

THE HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

WINTER 1984
VOL.27 NO.4

U.D.C.621.385.833.2.533.5

目次

電子顕微鏡特集

巻頭言

電子顕微鏡と周辺技術……………
……………神谷芳弘… 1

報文

電子顕微鏡デジタル画像処理…
……………金谷光一… 3

医学・生物学分野の電子顕微鏡学
へのパーソナル・コンピュータ
の応用……………

堀田康明 石樽克範 渡 伸三…14

解説

半導体プロセス評価用S-806形
日立走査電子顕微鏡…中泉 泰
神田公生 渡部忠雄 山田満彦…18

H-800UHR形日立超高分解能電子
顕微鏡……………砂子沢成人
渡部忠雄 鶴田忠正 上村昌司…24

トピックス

U-3200形/U-3400形日立ダブル
モノクロ分光光度計…………… 2

F-3000形日立分光蛍光光度計……………17

F-1100形日立液クロ用蛍光光度計…17

833A形日立クロマトデータ処理
装置……………32

S-510/Z-7000がGマークを受賞…… 2

第23回分析機器展盛況裡に閉幕……32

電子顕微鏡特集

巻頭言

電子顕微鏡と周辺技術

Electron Microscope and Its Peripheral Techniques.

神谷 芳弘*

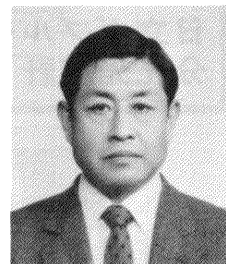
(昭和59年10月18日受理)

X線と電子線がともに物質の原子構造の研究に利用出来ることが明らかになってから半世紀以上たつ。X線に比して、電子にはレンズがあり、また偏向装置で電子ビームを自由自在に取扱うことが出来るため種々の興味ある機器を生み出した。さらに電子は原子との相互作用がX線に比して圧倒的に強く、微量な物体からでも必要な知識を得ることが出来る。しかし、初期にはこれらの長所が逆に短所になってあらわれていた。磁界や電界により電子ビームを自由に動かせるということは逆に外部の漏洩磁界や小さなごみによる電界により

電子は容易に動き、安定性に欠くことを意味する。筆者が電子線の実験を始めた頃は十分に腕を振える時代であった。レンズも理想的には動作せず、得られる結果は装置の調整、撮影技術に大きく依存し、オペレータに良い人を得るかどうかが決め手になった。電子の散乱が強いため限られた薄膜試料が観察対象であった。

その後二十年程度で電子顕微鏡をはじめ電子機器は大きく変化し、使用に際して特に技術を要することなく広い分野に応用されるようになった。このように発展した原因は勿論一つではないが、その中で重要なものの一つに真空をあげることが出来よう。真空を改良する必要性は以前から指摘されてきたが、それが実現するのに随分と時間がかかった。真空の改善によって装置の安定性をはじめ、試料汚染の軽減および新しい電子源の開発が可能になり、高分解能の実験が容易になった。これに附随し、いままで見えなかった顕微鏡の欠点がはっきりし改良が重ねられ、めざましく発展した。最近の電界放射電子源を用いた電子顕微鏡では、ほぼ理論分解能まで達成されている。真空の改良に随分と時間がかかったと述べたことについて補足しておきたい。超高真空装置が普及しだしたのはそれ程以前ではなく、電子顕微鏡を使用する人々が高真空に接するようになったのは最近の事である。それによりベークিংをはじめ真空の取扱いも変わってきた。勿論、電子顕微鏡の性能を犠牲にして真空をよくしても無意味であり、一つの発達した技術を導入するにはかなり広いバックグラウンドを必要とする。真空は電子顕微鏡本体の共通な技術であったため改良されてきたように思われる。今後も電算機によるデータ処理、画像処理などで顕微鏡本体が質的に変化することも考えられる。

電子顕微鏡を支える周辺技術としていま述べたものにひけをとらないものがある。



*豊田工業大学教授、理博

その一つが試料技術である。現在の高分解能の実験で Bradley のカーボン蒸着や坂田、深見のマイクロ・グリッドのお世話にならないわけにはいかない。新しい試料作製技術の開発から広い応用分野が生れた例は多い。この種の技術開発は研究者の仕事になる。もう一つが所謂アダプターと呼ばれるもので、個々の研究目的にあった装置ではあるがかなり共通性もあり、市販もされている。その種類も多くそれ

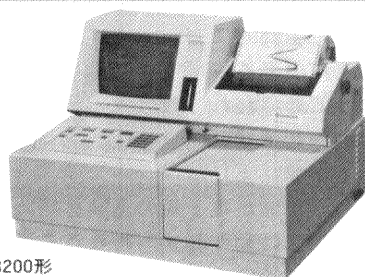
ぞれ開発には相当の時間と労力を要する。電子顕微鏡に規格がないため一つの機種に開発されたものが他の機器に使用出来ない不便がある。時間と労力を要することから、今後アダプターの開発が次第に困難になるように思われるので機器の規格化が望まれる。どのような装置でも言えることであるが、本体、アダプターと試料がうまくかみあって本来の機能が達成できるからである。

Topics

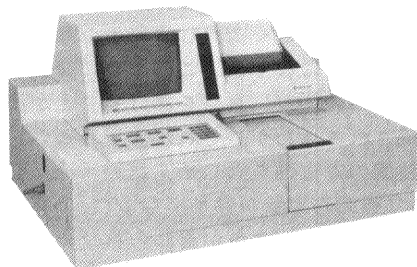
LA時代の自記分光光度計

——新分野に新技術。
すぐれた機能は、時代
を超える——

日立ダブルモノクロ 分光光度計



U-3200形
日立ダブルモノクロ分光光度計



U-3400形 日立ダブルモノクロ分光光度計

日立独自の分光技術と最新のマイクロコンピュータ技術を高度に生かした、多彩なデータ処理機能、日立分析機器専用言語によるユーザーズプログラム機能、データファイル機能等を開発し、その技術をおしげもなく搭載し、時代にマッチした新しい概念の U-3200 形と U-3400 形を完成しました。

■特長

(1) ダブルモノクロメータの採用により高分解能と低迷光を実現しました。

(2) 分野別システムソフトパッケージを豊富に揃えました。

(3) 日立分析機器専用言語によるユーザーズプログラマブル機能が搭載されています。

プログラムのための言語を覚える必要はありません。本体の操作キーの手順を忠実にコンピュータが記憶し、それを後でそのまま実行します。

さらに準備された簡単なコマンドを使ってプログラミングすればより高度のデータ処理、及び報告書作成までも実行します。

(4) システムの自動校正、自己診断までしてくれます。

(5) ソフトキーの採用により、従来の分光光度計では実現できなかった多機能化と操作性が抜群に向上しています。

(6) コンパクトフロッピーディスク、グラフィックプリンタ、CRTが標準として搭載されています。

(7) リピートスキャン、自動プログラムスタート、微分スペクトル、波長プログラム、 λ 波長演算、一定波長(時間)間隔の測光計測、定量機能、レートアッセイ等の各種演算機能と、20種の分析条件記憶、データファイル機能など、多彩な機能を保有しています。

■仕様

U-3200形

分 光 器：グレーティング—グレー
ティングダブルモノクロ

波 長 範 囲：190～900nm

分 解 能：0.15nm

迷 光：0.0005%(at 220nm)

ディスプレイ：12インチ CRT

記 録：感熱式グラフィック・プリンタ

補助メモリ：3 インチコンパクトフロッピー

そ の 他：ユーザープログラム機能等

U-3400形

分 光 器：プリズム—グレーティング
ダブルモノクロ

波 長 範 囲：187～2600nm(N_2 バージ可)

分 解 能：0.07nm

バンドパス：VIS 0.07～6nm

NIR 0.17～14nm

迷 光：0.0001%(at 220nm)

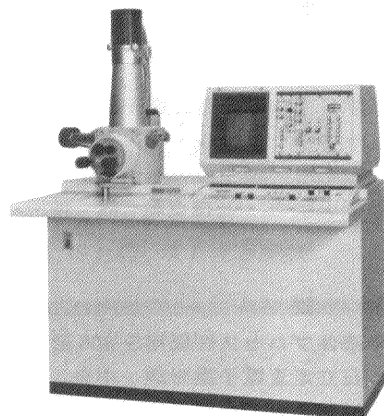
ディスプレイ：12インチCRT

記 録：感熱式グラフィック・プリンタ

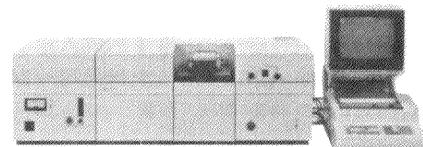
補助メモリ：3 インチコンパクトフロッピー

そ の 他：ユーザープログラム機能等

S-510/Z-7000 がグッド デザイン(Gマーク) 受賞



S-510形日立走査電子顕微鏡



Z-7000形日立偏光ゼーマン原子吸光光度計

59年度通産省グッドデザイン商品の選定審査は、8月から10月にかけて海外製品も含め、約4500点について実施されました。特に本年から商品の審査対象が拡大され、産業機械関係も含まれるようになりましたので、那珂工場からも数点応募、計測器としては、初めて S-510 形走査電子顕微鏡と Z-7000 形ゼーマン原子吸光分光光度計の2機種が合格し、「Gマーク」を受賞することができました。本選考には、現品による外観、性能、信頼性の厳しい検査が実施されるものです。

報 文

電子顕微鏡デジタル画像処理

Digital Image Processing for Electron Microscopy.

金谷 光一*

(昭和59年9月28日受理)

1. 諸 言

電子顕微鏡像から物質の構造解析を行う場合、白黒像のコントラストの変化のみで、直ちに原子や分子構造の配列を決めることは難しい。例えば、高解像透過電子顕微鏡(TEM)で撮影された像は位相コントラスト像と考えられ、試料は強位相物体として取扱わねばならない。透過波と回折波さらに回折波同志の干渉によってコントラストが変化し、その上に電子レンズの収差や入射電子が物質と衝突し、散乱する際の散乱位相などによっても位相が変化し、わずかのピントのずれの変化があっても白から黒に変化するからである。そこで波動光学的形像理論に基づいて、散乱振幅と位相とを正確に定量化して判断しないと、構造解析は出来ない。

撮影されたTEM像は音声やビデオ信号と同時に、アナログ信号であって連続ではあるが、必要なものと不必要なものとの信号を選り分けることが難しい。

本報告は、写真フィルムに記録された電顕像を、光濃度計の回転ドラムによって走査し、入力輝度信号をまずパルス化し、画像の波形を正しく再生するためフーリエ変換し、各周波数の振幅と位相を正確に計測し、再生像によって確かめる。さらに雑音を除き、フィルターによって像を選択し、修正し、特に構造解析に必要な伝達情報のみを抽出して、再生像を求める計算機によるデジタル画像処理法を考案した。異なる方位の電顕像があればこの方法に基づいて、三次元的立体構築がブラウン管上に表示される。

従来、電顕像をレーザー光を用いた光回折法¹⁾により、電子回折或はX線回折理論の助けを借りて、光学レンズによって像を再生し、解析を行う方法が開発され、特に周期構造をもった正二十面体のヴィールス²⁾(brome mosaic virus)や酵素(ox-liver catalase)の構造が解明された。

我々の方法は光回折の代りに計算機回折を用い、振幅と位相を計測し、再生像で確かめ、絞り関数(デジタル絞り)によって必要な情報を個別に抽出するところに特長があり、計算機によるフーリエ合成法と考えることができる¹⁾。

図1は、光走査濃度計(Rhesca製)とマイコン(Sord Mark VI)から成る画像処理装置を示す。電顕像(処理面積 $1.28 \times 1.28 \text{ cm}^2$)は $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ の光走査線によって約5分間で濃度目盛が0.01Dから3Dまでの間で、256階調で入力し、デジタル化する。走査は回転ドラムで行い、反射光でも透過光でも何れでも利用できる。入力されたサンプルの各点は対数目盛の信号を磁気ディスクとテープにデジタル化された濃度値として蓄えられる。又処理像はプリンター或はカラーブラウン管上に表示される。

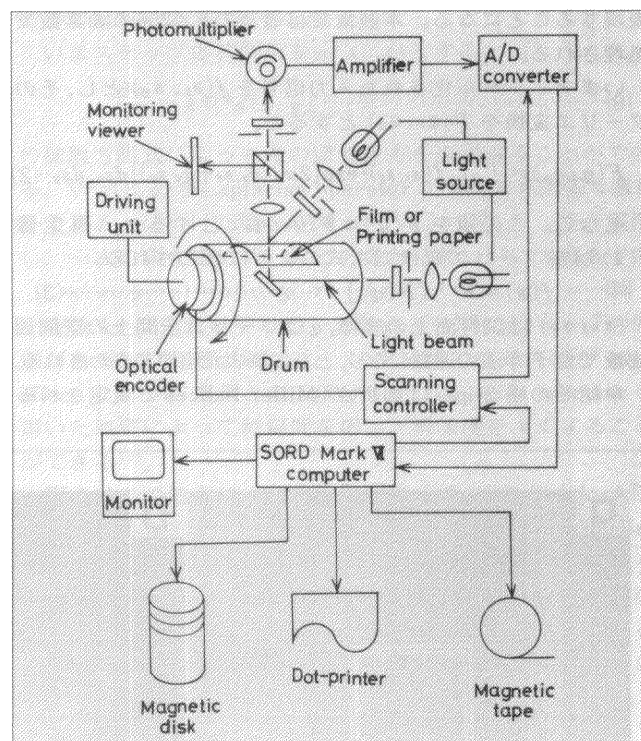


図1 光走査濃度計をもったデジタル画像処理装置

以下構造解析に必要なデジタル画像処理を具体例によって解説すると共に、それら処理の代表的応用例について説明する。

2. デジタル電子顕微鏡像処理

各種のプロセス変化量、すなわち温度、圧力、電流、音、光束などはいずれも連続的なアナログ量であるが、光通信やファクシミリなどの制御技術の進展とともに、ますますその精密な動作と高度の操作が要求されるようになり、このためのデジタル方式による信号伝達、変換などが考えられるようになった。

穿孔されたテープやカード或は光では、画像を構成する画素のように符号すなわちデジタル量による信号伝達が、デジタル計算機の普及に伴って急速に広まった。

信号をデジタル量として表わすとS/N(信号対雑音比)が限界値以上なら精度よく伝送され、より正確であり貯蔵能力が大きい。また断続的で連続でない欠点もシャノンのサンプリング定理で定義されるナイキスト間隔以上の画素数で処理すれば、もとのアナログ信号を忠実に表示することができる。デジタル録音のレコードが優れていることから明白であろう。

*工学院大学教授、工博

信号の連続波形 $f(x)$ の空間スペクトルが $W(\text{cm}^{-1})$ 以下に制限されている場合、それは $1/2W(\text{cm})$ ごとにサンプルした $f(x)$ の列画素数 n によって完全に表示される。すなわち、

$$f(x) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} f\left(\frac{n}{2W}\right) \frac{\sin \pi(2Wx-n)}{\pi(2Wx-n)} \dots \dots (1)$$

この式がアナログ信号をデジタル信号に変換するための基礎を与えてくれる。

このシャノンの定理によるナイキスト間隔 $1/2W$ 以上の画素数でデジタル化すれば、もとのアナログ信号を忠実に表現することになる。本装置では普通 256×256 の画素数で処理される。

いまデジタル化された入力信号を $f(s_x, s_y)$ とし、そのフーリエ変換を $F(q_x, q_y)$ とすると、

$$F(q_x, q_y) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(s_x, s_y) \cdot \exp[2\pi i(q_x s_x + q_y s_y)] ds_x ds_y \dots (2)$$

