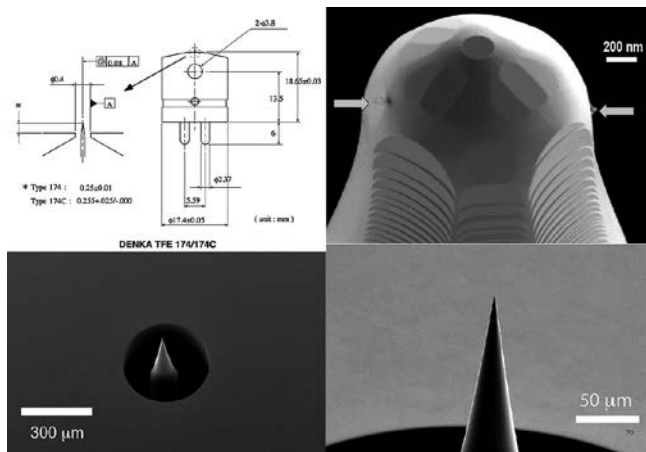


図2 ショットキー電子源 (W/Zr Schottky FE). 電子放出面は中央の直径約 200 nm の平坦な円形の範囲. 赤矢印は実験中に付着したと思われる不純物.

を含めた平均曲率  $1 \mu\text{m}$  による放射状の電界により電子は発散を始めるが、タングステンを取り囲むサブレッサー電極の負の電圧によって、再びアノード方向へ収束され数 mrad という小さい放出角度を実現している. この電子軌道を逆投影した虚像カソードの直径 (Virtual source diameter) は約  $15 \text{ nm}$  である<sup>2)</sup>. アノードを通過した電子は、コンデンサーアパーチャにより一部を切り出しており、対物レンズで収束させた後のスポットによる2次電子SEM像の分解能は  $3 \text{ nm}@5 \text{ kV}$  となっている. またホログラフィーの分解能は

$1 \text{ nm}$  を切るところまで来ており、生物サンプル向けには満足できるが、カーボンナノチューブなどの基礎物理の研究用には将来 Cold-FEG の導入も必要であろう.

ショットキー型電子銃の  $1800 \text{ K}$  でのエネルギー分散は電流が小さい時に理論上  $0.3 \text{ eV}$  という報告があり室温  $300 \text{ K}$  の Cold FE の理論値  $0.27 \text{ eV}$  と比較して若干大きいが大差はないようである<sup>2)</sup>. エネルギー分散に伴う電子のコヒーレント長は次のように与えられる.

$$L = \lambda \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = 2\lambda \frac{V}{\Delta V} \quad (1)$$

ショットキー型電子銃のエネルギー分散  $0.3 \text{ eV}$  に対するコヒーレント長は、 $30 \text{ kV}$  の電子ビーム (波長  $0.07 \text{ \AA}$ ) に対して、 $1.4 \mu\text{m}$  となる. これが後述する図4 (a) の光路差  $d$  より大きくなくてはならない. ところで Gabor の In-line Holography も通常の光学顕微鏡と同様に、その空間分解能はレイリー (Rayleigh) の分解能から次式で与えられる.

$$\delta_x = 0.61 \times \frac{\lambda}{NA} = 0.61 \times \frac{\lambda}{\sin\theta} \quad (2)$$

ここで  $NA$  は対物レンズの開口数、 $\theta$  は物体から散乱する電子波の光軸に対する最大角度であり、分解能  $1 \text{ \AA}$  を得るには、 $43 \text{ mrad}$  の散乱角度が必要であり、その時の光路差は最大  $0.1 \mu\text{m}$  となり、ショットキー型電子銃のコヒーレント長が十分である事がわかる.

カラムを出た電子ビームは、 $5.5 \text{ mm}$  下流に直径数ナノメートル程度のスポットを形成する. ここがサンプル位置であり、通常の TEM 向けサンプルホルダーを搭載できるステージが準備されている. ステージは XYZ 方向に高精度で移動可能. また、ホルダーを  $360$  度回転可能なステージとなっている.

サンプルを通過した電子は下流に用意された光学系にて約  $1.3$  メートル下流の大型2次元電子検出器へと輸送され、2次元のホログラムが撮像される. 図3に電子ビーム光学系を示す.