となる。この値を $F(q) \equiv F(q_x, q_y)$ とすると、再生像 $f(s)$ は逆フーリエ変換で次式のように表わされる。

$$f(s) = F^{-1}[F(q)] \dots \dots \dots (3)$$

(s_x, s_y) は試料面上の座標、 q はフーリエ空間上の空間周波数で粒子寸法の逆数になり、ともに無次元座標で表わされる。

単結晶の場合 q_{hkl} は回折点 (Miller indices で規定される

逆格子点) を表わす重要なパラメーターである。TEM像の場合、 s と q は電子波の波長 λ 、対物レンズの球面及び非点収差係数 C_s と N 、さらに焦点のずれ $\Delta z = z/\sqrt{C_s \lambda}$ に関係して表現される。

フーリエ変換された計算機回折像の強度スペクトラムは格子像を示す q_{hkl} の干渉項と非干渉項に分かれる。

$$D(q) = F(q_{hkl}) \bar{F}(q_{hkl}) + F(q) \bar{F}(q) \dots \dots \dots (4)$$

第1項は単結晶の場合ラウエ斑点として一般に対となつて現われ、位相を含み結晶格子の決定に使用される。第2項は振幅コントラストによる項で、スペクトラムの中心部附近の情報から成り立ち、非干渉の項で、試料が厚くなると強度が増える。一般に暗視野像となる項と考えてよい。

2.1 フィルタリング

図2の(a)は200kVのTEMによって撮影された面心立方格子の金単結晶である。(b)は計算機回折像で、 $q_{001}, q_{002}, q_{022}$ で代表される4点1組みの逆格子点と1対の q_{004} 格子点の配列から $[001]$ 一方位であることが解る。(c)は(b)の回折点を除いた回折スペクトラムの逆フーリエ変換暗視野像で、結晶の構造解析には不必要なもので、フーリエ合成法では不必要な信号としてフィルタリングする⁴⁾。

(d)は高次の q_{004} と $q_{00\bar{4}}$ のみによる計算機再生像で格子間

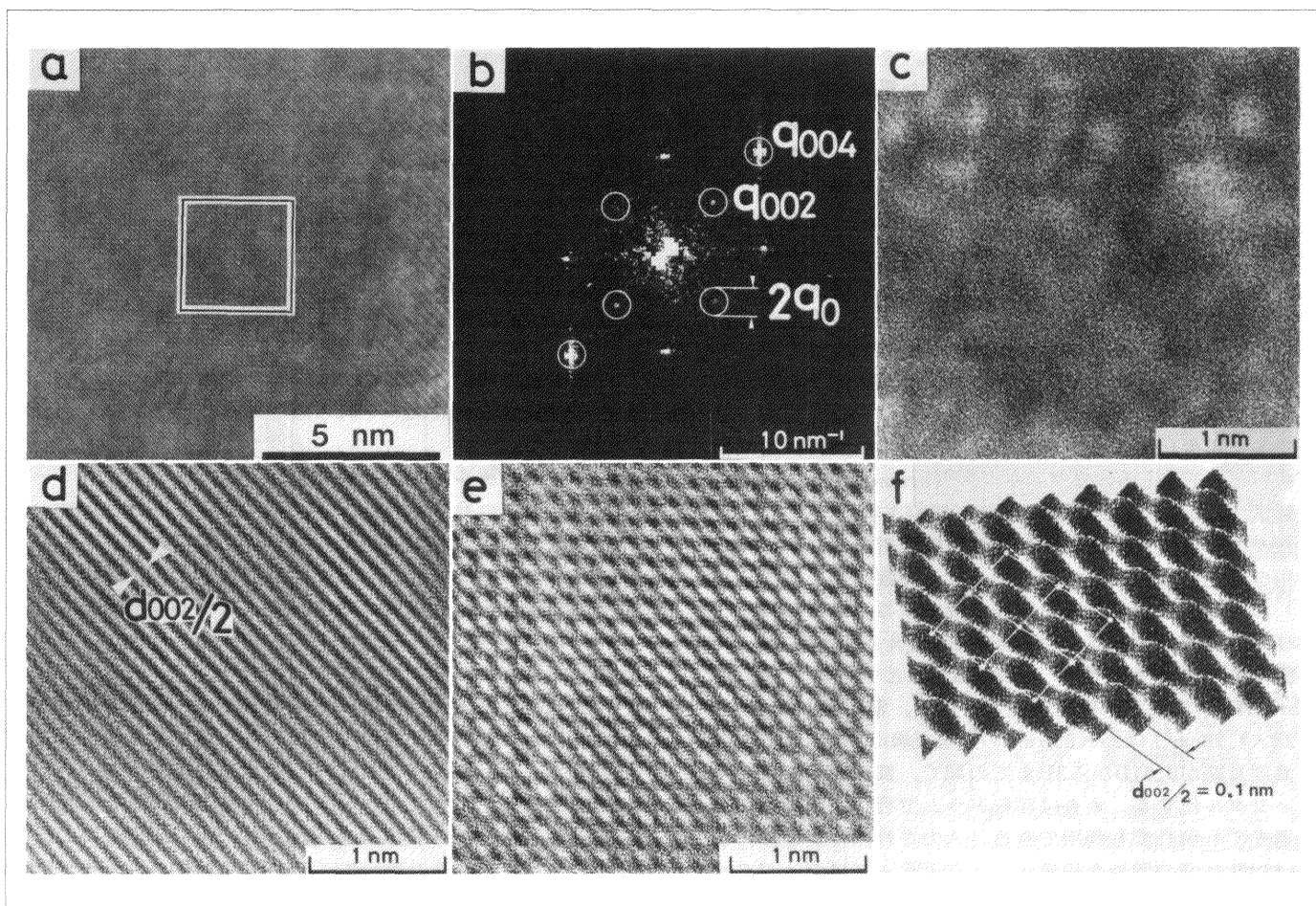


図2 フーリエ変換によるフィルタリングを利用した金単結晶の構造解析、(a)TEMによる原画像 (b)フーリエ変換による計算機回折像 (c)暗視野像で、逆フーリエ変換でフィルタする。(d) q_{004} と $q_{00\bar{4}}$ による1/2格子像 (e)面心立方格子 $[001]$ 一方位の格子像、白が原子位置を示す。(f)濃度の輪郭陰影法を用いた金単結晶の三次元構造。

隔の $\frac{1}{2}$ の間隔を示す干渉像で約0.1nmの分解能を実証している。

いま、 q_{hkl} と $-q_{hkl}$ の1対の回折像の逆フーリエ変換を求めると、フリーデルの法則によって、

$$I_g = \sum [2F_r(q_{hkl})] \dots\dots\dots(5)$$

となる。このように任意の回折点からの格子像は $F(q_{hkl})$ の実数部 $F_r(q_{hkl})$ の2倍が格子像を示すことになる。実際の計算はCooley & Tukey⁵⁾(1965)のアルゴリズムを用いて $F(q_{hkl})$ の振幅と位相が中心の振幅に対する比 f_{hkl} と α_{hkl} として求められ、その個々の格子点の再生像から白(正)か黒(負)を判定することができる。又、計算機回折像からの逆フーリエ変換では、光回折の絞り窓の代りに、任意の形状の絞り関数(bの逆格子点を囲む円)を掛けることができ、不必要な格子欠陥や転位による格子点からはずれた信号をフィルターすることができる。又、逆に規則正しい格子点からはずれた信号を強調して、再生し、結晶の転位や積層欠陥を検出することもできる⁶⁾。

(e)はすべての逆格子回折斑点を再生した金単結晶の格子像で、各協調波の位相 $\alpha_{001}=\alpha_{002}=\alpha_{004}=0$ で原子は白で現われていることが各協調波の重ね焼き像から判明した。(f)は解析結果を基にして処理した三次元的構造である。

フーリエ変換によるフィルタリングの他に、雑音を抑え正しい信号を取り出したり、試料の微細構造をより明らかにする目的で種々のフィルターが考案されている。

帯域濾波器の各帯域の空間周波数と集団原子の粒子寸法とを関係づけて、個々のクラスターの再生像から薄膜中のクラスターの配列を処理して成功した応用例がある⁷⁾。

2.2 コントラストの強調

一般に像のコントラストの強調法としては、(a) Gradient, (b) Acutance, (c) Laplacian の3つの演算子処理によって行われ、それぞれ特長があり画像処理中で最も重要な演算処理法である。

与えられた関数 $f(s_x, s_y)$ を座標 (s_x, s_y) によって偏分した

$$G[f(s_x, s_y)] = \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial x}\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial y}\right)^2} \cdot \exp\{i \tan^{-1}[(\partial f / \partial x) / (\partial f / \partial y)]\} \dots\dots\dots(6)$$

がGradient operatorでコントラストを強調し、像を鮮鋭にすることに役立つが、平坦なコントラストとなる場所では見えなくなるから、もとの像と重ね合わせることが必要である⁸⁾。

$$f_s(s_x, s_y) = g(s_x, s_y) + m f(s_x, s_y) \dots\dots\dots(7)$$

適当なenhancement ratio m を選べると、粒子の寸法などを正確に測定することができる。 $g(s_x, s_y)$ は $G[f(s_x, s_y)]$ のスカラ量を表わす。

Acutanceは次式で与えられるようにGradientの2乗を濃度 D_0 で割った値で定義され、試料端の鮮鋭度増強に有効で、走査電子顕微鏡(SEM)の電子ビーム径の測定に利用された⁹⁾。

$$X = |G[f(s_x, s_y)]|^2 / D_0 \dots\dots\dots(8)$$

SEM像においては、コントラストが主として試料の二次電子放出率 δ の変化 $\Delta\delta$ によって発生し、 S/N が光子又は電子数の平方根 $\sqrt{n}$ に比例するから、Acutanceの値は直接二次電子放出率 δ を表わす。電子が物質を透過する際の

球形拡散モデルの理論¹⁰⁾と結びつけることによって、SEM像の情報伝達理論による取扱いが適用される。

解像度は分解能と“見え”の両方によるから、Acutanceは“見え”をよくする演算子として注目される処理法の一つである。

SEMではインパルスはステップ入力信号の正規分布関数より構成される低周波フィルターを通した応答がコントラストと考えられる。インパルス応答が入射電子ビームのスポット径を表わし、試料の凹凸を表わすステップ関数の応答が試料の表面構造の応答と考えることができる。

いまステップ応答関数を $a(x, y)$ とすると、

$$\frac{\partial a}{\partial t} = k \nabla^2 a(x, y) \dots\dots\dots(9)$$

の拡散方程式によって像のぼやけ方を表現することができる。 $\nabla^2 a(x, y)$ がLaplacian operatorで方向に無関係な演算子である。ぼやけた像を時間 $t=\tau$ によって、ティラー展開し、一次の項を求めて、もとの像から差し引いて再生する。

$$g(x, y, 0) = a(x, y, \tau) - k\tau \nabla^2 a(x, y, \tau) \dots\dots\dots(10)$$

定数 $k\tau$ は入射電子のビーム径 r_s との間に $k\tau = \pi r_s^2$ の関係があるものと考えられる。SEM像では試料端がedge effectによって変調されてはけるが、Laplacian operatorを用いた処理によって鮮鋭度を増し、解像度をよくすることができる¹¹⁾。

図3はこの処理による応用例¹²⁾を示す。日本女子大、大隅教授によるカボチャの黄色色素体中の正四面体(Prolamellar body)のSEM像が(a)で、上記処理像が(b)である。図から正四面体中の細管構造(正四面体の中心の穴)の存在を確認することに役立った。図中の計算機回折像の回折斑点からも細管構造の寸法が確認され、(b)の方が解像度が改善されていることが明瞭である。

2.3 雑音除去

電子顕微鏡は真空管と同様に電子ビームで像信号を記録するから、統計的量子ノイズを除去しなければならない。ノイズは主として連続で白色ノイズと言われるものが多く、信号の平方根に比例するものと考えられる。このような白色ノイズの除去には平滑化処理が効果的である。一般にSEM像では直接平滑化ノイズ除去法によって前処理し、先に述べたLaplacian強調法をもってコントラストの増強を行うが、ノイズ除去はフーリエ変換法で行うことができる。フーリエ変換像ではノイズは主として中心部からはずれた空間周波数成分と考えられるから、高周波成分を除去することによってノイズの除去された再生像を得ることができる。しかし逆に低周波ノイズの場合は、自己相関関数を用いたフーリエ変換で中心部にあつまる低周波ノイズを除去¹³⁾しなければならない。

ノイズ除去は画像処理の前処理として非常に重要で、この処理をややまると以後の処理の効果が薄れる。

SEM像ではノイズがコントラストのピーク値に片寄る場合もあり、普通の平滑化処理では効果がない場合もある。像近傍の値の中心部の値を採用するmedian filteringによるノイズ除去法も行われている。

2.4 三次元的立体表示

電顕像は二次元座標で与えられるから、これを利用して

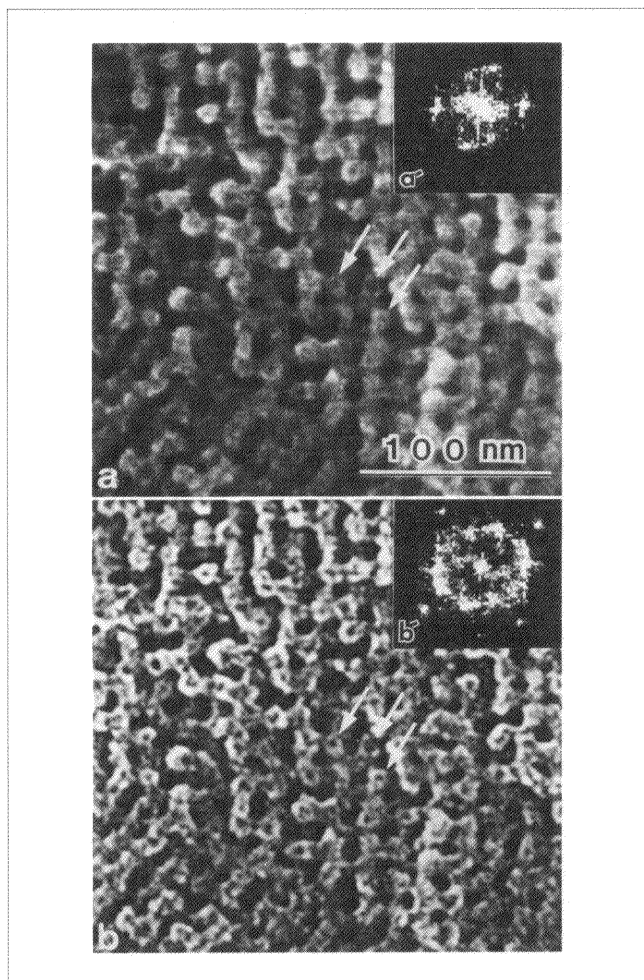


図3 ラプラシアン演算子によるコントラストの強調 (a) 無蒸着で観察された黄色色素体中のプロラメラボディのSEM像, (b) ラプラシアン演算子による処理像, それぞれの計算機回折像を右上方に示す。

三次元的立体構築を行うことが、構造解析において欠くことができない。さきの図2の(f)に示した濃度スペクトラムを三次元座標で表わす方法、さらに下記に示す等濃度地図による立体的表示は結晶格子位置の参考座標として極めて重要である。結晶構造が明白でない場合には、3つの異なる方位の電顕像を利用して、正確に単位胞の構造を決定する。酵母のサブ・ユニットの解析はこの代表例である。

超薄切片切断法による試料の連続撮画像から、内部構造を構築する三次元立体表示法は、デジタル画像処理法に最適の応用例として極めて重要な画像処理法の1つである。

図4は、人間の腸の正常な線管にできた初期病変(腫瘍)の内部構造の三次元的構築への応用例¹⁴⁾である。(a)は連続切片法によって得られた切片の連続光学顕微鏡写真を示す(浜松医大 中村博士提供試料)。これらの写真の特徴点をもった組織細胞の輪郭をディジタイザーにより処理し、同じ組織細胞と考えられる2つの特徴点を2枚の連続デジタル像中から選び、補間法によって座標を決定する。連続切片2~3 μ mの厚さからニュートンの等分補間法によって決定できる。任意の間隔で行う場合はラグランジュの補間

法が利用できる。次に三角形による3つの有限要素から成る座標を決定し、Lambertの輝度余弦則によって輝度を決定することができる。

いま任意の方向のユニットベクトルを ℓ とし、分割された三角形の垂直ユニットベクトルを n_i とすると、 $n \cdot \ell$ によって照明され、分割された単位要素の輝度 B_i は次の式で表わされる。

$$\left. \begin{aligned} B_i &= n_i \cdot \ell / (a_i \cdot b_i / 2) \sin(\hat{a}_i \cdot \hat{b}_i) \\ n_i &= [a_i \cdot b_i] / (a_i \cdot b_i / 2) \sin(\hat{a}_i \cdot \hat{b}_i) \end{aligned} \right\} \dots\dots\dots (11)$$

ここに a_i, b_i は、任意の i 要素で構成される三角形の2辺の値を示す

任意の方向による照明を考慮したLambertの輝度法則によって、内部組織のコントラストの変化像を求めたのが(b)である。この方法では、任意の方向からの観察像は勿論、座標の回転、切断面、また必要な部位のみの像を構築することが可能である。

3. デジタル・フーリエ構造解析

デジタル・フーリエ合成法では、まず像を光走査濃度計でデジタル化し、入力点の座標を決定する。終始一貫してこの取り込み座標は変わらない。次にこれら入力された画像のフーリエ変換による計算機回折像を得る。この処理過程の途中の計算から振幅と位相を読みとる。さらに逆フーリエ変換した再生像の白黒コントラストから位相の正負を決定する。コントラストの増強は勿論、各種の窓関数や帯域濾波器を用いて、フーリエ回折像の中から必要な協調波のみを取り出すこともできる。

運動学的理論が適用できて、ブラッグの回折条件を満足する薄くて完全な結晶を考えると、電顕像は結晶の規則的構造因子で与えられる散乱振幅 $|F(q_{hkl})|$ と位相 α_{hkl} で代表される個々の協調波によって合成されるものと考えることができる。

対称性をもった結晶ではフリーデルの法則が適用できて、フーリエ合成波は個々の協調波、すなわち、

$$|F(q_{hkl})| \cos [2\pi(ku + kv + lw) + \alpha_{hkl}] \dots\dots\dots (12)$$

の合成から成り立つ。この波は空間周波数 q_{hkl} で表わされ、格子間隔 d_{hkl} に垂直の平面波と考えることができる。 hkl はMiller indicesで単位胞 a, b, c とすると、 $u = x/a$, $v = y/b$, $w = z/c$ で表わされる無次元の座標で代表される。

再生された格子像のコントラストは電子密度分布 $\rho(r)$ から構成され、サンプリングされた原子又は分子の格子点を j とすると、次式で示すように、各格子点について個々の協調波を加算することによって求められる¹⁵⁾。

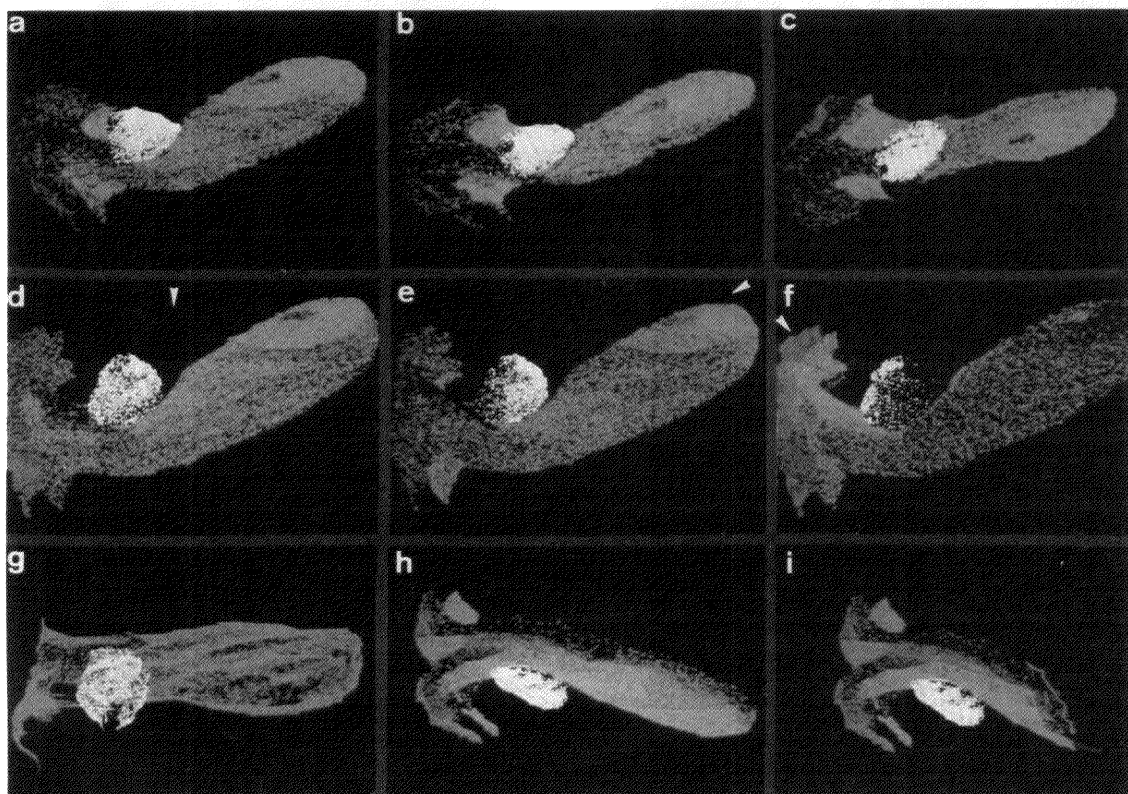
$$\rho(r) = \sum_{j=1}^N \rho_j(r) * \delta(r - r_j) \dots\dots\dots (13)$$

原子又は分子の中心 $r = r_j$ の座標を示すデルタ関数 $\delta(r - r_j)$ と電子密度 $\rho_j(r)$ の接合の総和が全体の再生像を形成する。

レンズの収差、焦点のずれ、さらに散乱位相などによる位相項 γ とそれ等の実数と虚数の相乗項による位相項 γ_a とすると、 $\gamma + \gamma_a$ によって異なる間隔をもった協調波は相対的に格子点が移動する。このためにフーリエ合成においては散乱位相を γ と γ_a を考慮して、正か負に補正することが必要である。Kanaya & Baba等による形像理論に従って、



(a)



(b)

図4 補間法による座標決定と照明の方向によるランベルトの輝度余弦則を利用した三次元立体構築。(a) 人の大腸の正常な線管にできた初期病変(矢印は腫瘍を示す。)の連続ミクロトーム切片の光学顕微鏡像。(b)は立体構築結果で、図a-cは試料を回転、d-fは照明の方向を変えた場合、矢印は l の方向を示す。gは透視モデル、hとiは断面の処理像。

$$\cos \alpha_{hkl} = \operatorname{sgn} [\sin (\gamma + \gamma_a)] = \frac{\sin (\gamma + \gamma_a)}{|\sin (\gamma + \gamma_a)|} \cdots \cdots (14)$$

から α_{hkl} の位相は正 (0) 又は負 (π) となる。すなわち、

$$\left. \begin{aligned} \alpha_{hkl} &= 0 \text{ for } \sin (\gamma + \gamma_a) > 0 \\ \alpha_{hkl} &= \pi \text{ for } \sin (\gamma + \gamma_a) < 0 \end{aligned} \right\} \cdots \cdots (15)$$

$\operatorname{sgn} [\sin (\gamma + \gamma_a)]$ は、位相伝達関数による符号関数として定義される。

この処理によって、格子点からはずれた錯乱像は除去される。

3.1 酵母の微小結晶体の構造解析

酵母細胞内マイクロボディ結晶体は酵母から構成され、大腸菌とともに遺伝子の組換えのための培養細胞として注目を浴びているが、マイクロボディの詳細な構造は確立されていなかった。

すでに TEM 像の光回折を用いたシミュレーションによって酵母は大小 2 つの酵素、alcohol oxidase A と catalase B から成ることが日本女子大 大隅教授によって確かめられていたが、2 つのユニットの正確な配置と特に catalase ユニット中のサブユニットの構造が従来の方法では確認できなかった。我々は大隅教授と協同でまず 3 方向の電顕像とそ

の計算機回折像 ([001], [011], [111]-方位) から 2 つのユニット A, B は q_{100} , q_{110} , q_{200} の回折点が存在することから、立方晶ではあるが面心立方格子で代表される NaCl 型でなく図 5 (a) に示す配置であることが解った。

図 5 はメタノールで培養された酵母 (Kloeckera cell) を凍結超薄切片法で切断し、醋酸ウラニルで染色し、100kV の TEM で撮影した試料の [001]-方位の電顕像 (a) とその計算機回折像 (b) であり、(c) は全部の回折斑点から再生した格子像で大小の A と B がそれぞれ alcohol oxidase と catalase を示す。(d) は各協調波の振幅と位相を計測し、フーリエ合成法によって解析した結果のモデルを示す。

図 6 はサブユニット構造解析結果¹⁸⁾を示したものである。(a) は 4 個の alcohol oxidase のサブユニットと片方の catalase のサブユニットの再生像で、(b) は alcohol oxidase ともう一方の catalase のサブユニットの再生像で、これらサブユニットの合成が (c) である。これらの結果を三次元的立体表示したのが (d) である。

結果として、酵母の微小結晶体は alcohol oxidase A と catalase B のユニットが特殊の面心三次元的配列をした、立方晶で、A は 8 個の 5.5nm 径のサブユニットから構成さ

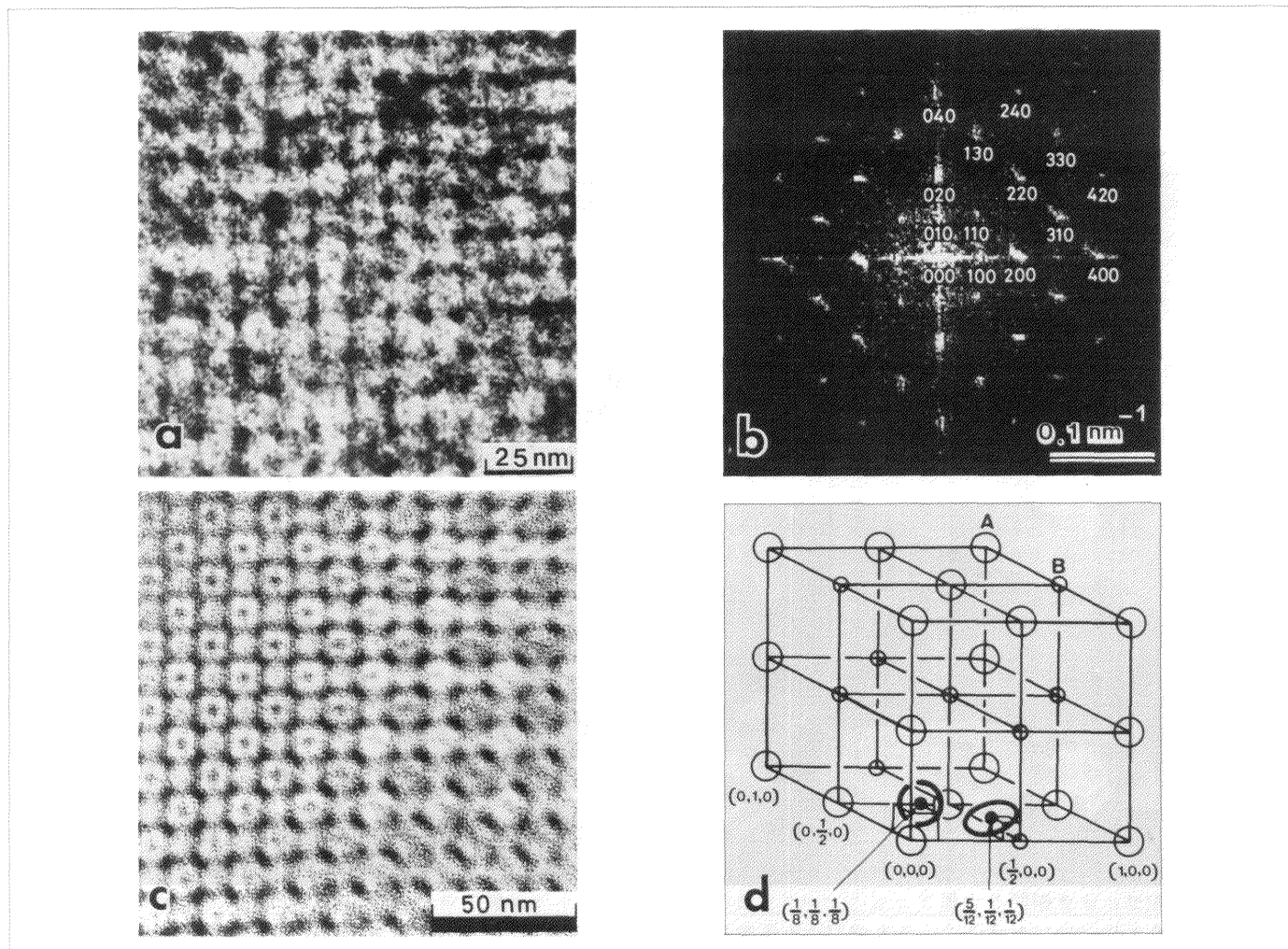


図5 酵母の微小結晶体の構造解析 (a) は [001]-方位の TEM 像、(b) 計算機回折像 (c) 再生格子像 (d) 構造モデル、A は、Alcohol oxidase B は catalase。

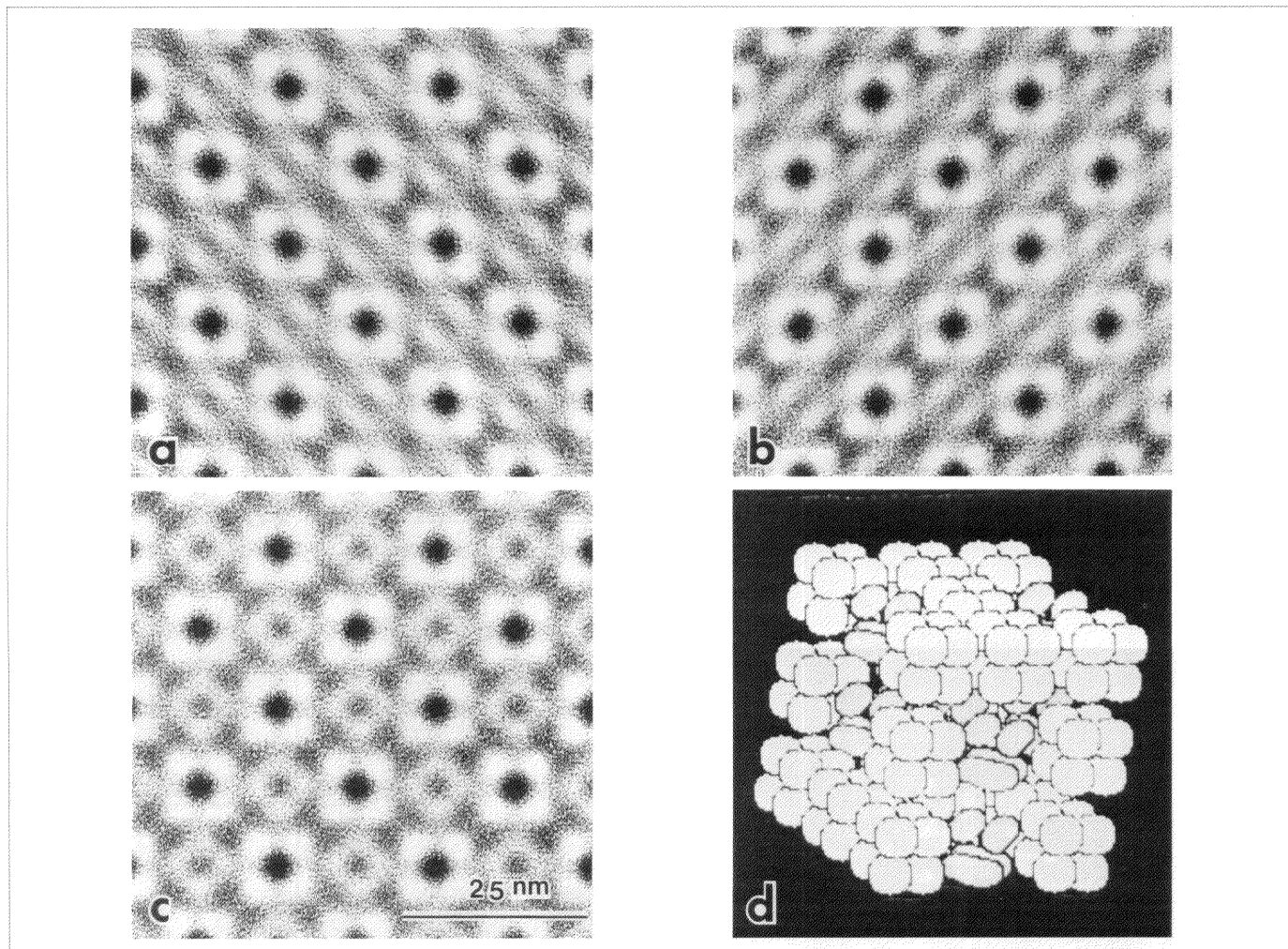


図6 微小結晶体のサブユニットの構造解析 (a)はAのサブユニット(q_{400} , q_{220} , q_{130} 及び q_{310})とBのサブユニット(q_{420} , q_{330} , q_{240})の格子像, (b)はAと反対側のBのサブユニット(q_{420} , q_{330} , q_{240})の格子像, (c)はABのサブユニットの合成, (d)は構造モデル。