2次元電子検出器は、ドイツの TVIPS 社の製品である. 蛍光シンチレーターを用い、エネルギー約  $4 \text{ keV}$  以上の電子が検出可能となっている. シンチレーター膜と CMOS 検出

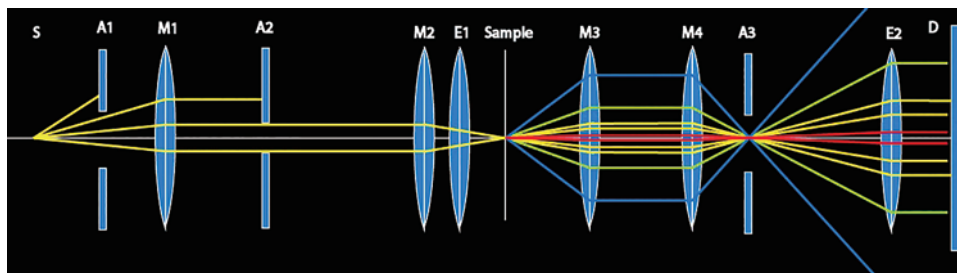


図3 電子ビーム軌道. S: 電子源, A1: アノードアパーチャ, M1: コンデンサレンズ, A2: コンデンサーアパーチャ, M2: SEM 対物レンズ, E1: 減速モードでの静電レンズ, M3, M4: プロジェクターシステム, A3: エネルギーフィルター及び S-TEM 電子検出器, E2: 加速モードでの静電レンズ, D: 蛍光 CMOS 検出器. S から E1 が Gemini カラム, 長さ約  $30 \text{ cm}$ , Sample から D まで  $1.3 \text{ m}$ .

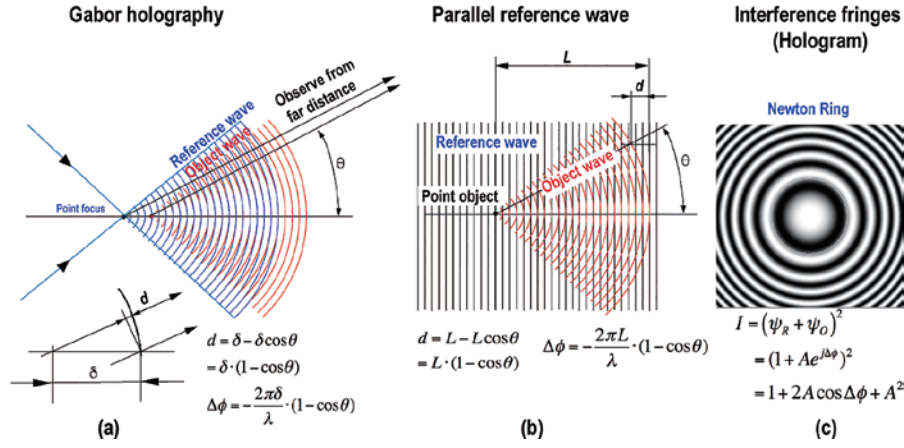


図4 (a) Gabor in-line holography : 点光源を参照波とするホログラム. (b) 平面波を参照波とするホログラム. (c) 点散乱のホログラムはニュートンリングとなる.

器とは、光ファイバーバンドルにて結合されており、蛍光を  $8k \times 8k$  ピクセルで撮像する。

ホログラムの撮影は、始めに S-TEM モードにてサンプルを大まかに観察し、ビーム電流を止めて、目標となる観察位置にビーム照準を合わせ、サンプルを Z 軸方向（下流へ）数  $100 \mu\text{m}$  移動させて、必要な露光時間ビームを出して撮影する。場合によっては繰り返し同じ場所を撮影して、サンプルのビームダメージを確認する。

### 3. In-line Holography の原理と実際

図 4a にホログラフィー顕微鏡の概念を示す。ビームを取束し点光源を形成。点光源から  $\delta$  だけずれた位置にサンプル (point object) を置く。散乱波と参照波とが干渉する。軸から角度  $\theta$  だけ開いた方向から観察すると、二つの波の位相差は、

$$\Delta\phi = -\frac{2\pi\delta}{\lambda} \cdot (1 - \cos\theta) \quad (3)$$

となる。合成波の強度は、

$$I = |\psi|^2 = \psi_R^* \psi_R + \psi_O^* \psi_O + \psi_O^* \psi_R + \psi_R^* \psi_O = 1 + 2A \cos \Delta\phi + A^2 \quad (4)$$