され、11nmの直径をもつ。catalaseBは長さ7.8nm幅5.2nmの長い棒状のサブユニットが2個ずつ直交して配置され、4個のサブユニットから構成されることが解った。

3.2 人歯牙組織エナメル質の構造解析

人の歯牙組織と骨髄は六方晶の燐灰石 Hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ と同じような構造を示すことがX線と中性子回折の結果から確認されてきた。しかし、歯牙組織棒状結晶中に存在する約 10^{23} 個の原子がどのような格子配列でどのような結晶系になるか、原子間の結合と外力による歪はどのようなものであるかを実際に確かめた実験がない。アパタイトが硬く超薄片法で $10^3\text{\AA}$ 以下のTEM像観察可能な厚さに切断することが出来なかったのと、原子レベルの高分解能電顕が開発されなかったことに起因する。幸いにも、東京医科歯科大 一条 尚教授らのグループがエポンで包埋した人歯牙組織のダイヤモンド・ナイフを用いたマイクロトームによる切片試料の200kV、TEM日立H-700Hによる観察に成功したのが世界でも初めての成果と考えられる。これから示すエナメル質の構造解析は、一条教授と協同研究によるもので、人工的アパタイト構造との比較と、新しい PO_4 イオンやあいまいであった未確認のscrewed mirror

calciumの正しい配列を求めることであった。

使用した電顕の分解能が約2Åであるにも拘わらず、回折像中に電顕像では分離できない位相信号が含まれているならば別々の再生像ではあるが、格子間隔0.5Åの解像度をもった微細構造が鮮明に再処理できることを証明した。

デジタル画像処理法の最も威力ある成功例¹⁷⁾である。

棒状エナメル質単結晶を普通用いられる二重固定法で処理し、エポン812で包埋し、自然乾燥させた試料をダイヤモンドナイフで切断する。これら多くの切片から500Å以下の切片を選んで観察した。試料筒は側面からのside-entry typeを使用したため、200kVで対物レンズの球面収差係数 $C_s = 3.5\text{mm}$ である。

図7の(a)は[001]-方位のTEM像、その計算機回折像が(c)である。(d)は解析結果から確かめられた原子の種類を示してある。任意の格子像を抽出して、構造解析を検討する場合、参考座標の正確さが解析の良否を決定づける。(b)は $10\bar{1}$, $11\bar{0}$, $01\bar{1}$ の3組みのOHイオンを示す再生格子像の等濃度地図である。原子の正確な配列を求めるのに極めて有効な表示法である。

六方晶でMiller-Bravais座標によって指数づけされた回

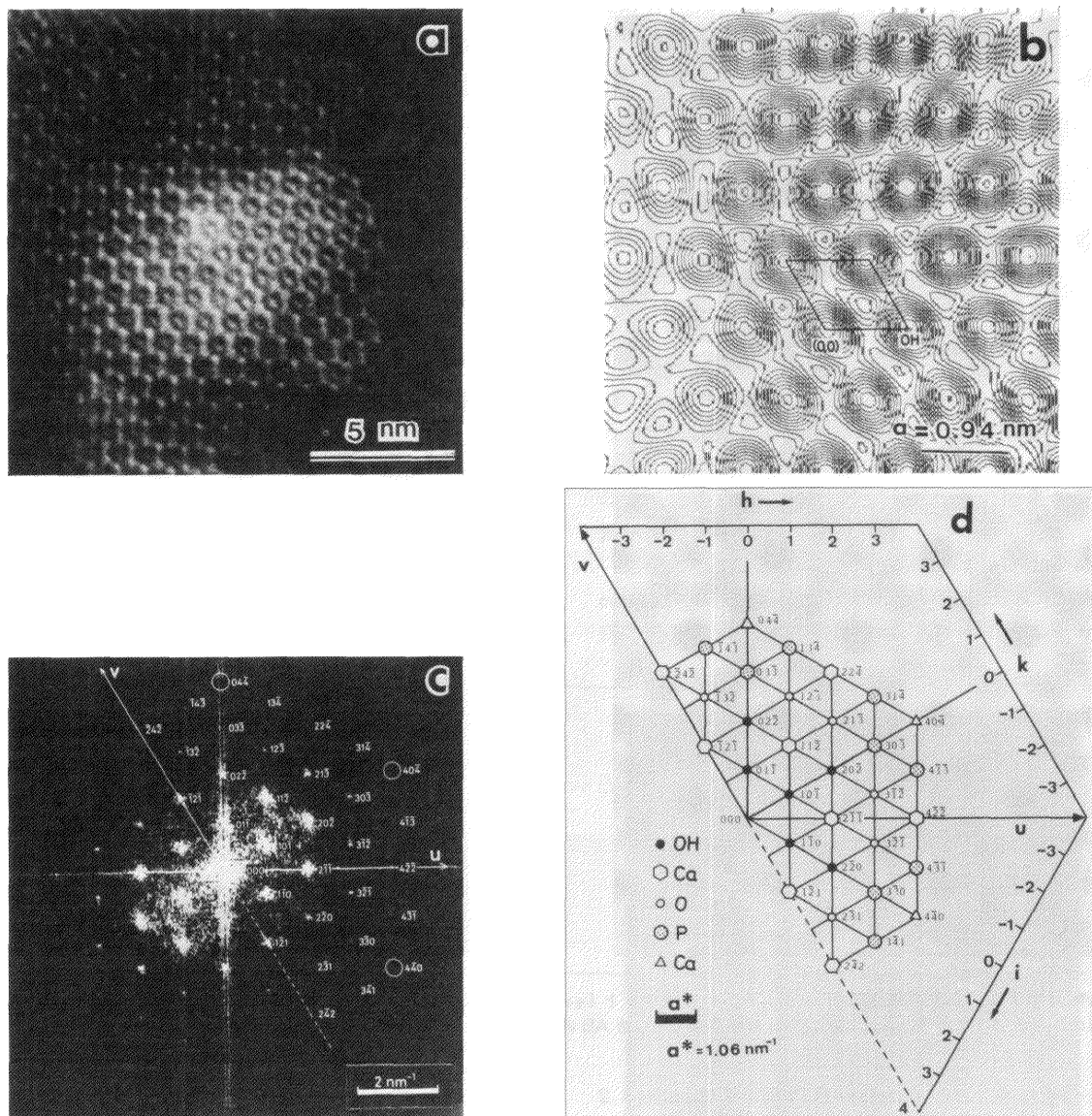


図7 人歯牙エナメル質の構造解析 (a) TEM 像, (b) 参考座標として使用する OH イオン格子像の等濃度地図, (c) は計算機回折像, (d) は Miller-Bravais 座標で指数づけされた回折斑点と原子の種類。

折斑点(c)は、空間周波数 q_{hki} に対応する格子間隔 d_{hki} によって (d) のように原子の種類を決定することができる。実測された各原子の協調波の振幅と散乱位相の値は、結晶学的理論的計算と数パーセント以内でよく一致した。個々の協調波が消失する extinction distance から結晶の厚さを測定すると約 150 Å であった。

従来の方法では PO_4 分子は P を中心とする四面体と考えられていたが、 O_2 分子の回折点が弱く確認されていない。図 8 に示す PO_4 分子の解析から PO_4 は P を頂点とするピラミッド型であることが解った。

図 8 の(a)は PO_4 分子の再生像で、(c)と(d)はそれぞれ u -軸に対して ± 20 度方向に現われる O_2 分子による格子像、(b)と(e)は PO_4 の三次元的配列である。さらに未確認の screwed mirror calcium は 3 組みの回折斑点を Gradient operator 処理によって強調し、再生格子像を実現することに成功した。

デジタル・フーリエ合成法による結果の画像処理の代表的判例を示したのが図 9 である。(a)は格子像、(b)は(a)と等濃度地図との重ね焼き像で、三次元的原子の配列が(d)である。

3.3 人筋肉悪性腫瘍の構造解析

蛋白質は、化学分析、X 線結晶解析、さらに電顕観察の結果、H, CH, CH_2 - C_6H_5 を基とする高分子でアミノ酸から作られ、驚くべきほど多くの種類があり、繊維状(10~100 Å)と球状(30~300 Å)の 2 種類に大別される。これら化学分析結果から、筋肉蛋白質の構造モデルはほとんどが人工合成のもので、実際の人の器官から採取培養した試料のものは少ない。慶応大 向井万起男博士と共同研究による人筋肉腫瘍中に発見した結晶蛋白螺旋構造の直接観察は、極めて重要な病理学的意義を持つ。この試料のアクチンの抗体反応から、腫瘍はアクチン分子から構成されることが確かめられ