となり干渉縞は図 4 (c) に示すようにニュートンリングとなる。ここで  $A$  は参照波を 1 とした場合の散乱波の強度振幅。重要な事は (4) 式の 1 行目右の干渉項に複素振幅がそのまま残っており、波の伝搬を計算すれば散乱波の複素振幅を解く事が出来る事である。複素であるから「位相」が含まれている。残念な事に干渉縞は複素共役の和であり、実像には必ずその共役な虚像 (Ghost) が含まれてしまう。これが図 5 (c) の金粒子の周囲の円環状のパターンである。

次に図 4 (b) に示すような平面波によるホログラフィーにつき位相差を計算すると、(1) 式と全く同じ形の式が得られる。ただし  $L = \delta$  となっている。Gabor in-line holography では  $\delta$  は  $100 \mu\text{m}$  程度であるから、near field の散乱波を観察している事になる。つまり Fresnel 回折を観察していることに

等しい。従って、像の再生は、Fresnel 回折を次の Kirchhoff-Sommerfeld 積分によって上流へ逆伝搬することによって一意に決定される。

$$\Psi(x, y, z) = \frac{1}{i\lambda} \iint \Psi(x', y', 0) \frac{e^{-ikr}}{r} \cos\theta \, dx' dy' \quad (5)$$

これを数値積分によって直接解くことも可能ではあるが、計算時間が膨大となるため実用的ではない。幸いなことに、(5) 式が畳み込み積分となるため、高速 FFT を用いた次のような手法が知られている<sup>3)</sup>。

$$f_0(x, y) \xrightarrow{\text{FFT}} F_0(p, q) \rightarrow \left[ \exp\left[\frac{1}{2} ikz\lambda^2 (p^2 + q^2)\right] \right] \xrightarrow{\text{FFT}^{-1}} f_z(x, y) \quad (6)$$

ここで第三項は伝搬による位相変化を表現している。

ところで、通常の X 線回折実験は図 4 (b) に相当しているが、細く平行な X 線ビームをサンプルに照射し、その回折像を下流で観察するため、入射ビーム（参照波）と散乱波は重ならない。従ってホログラムとはならず、(4) 式の  $A^2$  のみが観察され位相情報が失われており、(5) 式を積分しても正しい複素振幅は得られない。これが回折現象における位相問題である。X 線自由電子レーザーの応用分野において  $A^2$  の空間分布から反復法により位相を回復する試みが行われて来たが、解の不安定性を完全には解決できていないようである。

### 4. 顕微鏡像の例

図 5 に、開発初期に撮影した例を示す。グラフェンの上に乗せた金粒子 ( $20 \sim 50 \text{ nm}$ ) を SEM 観察したものである。当時 (2015 年)、我々の実験室は 3 階にあり、すぐ隣で大学の建屋建設工事が行われており、地響きがするぐらいの振動の中で撮影した。ご覧の通り、SEM 像が大きく揺らいでいる (振幅  $\sim 20 \text{ nm}$ )。図 5 (b) はホログラムであり、ニュートンリングが観察される。図 5 (c) が実像に戻したものである。中央に見える金粒子の詳細な形状は、静穏な状態にあ

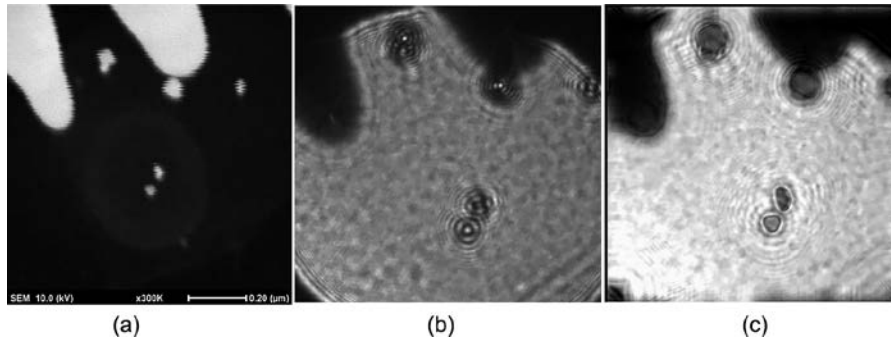


図5 (a) グラフェン上の金粒子, SEM像 (b) ホログラム (20 kV,  $\delta$  100  $\mu$ m), (c) 回復されたサンプル像. 上部の大きな2個の物体は, 破損したSiNグリッドの影であり, グラフェンの転写とクリーニング中に破損したと推測される.

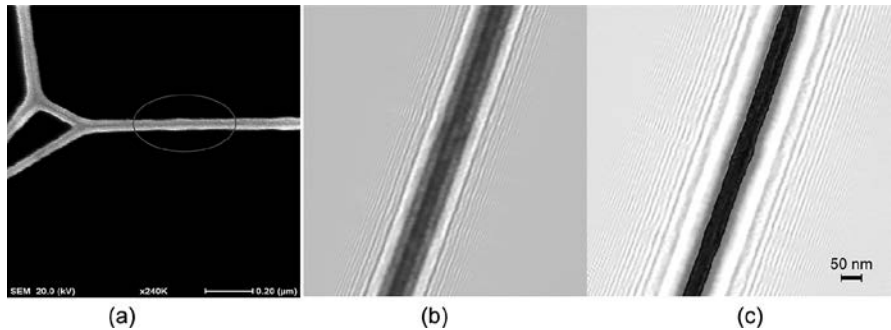


図6 (a) lacey carbonのSEM像, (b) ホログラフィー, (c) 回復像 (反復ゴースト処理なし)

る別のSEM観察した像と一致した. 分解能は3 nm程度であった. ご覧のように, 回復された実像には振動が消えている事がわかる. これは回折波による顕微鏡法が振動の影響を低減できる事を示している. なお金粒子の周辺の黒い汚れのような部分とリング状のさざ波がGhostである. 単粒子解析の場合, 粒子が孤立していれば, 反復法によりGhostを消す手法が各種報告されている<sup>4)</sup>.

2015年末になり新建屋が完成し, 振動の少ない1階に電子顕微鏡を移設し, ソフトマテリアルや氷包埋した生体サンプルなどの観察を行なって来た. 図6が市販されているTEMグリッド (lacey carbon) の撮像例である. 図6 (a)の赤丸部分に参照光の中心を合わせて, サンプル位置を下流へ200  $\mu$ mずらして, 20 kVにて2秒間撮影したものが図6 (b)のホログラフィーである. これを(6)式に従って物体像に戻したものが図6 (c)である. lacey carbonの細部がよく観察できているのがわかる. 分解能は約1 nm程度であるが, これはGemini Columnが作り出す焦点での交差角度によって制限されており, 現在のオプティクスでは3.5 mradであり, (2)式による分解能は1.5 nmでありほぼ観測値と合致している. 実像の周辺に残っている干渉縞がゴーストであり, 反復法で消去できる事がわかっているため, 今後実装する予定である. なおホログラフィー像が回転しているのは, サンプルから下流のプロジェクトシステムに使われている2個の磁場レンズによるビーム軸の回転によるものである.

現在, 氷包埋した生体サンプルの撮像条件の最適化を行っている. 当初, 氷包埋装置 (FEI Vitrobot) を用いて通

常のパラメータにて実験を行っていたが, 氷の厚さが100 nm程度の場合, 30 kVの電子が通過できないため, 氷を薄く (<50 nm) 作る条件だしを行なっている. これは当初予想したようには単純ではなく現在, 基盤の選定, 氷包埋パラメータの調整, 界面活性剤による表面張力の調整などを行なっている.

なお氷包埋したタバコモザイクウイルス (TMV)などを試験的に観察しているが, まだ氷が厚いために, 長い照射時間を要しており, 結果的に電子照射量が高くなり ( $\sim 100$  e/A<sup>2</sup>), サンプルのダメージが発生しており紙面に発表できるイメージはまだ得られていない. 今後, 調整が進めばウイルス等のイメージが高いコントラストで1回の撮像で得られる事を期待している.

この開発を通じた経験が, 将来的には標準的なTEMをベースにした高分解能のIn-line Holographyへの発展も視野に入ってくるだろう. また数100 Vという低いエネルギーによるイメージングも基礎物理研究に貢献できるだろう.

## 文 献

- 1) Gabor, D.: "A New Microscopic Principle", *Nature*, 161, 777-778 (1948)
- 2) Toggle, D.W., Li, J.Z. and Swanson, L.W.: *J. Microscopy*, 140, 293-301 (1985)
- 3) E.G. Steward, *Fourier Optics: An Introduction (Second Edition)*, Dover Books on Physics, ISBN 0-486-43504-0 (2011)
- 4) Tatiana Latychevskaia and Hans-Werner Fink, "Solution to the Twin Image Problem in Holography", *Phys. Rev. Lett.*, 98, 233901 (2007)