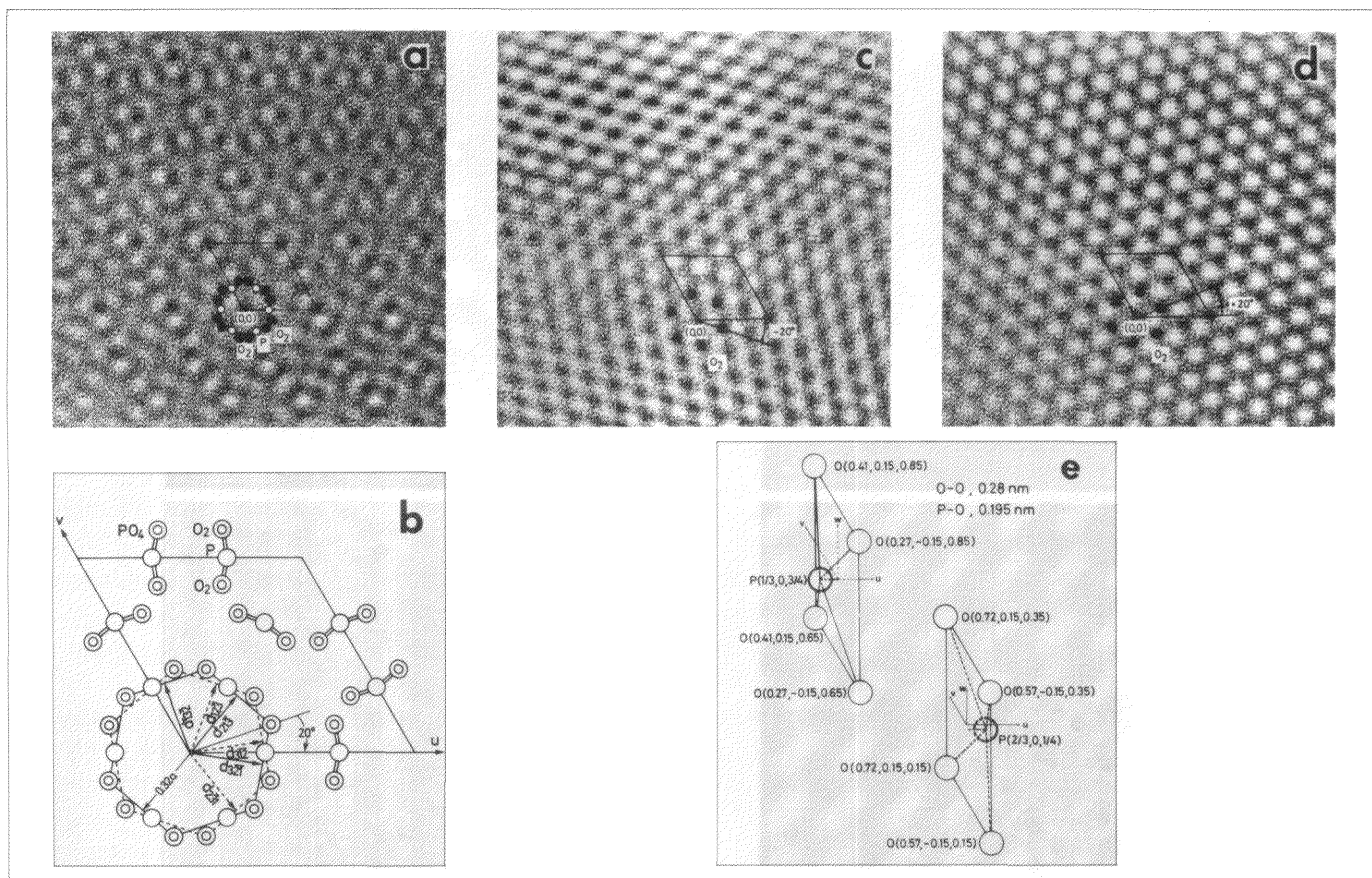


図8 PO₄分子の構造解析 (a) PO₄の格子像, (b) PO₄の単位細胞の配列, (c)と(d)はO₂分子の格子像, (e)はPO₄の構造モデル。

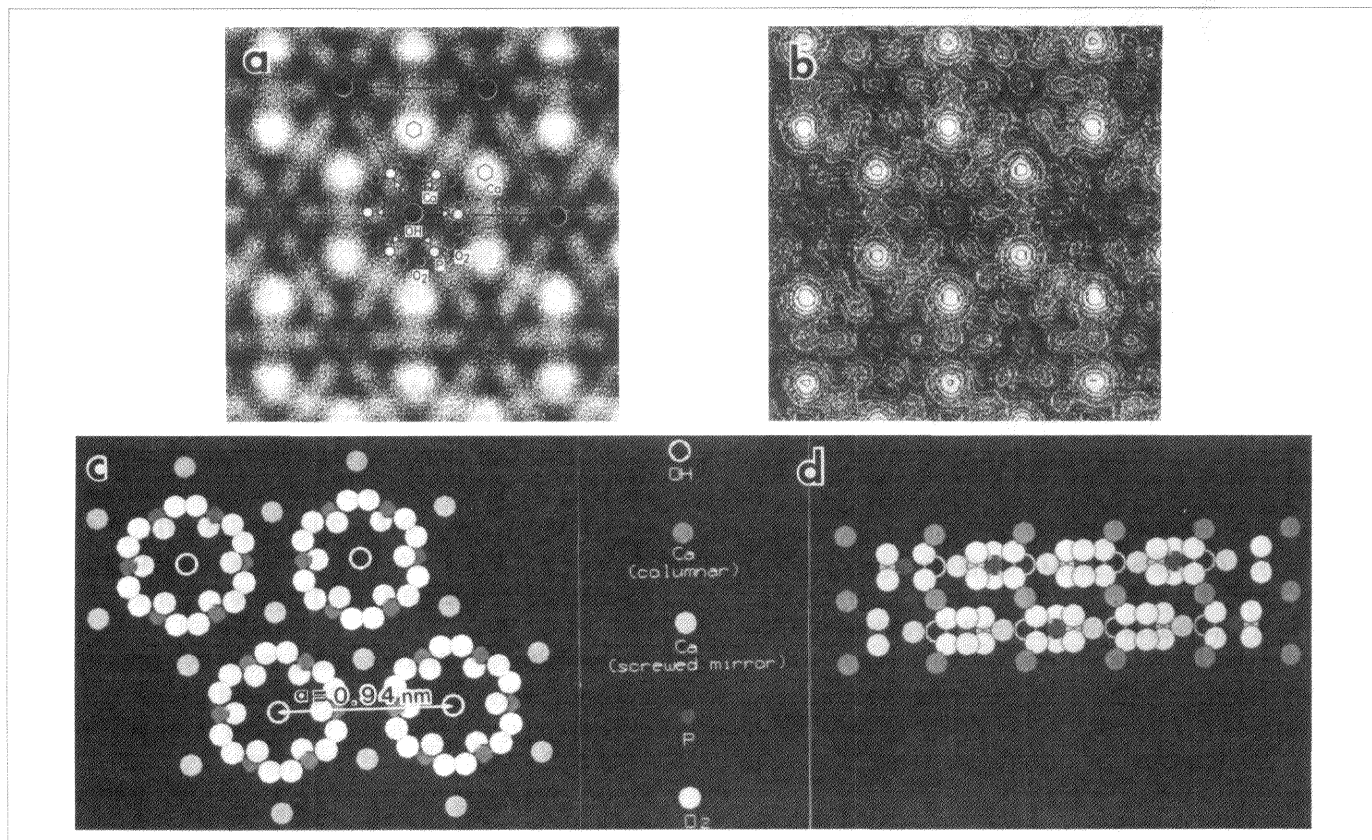


図9 人歯牙エナメル質の構造の画像処理, (a) 格子像, (b) 等濃度地図と格子像の重ね焼き, (c) 三次元的原子及び分子配列モデル。

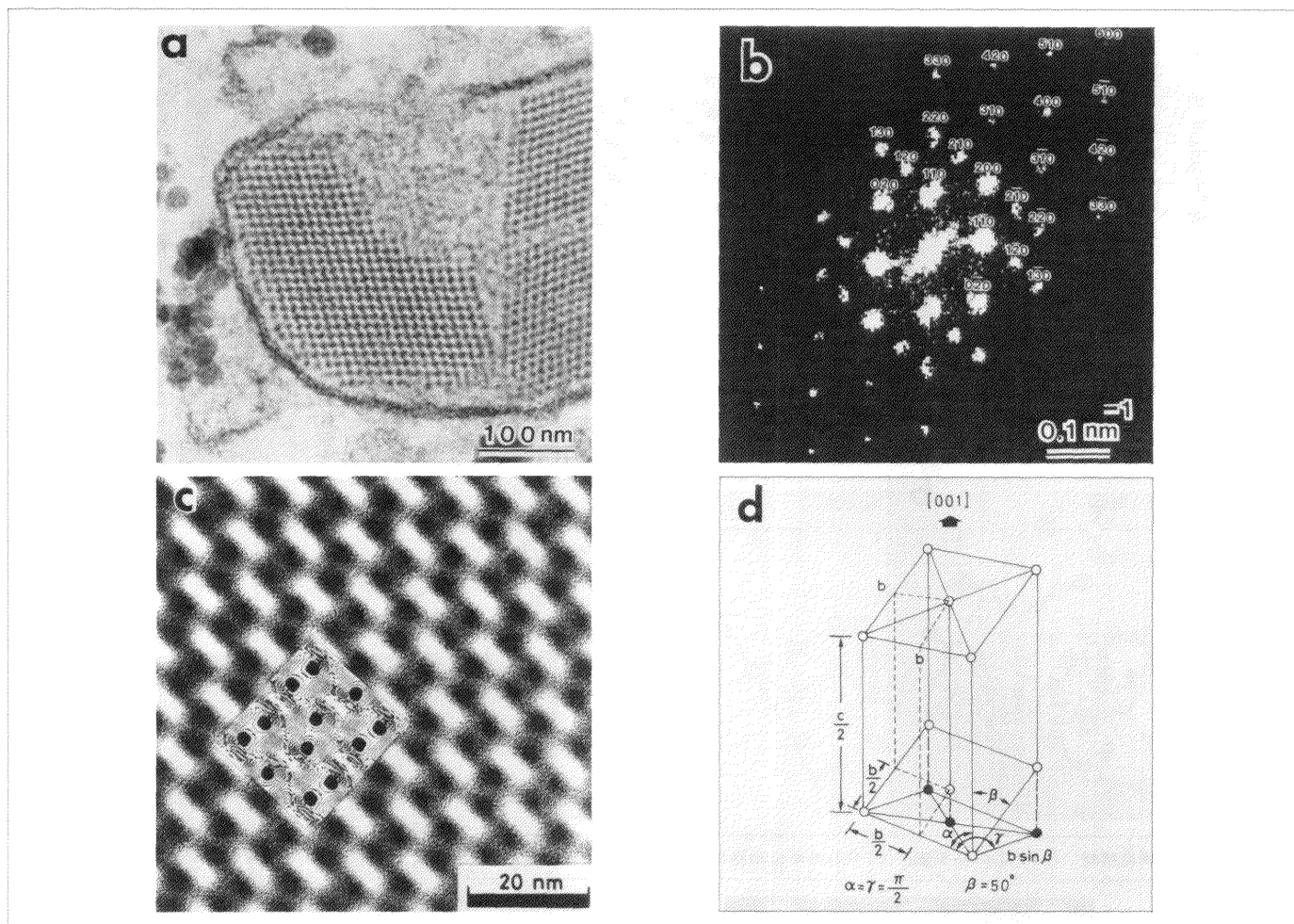


図10 人悪性腫瘍中のアクチン結晶体の構造解析 (a) TEM像, (b) 計算機回折像 (c) 再生格子像, (d) 単位細胞の構造モデル。

た¹⁹⁾。螺旋の繊維の寸法がウィールスの鞭毛と同寸法で、X線回折による結果と電顕像の光回折法による解析結果が著しく類似していることは極めて興味深い。

螺旋構造のフーリエ合成法も、本質的に酵母とエナメル質と同じであるが、螺旋の指数を n 、層を l で表わすと、協調波 $f_{n,l}(r)$ は

$$f_{n,l}(0) = F(q_{n,l}) e^{-i\alpha_{n,l}} \dots \dots \dots (16)$$

となり、中心の回折点の振幅 $F(0,0)$ との比から、

$$\left. \begin{aligned} f(n,l) &= |F(q_{n,l})|/F(0,0) \\ \alpha_{n,l} &= \tan^{-1} \{F_i(q_{n,l})/F_r(q_{n,l})\} \end{aligned} \right\} \dots \dots \dots (17)$$

が求められ、協調波は次式で与えられる。

$$f_{n,l}(r) = f(n,l) \exp[i(n\phi - 2\pi lw - \alpha_{n,l})] \dots (18)$$

c-軸方向の螺旋を考え角度を ϕ とする。

$f(n,l)$ と $\alpha_{n,l}$ を計測することによって、螺旋の格子像が求められる。

試料は2重固定で、エポンで包埋し醋酸ウラニルとクエン酸鉛染色して、ミクロトームで切片とし TEM 100kV で撮影した写真を使用した。使用電顕の対物レンズの球面収差係数は $C_s = 1.2\text{mm}$ である。

図10は [001]-方位の断面の電顕像による単位胞の構造解析結果²⁰⁾である。

(a)は原画像で(b)はその計算機回折像である。(c)は再生格子像で、(d)は解析結果得られた base-centred monoclinic unit cell のモデルである。

図11は、螺旋方向(c-)の断面の解析結果を示す。(a)はアクチン分子の原画像を示し、(b)は計算機回折像である。(c)は必要な高次の回折点から再生した螺旋構造を示すアクチン分子の計算機再生格子像で、(d)は単位胞中のサブユニットアクチン分子の配置を示す。

人腫瘍中に発見されたアクチンの結晶は base-centred monoclinic unit cell で、 $a=b=16.47\text{nm}$ $c=91\text{nm}$, $\alpha=\gamma=\pi/2$, $\beta=50^\circ$ で、アクチンのサブユニットは91nmのピッチで13個のアクチン分子が2重螺旋に巻かれ、層 l は $l=6.5m'+n$ であることが求められた。 m' は2重螺旋の異なる出発点によって規定される整数である。

4. 結 言

光走査濃度計と計算機から成るデジタル画像処理装置による電子顕微鏡写真を利用した物質構造解析法では、光回折では得られない信号の振幅と位相とを正確に処理することができる。さらに、コントラストの強調、ノイズ除去、フィルタリング等の処理を組み合わせることによって、電顕像では識別できなかった微細構造を分別することができる。

online 装置として鏡体に組込んで、構造解析高分解能電

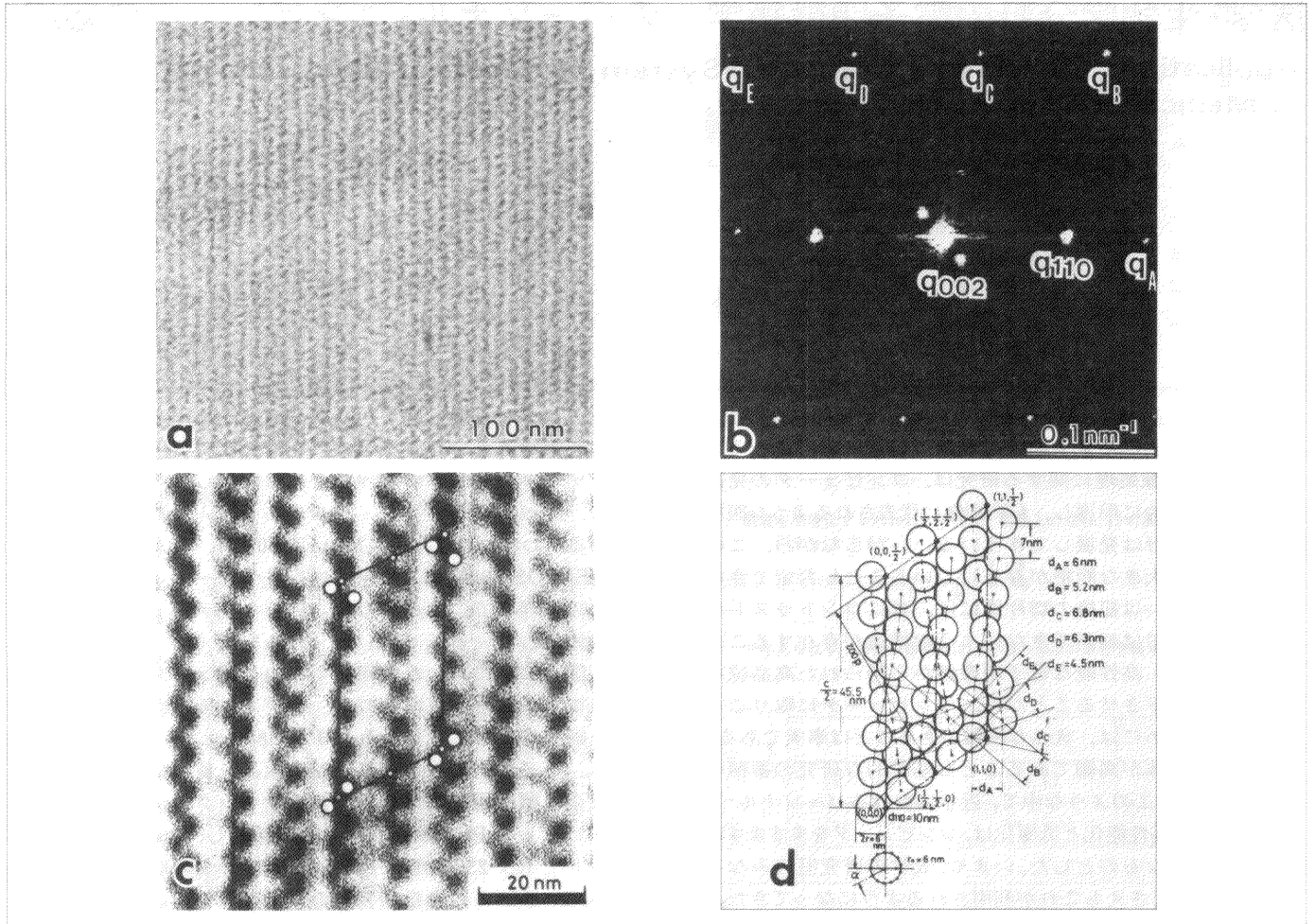


図11 二重巻き螺旋構造アクチン結晶体の構造解析 (a) 螺旋方向のTEM像, (b) 計算機回折像, (c) 二重螺旋構造を示すアクチンの格子像, (d) サブユニットモデル。

子顕微鏡に発展させることが急務である。

参考文献

- 1) F. Thon, Z. Natwf. 21, (1966)476
- 2) H. P. Erickson and A. Klug, Ber. Bunsenges. Chys. Chem. (1970)1129
- 3) W. Baumeister and W. Vogell, Electron Microscope at Molecular Dimensions, Springer, Berlin(1980)
- 4) K. Kanaya, N. Baba, M. Shino, K. Takamiya and T. Oikawa, Micron 13, (1982)205
- 5) J. W. Cooley and J. W. Tukey, Math. Comput. 19(1965) 297.
- 6) K. Suzuki, S. Takeuchi and K. Kanaya, Japan J. Appl. Phys. 21, (1982)621.
- 7) K. Kanaya, K. Takamiya, M. Shino and C. Shinohara, Micron, 14(1983)119.
- 8) K. Kanaya, N. Baba, M. Kai, E. Oho and Y. Muranaka, SEM/1981/I, SEM Inc. AMF O'Hara(Chicago), (1982) 61.
- 9) 於保英作, 馬場則男, 金谷光一, 画像電子学会報告72, 82-06-4(1983)
- 10) K. Kanaya and S. Ono, J. Phys. D. Appl. Phys. 11 (1978)/495
- 11) 金谷光一, 於保英作, 医学生物学走査電顕誌, 12(1983)
- 12) M. Osumi, N. Yanada, M. Nagano, S. Murakami, N. Baba, E. Oho and K. Kanaya SEM/1983 SEM Inc. AMF O'Hara(Chicago) (1983).
- 13) N. Baba, E. Oho and K. Kanaya, Biomedical SEM, 12(1983)14.
- 14) N. Baba, M. Naka, Y. Muranaka, S. Nakamura, I. Kino and K. Kanaya, Micron and Microscopica Acta, 16 (1985) (in press)
- 15) B. K. Vainshtein, V. M. Fridkin and V. L. Indenbom, Modern Crystallography, II Structure of Crystals, Springer-Verlag, Berlin, (1982)
- 16) K. Kanaya, N. Baba and K. Takamiya, Micron, 12 (1981) 353.
- 17) K. Kanaya, N. Baba, C. Shinohara and Y. Ichijo, Micron and Microscopica Acta, 15 (1984)17
- 18) K. Kanaya, N. Baba, C. Shinohara, and M. Osumi, Micron and Microscopica Acta, 14(1983)233.
- 19) M. Mukai, C. Torikata, H. Iri, K. Kageyama, T. Nakajima, N. Ueno, S. Hirose and K. Murakami, An. J. Sarg. Pathl. 7 (1983) 679.
- 20) K. Kanaya, N. Baba, Y. Kitagawa and M. Mukai, Micron and Microscopica Acta, 16(1985) (in press).

医学・生物学分野の電子顕微鏡学へのパーソナル・コンピュータの応用

Applications of Personal Computer System for Electron Microscopy in Medical and Biological Fields.

堀田 康明* 石橋 克範* 渡 仲三*

(昭和59年10月19日受理)

1. はじめに

細胞や組織の電子顕微鏡像から得られた情報を、客観的なデータとして把握する方法の確立は、これまで主観的であった形態の変化に関する認識をより科学的に行なう上で不可欠である。歴史的には、金属学などの分野において始められた形態計測は、Weibelらによって、積極的に医学・生物学の領域における電子顕微鏡画像の定量に応用されてきた¹⁾。一方、画像処理に関する研究は、コンピュータの発達に伴って飛躍的に前進し、CT画像に代表されるような医用画像処理の分野は発展してきている。しかしながら、この両者の間には大きな断絶が存在していることも否定できない。細胞あるいは組織の切片像には、単にコントラストの相違からだけでは判断できないような構造が存在することは事実であり、高性能な電子顕微鏡から得られた高品位な画像の質を低下させることなく、コンピュータに取りこんで処理するためには、大きな困難があることは事実である。更に、装置自体が高価であることも基礎的な研究の蓄積への道を阻んだ。このような中で、近年におけるパーソナル・コンピュータの高性能化と低廉化は、コンピュータをますますわれわれの身近なものとした。いまや、大学の研究室のみならず家庭においてさえもこれが利用されるようになってきた。われわれは、数年前から電子顕微鏡画像定量装置の製作に取りかかり、グラフィック・ディジタイザを利用した半自動装置に始まり²⁾、最近ではビデオ・ディジタイザを用いた自動装置の試作を行ってきている³⁾。本稿では、主としてわれわれが試作した簡単な自動画像定量装置の紹介とともに、日常的な電子顕微鏡学の研究分野でのパーソナル・コンピュータの活用法とその問題点について述べたいと思う。この報告は、コンピュータの専門家が御覧になると幼稚なものであるという評価をいただくかもしれないが、これからパーソナル・コンピュータを研究室へ導入して研究を進めようとしておられる医学・生物学の分野の研究者諸兄の参考にしていただければ幸いである。

2. われわれの装置の概要とパーソナル・コンピュータの導入法

現在市販されているパーソナル・コンピュータは、CPUに8ビットのマイクロ・プロセッサを使用しているか、16ビットのそれを使用しているかによって大きく2つに分類される。最近では、16ビットのCPUを搭載したパーソナル・コンピュータが主流になりつつあり、更に上位の32ビット機も使われ始めている。われわれの研究室では、現在、日本電気製のPC-8800シリーズ(8ビット機)とPC-9800シリーズ(16ビット機)を使用している。両者を比較すれば、

後者のほうが実行速度が速く、メモリー空間も広いので、特に画像処理を目的とする場合は有利である。画像処理などの研究を独自のプログラムを開発して行なう場合は、機械語や、附属しているBASICなどの高級言語だけでプログラミングが可能であるが、同一のパーソナル・コンピュータを英文あるいは日本語のワード・プロセッサとして、またデータ・ベースの管理などにも利用しようとする場合には、オペレーティング・システムを購入したほうが便利である。われわれは、CP/M80(Z-80用)、CP/M86(8086用)、MS-DOS(8086用)と呼ばれるオペレーティング・システムの管理下で、いろいろなユーティリティー・プログラムを使用している。

図1に、われわれの研究室のコンピュータのシステムの概要を示した。現段階では、ビデオ・ディジタイザを用いた画像処理は、8ビットのPC-8800システムで行なっている。ビデオ・ディジタイザは市販品を使用し、プログラムは全て機械語で開発した。グラフィック・ディジタイザは、16ビットのPC-9800システムに接続し、1200ボアのボーレートでRS-232Cポートを介してデータの取りこみを行なっている。この半自動装置の概要については別稿⁴⁾を御覧いただきたい。点線で囲んだ部分は、現在実験中の走査型電子顕微鏡画像自動取りこみ装置であり機会があれば後日報告したい。

3. ビデオ・ディジタイザ入力方式の画像定量装置の実際

(1) 画像の取りこみ

CCTVカメラからの映像信号は、A-D変換され256ビット×256ビットのイメージ・メモリに、16段階の濃度レベル

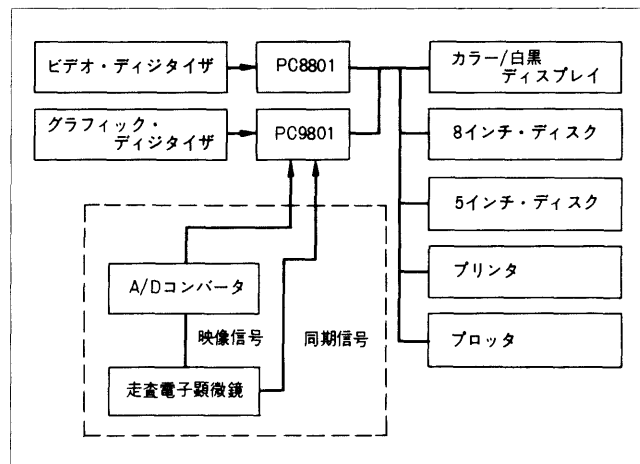


図1 われわれの研究室のパーソナル・コンピュータ・システムの構成(点線で囲んだ部分の説明は本稿には含まれていない)。

*名古屋大学医学部第1解剖学教室

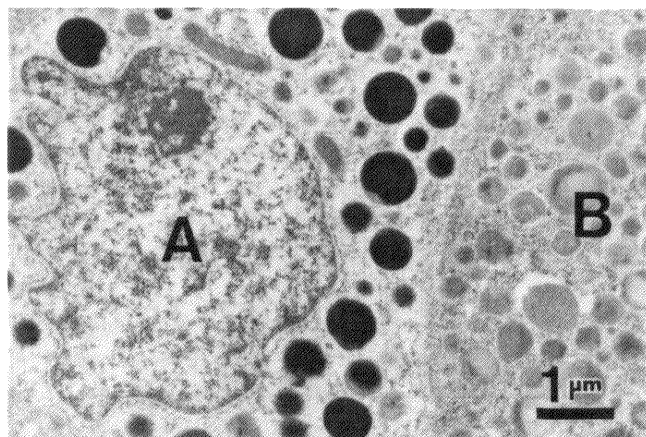


図2 日立H-500型透過電子顕微鏡で撮影したヘビ膵臓ランゲルハンス島のオリジナル写真。プロテインA-コロイダル金法によってグルカゴンを標識しているため、A-細胞(A)の分泌顆粒上に金コロイド粒子が観察できる。B：B-細胞。

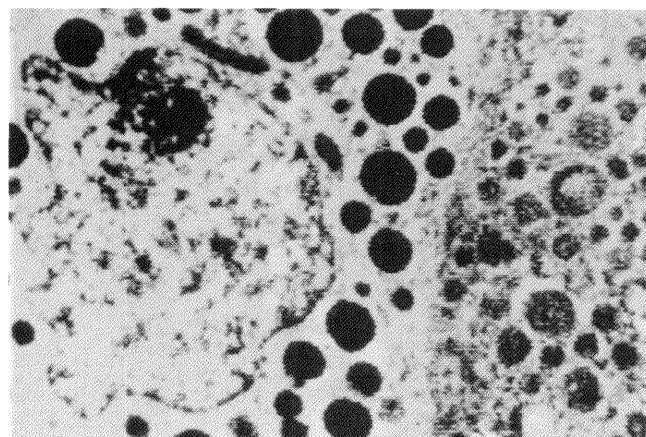


図3 図2のオリジナル写真をビデオ・デジタイザに取りこんだ画像。

で約1/60秒で取りこまれる。取りこまれた画像データをそのまま処理するか、あるいはコンピュータのグラフィック・メモリへ転送したのち適当な処理が行なわれる。われわれは、画像のトリミングと計測は、画像データをコンピュータに転送したのち行なっている。もちろん画像の擬似カラー化は、コンピュータ内のグラフィック・メモリ上で行なう。図2は、日立H-500型透過型電子顕微鏡で撮影したヘビの膵臓のオリジナル写真、図3はビデオ・メモリに取りこんだ画像である。

(2) スムージング処理

必要に応じて、取りこんだ画像のスムージング(平滑化)を行なう。スムージングは、画像のノイズを除去する操作であり、ある点を中心とした正方形視野内の画像の濃度の平均値を計算によって求め、その値をその点の濃度とする方法をわれわれは採用している。図4は、平滑化の操作をする領域を3×3にした場合の計算の方法を示したものである。図5は図3の原画像に対してスムージング処理を行なった画像である。

(3) メディアン・フィルタ処理

メディアン・フィルタは、上記と同様に、ある点のまわりの8点のメディアン(中央値)を求め、その値をその点の濃度とする方法である。

(4) その他のフィルタ

上記の様な雑音を除去するフィルタの他に、画像を尖鋭化するために用いられるフィルタが場合によっては必要になる。この目的のためには、微分フィルタやラプラシアン・フィルタがあるが、われわれは日常の作業にこれらのフィルタを用いてはいない。

なお、以上の様なフィルタを使用した場合には、原画像が修正されることを念頭において、定量結果への影響を常に考えておかなければならない。したがって、同一の定量作業においては、フィルタ処理を同一の種類、回数に統一すべきである。われわれは、原画像に対して行ったフィルタ処理の内容について、定量データに付記することが望ましいと考えている。

画像を平滑化するわれわれの方法：画像上の点(x, y)の濃度の平均値をF(x, y)とすると、

$$F(x, y) = \frac{1}{36} \begin{vmatrix} 1 & 4 & 1 \\ 4 & 16 & 4 \\ 1 & 4 & 1 \end{vmatrix}$$

で与えられる、行列の各要素は、3×3の各点の濃度を表す。

	x		
y	←	→	→
	(x-1, y-1)	(x, y-1)	(x+1, y-1)
	(x-1, y)	(x, y)	(x+1, y)
	(x-1, y+1)	(x, y+1)	(x+1, y+1)

図4

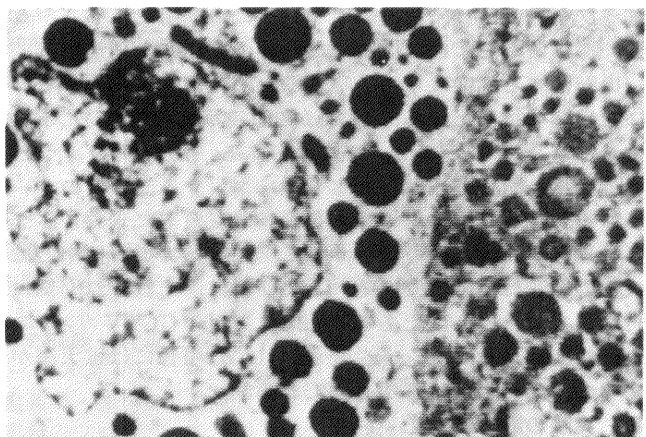


図5 図3の原画像に対してスムージング処理を行なった画像。

(5) 輝度の変換から2値化処理

取りこんだ画像の状態によって適当なフィルタ処理を行なったのち、計測しようとする対象の構造物だけを残して2値化する。図6は図3の原画像に対してスムージング・フィルタとメディアン・フィルタで1回ずつ処理したのち、計測しようとする分泌顆粒だけを残して2値化した画像である。ここまでの操作で、計測する必要のない構造物が残っている場合には、次に示すような画像のトリミングを行なう。

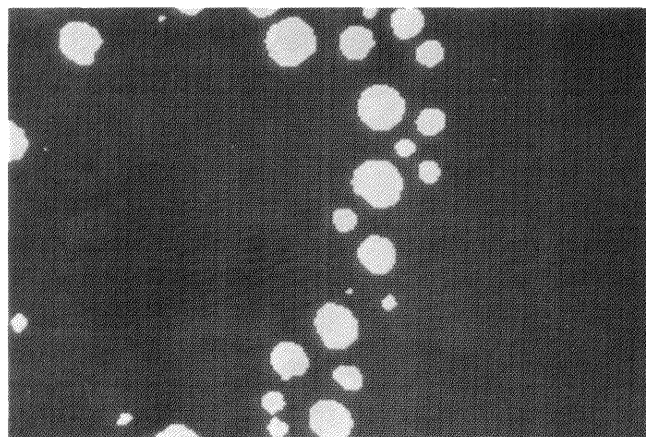


図6 図3の原画像に対してスムージング処理とメディアン・フィルタ処理を1回ずつ行なってから、計測しようとする分泌顆粒だけを残して2値化した画像。

(6) 画像のトリミング

フィルタ処理や、2値化によっても計測しようとする対象の構造物以外のものが画像の中に含まれている場合や、計測しようとする範囲を限定したい時は、画像のトリミングを行なう。このトリミングの操作は、キーボード上のテン・キーあるいはジョイスティックによって画面上のカーソルを自由に動かすことによって行なわれる。

(7) 計測の実行

単純な計測としてわれわれは、面積計算と周長計算プログラムを用意している。この2つのパラメータからは形状の真円からの変形の度合を表す形状係数も計算によって得られる。面積および周長の計算は、個々の構造物に対して独立して行なわれるので、計測終了後にヒストグラムのグラフを書いたり、個数のカウントにも利用できる。

(8) 撮影倍率および画像取りこみ時の拡大率の補正

撮影倍率と画像取りこみ時の拡大率の補正は、通常次の様な手順で行なわれる。(1)電子顕微鏡写真の撮影時に市販のカーボン・グレーティングを撮影する。(2)計測しようとする写真と同じ引伸ばし倍率でプリントする。(3)このカーボン・グレーティングの写真を画像処理装置に入力し、グレーティングの間隔を計測することによって撮影倍率と拡大率の補正は同時にできる。この作業は、それぞれ別個に行なってもよいわけである。画像入力用のCCTVカメラの位置を変えたり、ピントを変えたりした場合には拡大率が変わるのでその都度補正が必要である。

4. 実際の計測例

図2と同じヘビ(アオダイショウ)の膵臓ランゲルハンス島のA細胞の分泌顆粒を、プロテインA-コロイダル金法によって標識しておき、標識された約1000個の顆粒のサイズを計測した結果を、ヒストグラムで表したのが図7である。実線は計測したままのデータをプロットしたものであり、点線はSaltykovの方法⁶⁾を用いて定量的な補正したものである。

5. 画像定量の自動化における問題点と今後の課題

Weibelらによって考案され体系化されたポイント・カウンティング法を用いた画像定量の手法は、細胞あるいは組

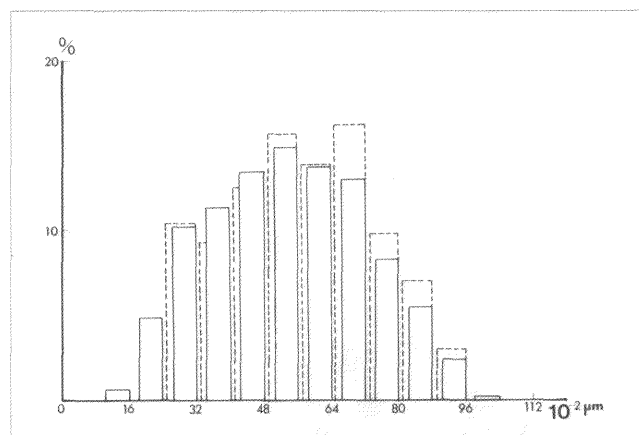


図7 ヘビ(アオダイショウ)の膵臓ランゲルハンス島の分泌顆粒(1000個)のサイズ(直径)を計測した結果のヒストグラム。実線は計測したままのデータ、点線は定量的な補正をしたデータをヒストグラムにしたものの。

織の切片像が非常に複雑で、画像をコンピュータに入力する段階での像質あるいは分解能の低下によって、個々の小器官などの認識が、自動的には不可能な場合には、非常に有効な手段である。また、微細な膜構造は、切片としてやや斜め方向あるいは切線方向に切られると連続した線画にはならない。このような構造物をコンピュータに認識させるためには、非常な困難が必要である。したがって、われわれが用いているような、分解能が 256×256 程度の装置では、自動処理の不可能なところは、対話処理によって作業を進める必要がある。自動計測のできる構造は、分泌顆粒、グリコーゲン粒子、核などに限定され、小胞体やミトコンドリアなど膜構造については、今後の検討を待つことになる。現在われわれは、これらを解決する手段として3つの方法を検討している。第1は、ビデオ・ディジタイザの分解能を、 512×512 とし、濃度レベルも16段階以上に上げ、空間フィルタの種類を豊富にすると同時に、コンピュータに一定の思考能力を与えること、第2に走査型電子顕微鏡の映像信号を直接コンピュータに取りこむことによって原画像の分解能を向上させること、第3に電子顕微鏡試料作成の方法を再検討し、特定の構造、例えばミトコンドリア、小胞体などのコントラストを増強させる方法を定量化しようとする細胞あるいは組織に利用することである。

医学・生物学の分野における電子顕微鏡画像処理の応用は、定量の他にも、連続切片法を用いた3次元再構築、ステレオ写真からの立体像の作成、フーリエ変換の分野への応用などが考えられる。パーソナル・コンピュータの限られたメモリ空間と処理速度の中で、これらの処理を有効に実行してゆくためには多くの解決すべき問題があるが、各方面での努力が期待される。

6. まとめ

以上、電子顕微鏡画像の自動定量を中心として医学・生物学の分野でのパーソナル・コンピュータの利用法について述べてきた。電子顕微鏡画像の定量を普遍的なものとし、臨床診断などの分野へ活用してゆくためには、電子顕微鏡試料作成の段階をも自動化し、試料作成の方法が画一化されなければならない。これまでも、固定、脱水、包埋に

伴う組織の収縮などに関する研究報告は多く出されているが、これらを体系化すると同時に、使いやすい自動処理装置の開発も必要であろう。われわれの研究室でも、電子顕微鏡の試料作成時における実験スケジュールの管理や、簡単な包埋用ラベルの作成などにもパーソナル・コンピュータを利用している。これらを、装置などのハード・ウェアとリンクさせて、一貫した電子顕微鏡学研究のコンピュータ化が可能となるのもそんなに遠くはないものと信じている。

参考文献

- 1) Weibel, E.R.: Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. Int. Rev. Cytol., 26, 235 (1969).
- 2) Hotta, Y., et al.: An application of the improved semi-automatic quantitative image evaluation system (2). - Three-dimensional reconstruction of cell structure and quantitative analysis of cell elements -. J. Electron Microsc., 30, 237 (1981).
- 3) Hotta, Y., et al.: A new automatic image analysing system for electron micrographic images in the fields of medical biology. J. Electron Microsc., 33, (in press).
- 4) 堀田康明ら：医学・生物学におけるパーソナル・コンピュータの応用，「電子顕微鏡画像定量装置の製作法」，細胞 16(9)，～ (1984)。
- 5) Williams, M.A.: Quantitative methods in biology. In: Practical Methods in Electron Microscopy, Vol. 6, Ed. by A.M. Glauert, North-Holland, Amsterdam (1977).
- 6) Saltykov, S.A.: Stereometric Metallography, 2nd ed. (1958).
- 7) 栗山浩一ら：PC-Techknow 8800, Vol. 1., K.K. アスキー (1982)。
- 8) 川村 清：PC-8801 N88-basic 解析マニュアル，秀和システムトレーディング K.K.

Topics

F-3000形 日立分光蛍光光度計



普及形クラスの分光蛍光光度計ですが、従来の650-40/60形以上の基本性能を有し、また高級機並みのデータ処理機能が備わっています。また、ソフトキー付 CRT により操作法が一目でわかり、機能が豊富であるにもかかわらず、操作が簡単です。

■ 特 長

(1) 高感度，低迷光

高分散のメカニカルルーリング無収差凹面回折格子の採用により、従来の650-40/60形以上に高感度・低迷光です。

(2) 豊富なデータ処理機能

高精度のスペクトル補正、微分スペクトル、CAT、データファイル、スペクトル間の四則演算、クロマトピーク積分等、高級機並みのデータ処理機能を有しています。

(3) 簡単な操作

CRT 上に操作法が表示され、また

CRT にソフトキーが付属されているため、一目で操作法がわかります。機能の多い装置にあり勝ちな煩雑な操作は不要です。

(4) データの CRT 表示及びプロッタへの出力

スペクトルを CRT に表示して、二次処理等を行なうことが可能です。またプロッタに測定条件とともにスペクトル記録できます。

■ 主な仕様

(1) 感度

バンド幅 (E_x , E_m) 5nm, 時定数 0.5 秒において水のラマン光を S/N 35 以上で測定可。

(2) 最少試料量

0.6ml

(3) データ処理

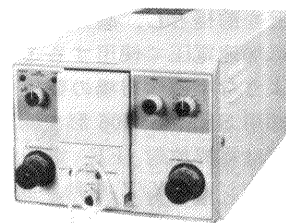
スペクトル補正、1 次～4 次微分、平滑化処理、CAT、各種定量演算、データファイル及びファイル間の演算、クロマトピーク積分

(4) その他のコンピュータ機能

ピーク自動検知、リビートスキャン、CRT 上への操作法・測定条件・スペクトルの表示、CRT 上の情報のプロッタへのハードコピー他

F-1100形日立液クロ 用蛍光光度計

従来の F-1000 形液クロ用蛍光光度計は、アミノ酸、糖、グアニジン、カテコールアミン等の分析において好評を得てきましたが、この度、類似の仕



様で長寿命を特長とするメタルハライドランプを採用した F-1100 分光蛍光光度計を開発致しました。採用したランプは、ヨウ化タantalメタルハライドランプで、波長域と波長特性の平坦さの点ではキセノンランプに若干劣りますが、ランプ寿命の点とランプの安定性の点では、1 桁近く優れています。ランプ寿命の長い点から、通電時間の長いルーチン分析に適します。またランプの安定性が良い点から、バックグラウンドが高く、電気的に差し引いて測定するような場合にも適しています。

■ 主な仕様

(1) 光源

60W ヨウ化タantalメタルハライドランプ

(2) 分光器

無収差凹面回折格子 6001/mm 使用

(3) 波長域

励起側 220～450nm

蛍光側 220～730nm

(4) バンド幅

15nm

(5) ランプ寿命

1000時間以上

(6) フローセル容量

12 μ l, 2 μ l, 40 μ l から選択

解 説

半導体プロセス評価用S-806形日立走査電子顕微鏡

HITACHI Model S-806 Scanning Electron Microscope as Semi-Conductor Process Evaluator

中泉 泰* 神田公生* 渡部忠雄* 山田満彦*

(昭和59年11月7日受理)

1. はじめに

半導体素子の超微細加工技術は著しく進歩し、その線幅は $2\mu\text{m}$ の時代に入り、開発段階では $1\mu\text{m}$ を切ろうとしている。製造工程では $2\mu\text{m}$ 以下の線幅で、かつ三次元化する超LSIの高精度な評価が必要となる。しかし、従来の光技術を用いた評価法では分解能的に限界となってきた。この限界を超えるために、光学顕微鏡に比べ分解能が高く、焦点深度が深い走査電子顕微鏡(SEM)による評価法がクローズアップされてきた。半導体プロセス評価用のSEMとしては、ラインからウェーハを取り出し評価後ラインへ戻すことを前提とし、高分解能で、しかも試料ダメージの少ない低加速電圧で使用することが要求される。

このような半導体市場の要望に応えるため、半導体プロセス評価用SEM S-806形を開発した。

本装置は電界放射(FE)電子銃とコンピュータ制御大形試料ステージ(X/Y/Z移動、回転、傾斜)の採用により、低加速電圧での6インチ(150mm)径ウェーハの全面高分解能像の迅速観察ができる特長を持っている。

2. 構 成

本装置の外観を図1に示す。本装置は左側の本体部と右側のディスプレイ部から構成されている。

本体部の外観を図2に、概略断面を図3に示す。本体部

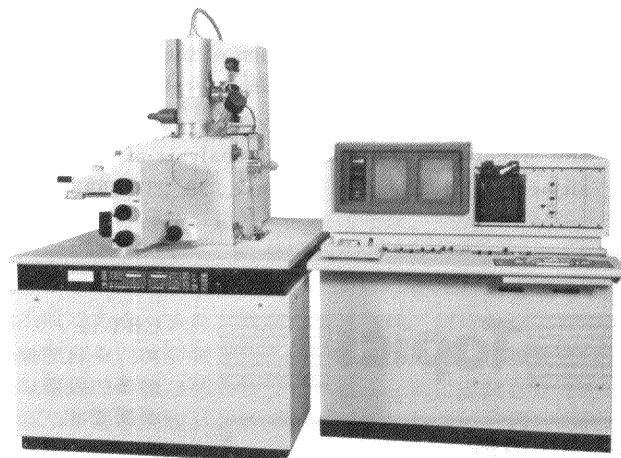


図1 S-806形日立走査電子顕微鏡

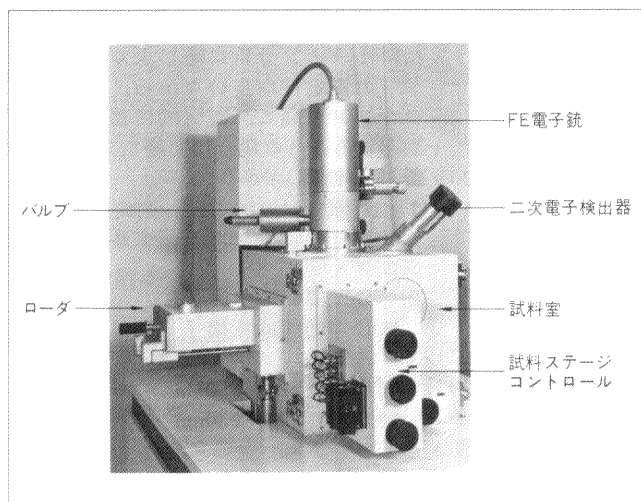


図2 本体部

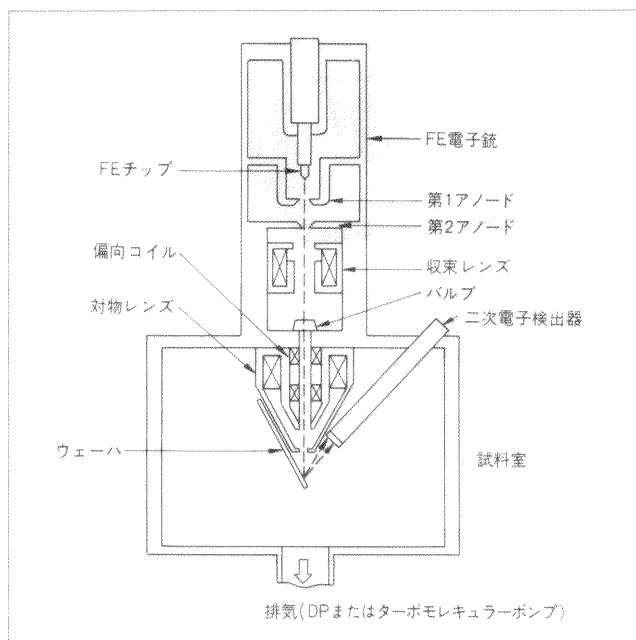


図3 本体概略断面図

は電界放射(FE)電子銃、収束レンズ、対物レンズ、偏向コイル、二次電子検出器、大型試料ステージ、ローダー、排気系等から構成されている。本体は耐震性向上のために空気バネを用いた除振台に搭載されている。

ディスプレイ部は、ウェーハの拡大像を表示するCRT、

* 日立製作所 那阿工場

拡大像を撮影するためのカメラ及び操作パネルから成っている。

3. 特 長

プロセス評価用 SEM に要求される条件と装置の対応について表 1 に示す。装置の主な対応 (特長) について以下述べる。

3.1 FE 電子銃による低加速電圧高分解能

本装置の二次電子像分解能は加速電圧1kV で、20nm を保証している。

従来から SEM は、半導体素子の断面観察や製造工程での品質管理面で広く用いられてきた。これらは使用加速電圧が10kV～20kV と比較的高く、像分解能は2nm～6nm と優れている。しかしエッジ効果が大きく、入射電子の試料への浸入深さが深いので、表面の微細構造が観察できなかったり、表面処理 (金属蒸着) なしでは試料の帯電現象が起こり、さらに試料損傷が増加し、製造工程中のウェーハを直接観察するには問題があった。

これらの問題を軽減する方法として、加速電圧を低くする (2kV 以下) ことはよく知られている。しかし、熱電子銃 (LaB₆/タングステンフィラメント電子銃) では輝度の低下、色収差の増加のために十分な分解能が得られなかった。図 4 に各電子銃の加速電圧と分解能の関係を示す。本装置では電界放射電子銃を採用し、低加速電圧で高分解能を得ている。

電界放射電子銃 (FE 電子銃) の構成を図 5 に示す。電子銃は陰極と第一陽極及び第二陽極で構成されている。陰極は単結晶タングステン線の先端を鋭く研磨したものをを用いている。陰極と第一陽極間に引き出し電圧 (V_i) を印加し、陰極先端に形成されている強電界 (5V/nm) により陰極表面より電子を放出させる。放出された電子は加速電圧 (V₀) で加速される。

FE 電子銃は、一般に多く用いられる六硼化ランタン (LaB₆) やタングステンフィラメントを陰極とした熱電子銃と比べ表 2 に示す如く、輝度・寿命は100～1,000倍以上良

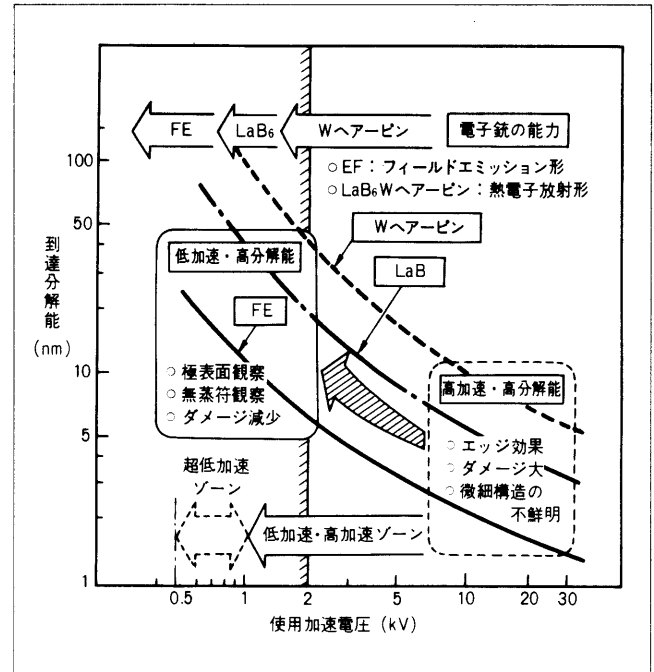


図4 各電子銃の加速電圧と分解能

く、電子源の大きさは1/1,000と小さいことから、電子線を細く収束して超高分解能像を得る SEM の電子銃として最適であると言える。また、電子源の輝度が高いことは、明るく、S/N の良い SEM 像を短時間に観察できることを意味し、また、長寿命であることは装置の性能が長時間安定していること、また保守頻度が少なくてすむことになる。さらにこの電子銃は、放射された電子のエネルギー幅 (ΔV) が0.2eV と小さく、他の電子銃より約10倍エネルギーのそろった電子線が得られることになる。

低加速電圧での SEM の分解能は、色収差 (電子のエネルギーのバラツキ (ΔV) によるボケ) により決定され、色

表1 プロセス評価用 SEM への要求とソフト技術および装置の対応

	半導体デバイス評価ニーズ	装置の対応	評価ソフト技術
性能・機能	●非破壊観察(6"~8"サイズ) ●未処理観察(無蒸着) ●Low コンタミネーション・Low ダメージ ●最表面高分解能観察(数百倍~50k倍) ●計測評価(パターン幅測長) ●膜・層構造の元素分析	●高輝度低加速電圧電子銃(FE 電子銃) ●大形試料ステージ(X, Y, Z移動, 回転, ユーセントリック傾斜, ~60°) ●ドライ N₂ ガスリーク方式 ●静止面観察および画像メモリー機構 (測長システム) ●UTW, EDX 検出器	●最適加速電圧(各種構造材料) ●低加速電圧(0.5~5kV)・プロセス評価用 ●高加速電圧(5k~25kV)・断面形状観察, 他 ●最適試料傾斜 ●チャージアップ現象の軽減 ●立体観察(加工表面・測面情報) ●低加速電圧・高電流感度 X 線元素分析法
操作性・メンテナンス	●自動化 (ローディング, ステージコントロール, 他) ●高スループット (ローディング, 真空排気, 試料移動) ●メンテナンスフリー (電子光学系の低汚染構造, 長寿命電子源, 高真空)	●ステージのCPU制御 (X, Y 座標指示, プログラミング) ●高速ドライ排気システム (ターボモレキュラーポンプ, ドライ N₂ ガスパージ) ●低汚染構造, 電子光学系 ●FE 電子銃の採用(長寿命)	●試料前処理 ●断面観察用表面エッチング, 蒸着 ●断面作成技術 ●試料保管・取扱い ●ドライ N₂ ガスパージ保管 ●クリーンベンチ
設置環境	●低発塵 ●省スペース ●耐磁場・耐震・耐音波構造	●低発塵ローダ ●磁気シールド構造	

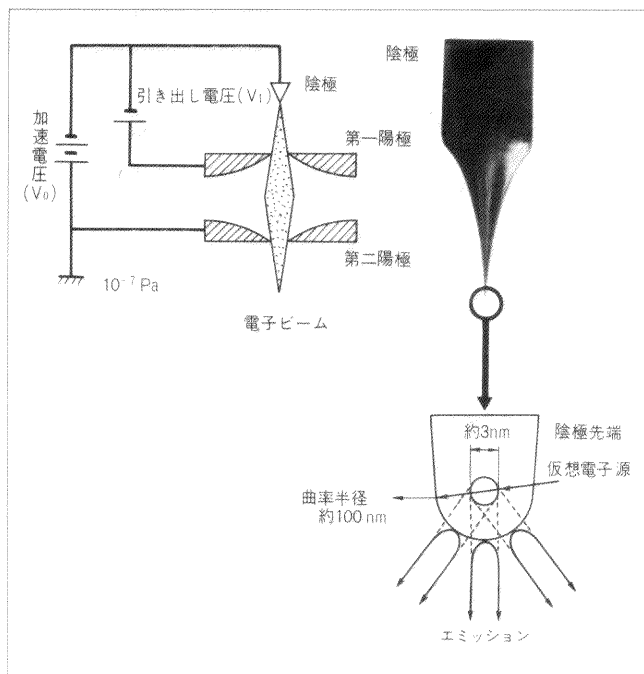


図5 電界放射電子銃の構成

収差によるプローブ径 D_c は、

$$D_c \sim \frac{\Delta V}{V_0} C_c \alpha$$

で表わされる。プローブ径がほぼ分解能である。ここで

表2 各種電子源の比較

性能 \ 電子源	FE	LaB ₆	タングステン フィラメント
輝度 (A/cm ² ·sr)	10 ⁹	10 ⁷	10 ⁶
電子源径 (nm)	< 10	10 ⁴	10 ⁴
エネルギー幅 (eV)	~0.2	~2	~2
寿命 (h)	> 1,000	1,000	40
真空度 (Pa)	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻³

V_0 : 加速電圧

C_c : 対物レンズの色収差係数

α : 試料からみたビームの開き角

である。 V_0 , C_c , α を同一として FE 電子銃と熱電子銃を比較すると、 ΔV は FE 電子銃で ~0.2eV, 熱電子で ~2eV である。したがって、分解能は FE 電子銃を用いた SEM の方が約10倍良い。この違いを模式的に図6に示す。一般的に $V_0 = 1\text{kV}$ での FE 電子銃での分解能は 10nm~20nm で、熱電子の場合は 50nm~100nm である。

3.2 6インチウェーハ全面観察の大形試料ステージ

試料ステージは6インチ(150mm)径ウェーハが全面観察できるユーセントリック大形ステージで、ウェーハを傾斜したときの像の移動が少ない構造になっている。また試料移動(X/Y/Z移動、傾斜、回転)はコンピュータ制御され、マニュアルリモートコントロール移動だけでなく、プログラムによる移動も可能である。1つのプログラムは16ステップまで可能で、最大70個のプログラムが設定できる。

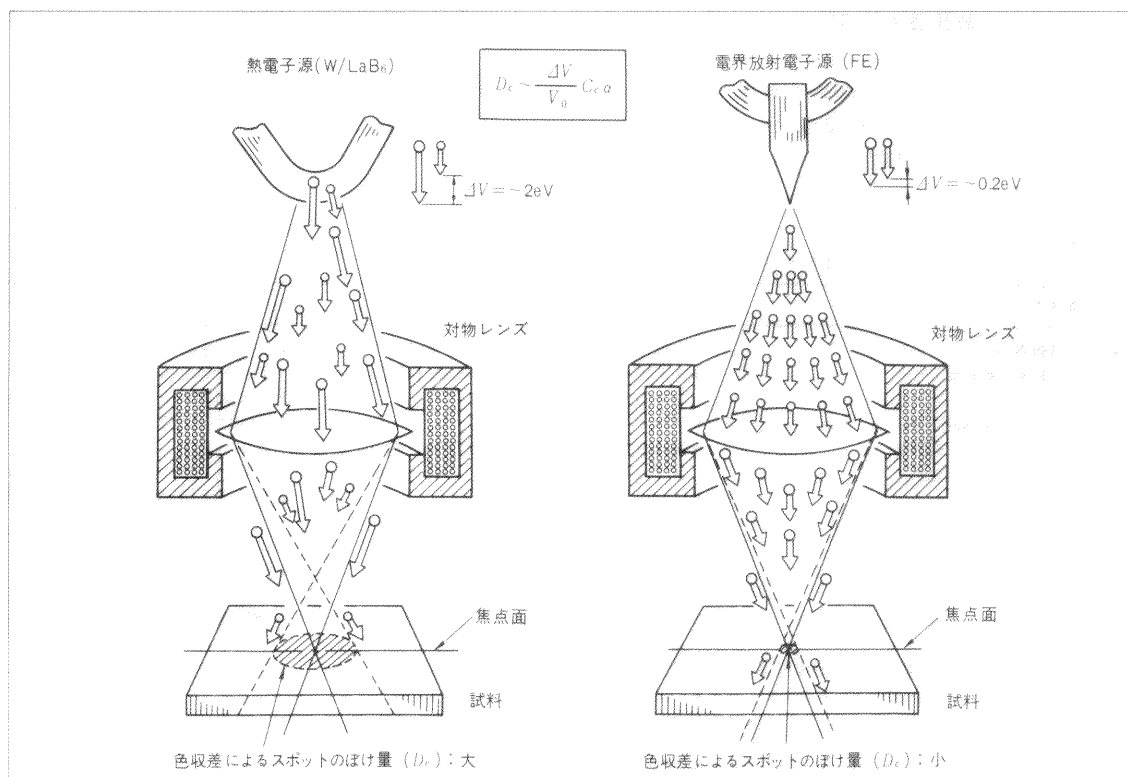


図6 電子銃の違いと色収差によるスポットのぼけ量

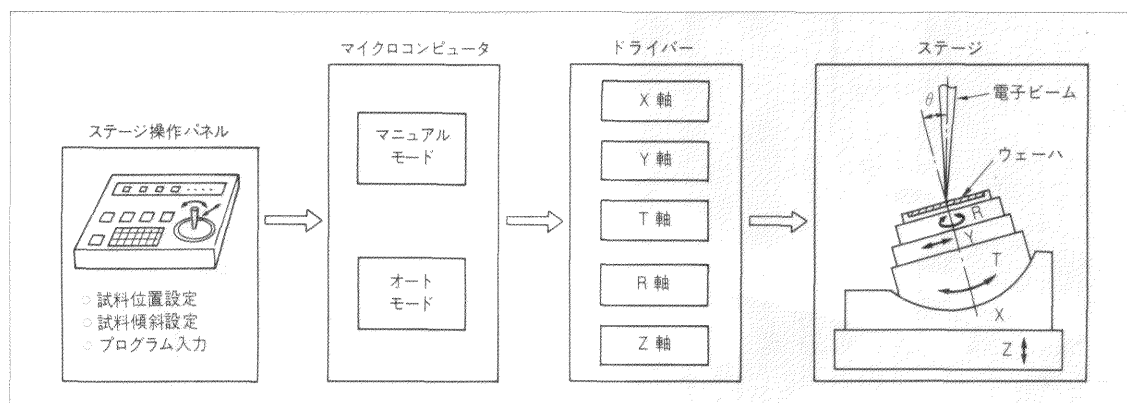


図7 試料ステージ制御のブロック図

試料ステージ制御のブロック図を図7に示す。ステージ移動はマニュアルリモートコントロールモードとオートコントロールモードがある。マニュアルモードでは5軸手動リモートコントロールで移動でき、オートモードでは5軸共コマンド駆動・プログラム駆動ができる。さらに、オートモードでは単なる移動距離指定駆動だけでなく、ピッチ

表3 ステージ制御の主な仕様

コンピュータ制御バルスマータ駆動(X, Y, Z, T, R 軸)		
駆動方式	マニュアルモード	マニュアル駆動
	オートモード	コマンド駆動 プログラム駆動 16ステップ/プログラム(最大) 70プログラム(最大) メモリ位置駆動 10点(最大)
ステージ送り速度(最大)		X, Y : 4mm/sec Z : 1mm/sec T : 2°/sec R : 12.5°/sec

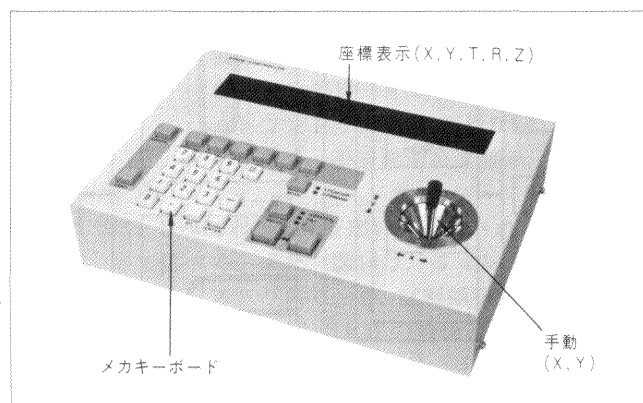


図8 ステージの操作パネル

指定駆動ができる。図8にステージの操作パネルの写真を、また、ステージの主な仕様を表3に示す。

対物レンズはコニカル形レンズで、6インチ径ウェーハをワーキングディスタンス(Z)35mmで60°傾斜でき、X/Y方向とも150mm移動できる。従来の一般的なSEMの対物レンズと比較したコニカル形レンズを図9に示す。

3.3 6インチウェーハ用大型ローダー

図10に示すようにローダー部は最大6インチ(150mm)径

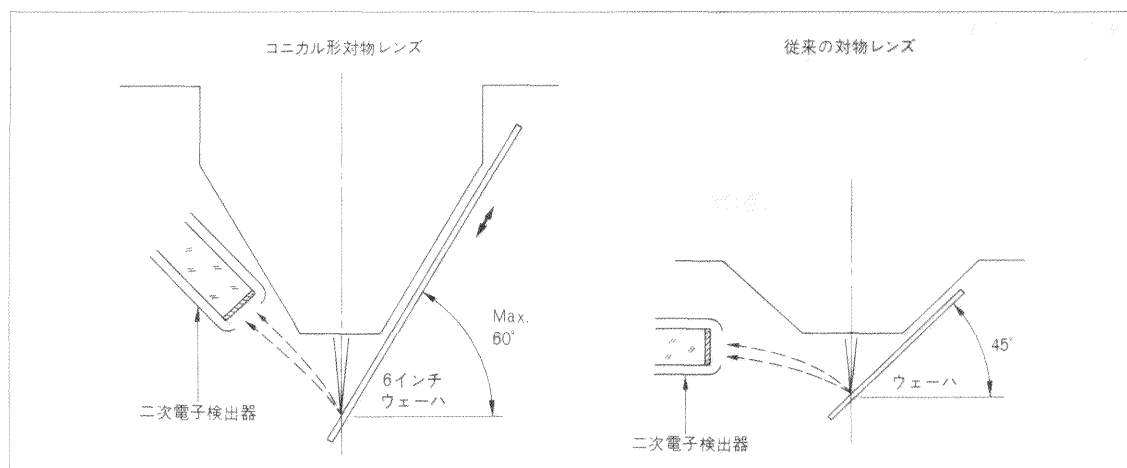


図9 コニカル形対物レンズ

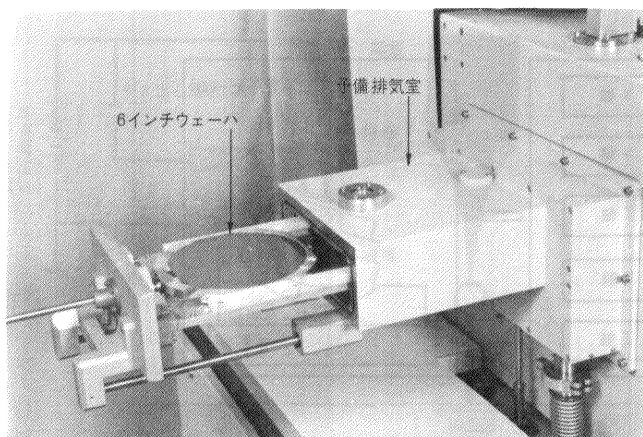


図10 ローダー部

のウェーハを予備排気室で排気後、短時間で試料室にローディングできる。ローディングは手動であるが、ウェーハホルダと試料ステージとのガイド部は、発塵防止のための工夫がなされている。また予備排気室のガス導入はフィルターを通して行ない、ドライ窒素導入が可能である。

3.4 0.5~25kVの高範囲な加速電圧

加速電圧は0.5kVから25kVまでの広範囲に設定できる。超LSIを無蒸着で観察するため0.5kV~5kVの範囲は100Vステップで可変でき、チャージアップの少ない最適な加速電圧を選定できる。一方、場合によっては、蒸着試料を超高分解能で観察できるように最高25kVの加速電圧まで有し、像分解能も6nmが得られる。

3.5 全自動排気系

全体の排気系統図を図11に示す。電子銃は60ℓ/sのイオンポンプで排気し、中間室は2個のイオンポンプ(20ℓ/s×2)で排気している。排気系はニューマチック方式の全自動排気系である。ポンプ及びバルブは全て自動制御され、操作は容易なプッシュボタン方式である。試料室の排気は標準では570ℓ/sの油拡散ポンプで排気しているが、試料汚染を軽減するために、ターボモレキュラポンプ排気もオプションで可能である。また停電、断水時の安全装置も組み込んでいる。

3.6 線幅測長のための測長ユニット

ウェーハの線幅測長のためのマイクロスケールユニットも組み込み可能で、CRT上の拡大像にカーソルを合せると自動的に線幅がデジタル表示される。

測長ユニットの測長方式を図12に示す。Xモードでは操作パネルのXキーでCRT上の左右のカーソルをそれぞれ独立に移動して測長対象物に合せると、カーソル間の距離が自動的に表示される。またYモードでは、Yキーで上下のCRT上のカーソルを移動すると、カーソル間の距離が表示される。さらにDモードでは、XキーとYキーで左右上下のカーソルを移動し、各カーソルの交点間の斜めの距離が表示される。測長ユニットの操作パネル部を図13に示す。

4. 主な仕様

二次電子分解能	6nm (加速電圧 25kV)
	20nm (加速電圧 1kV)

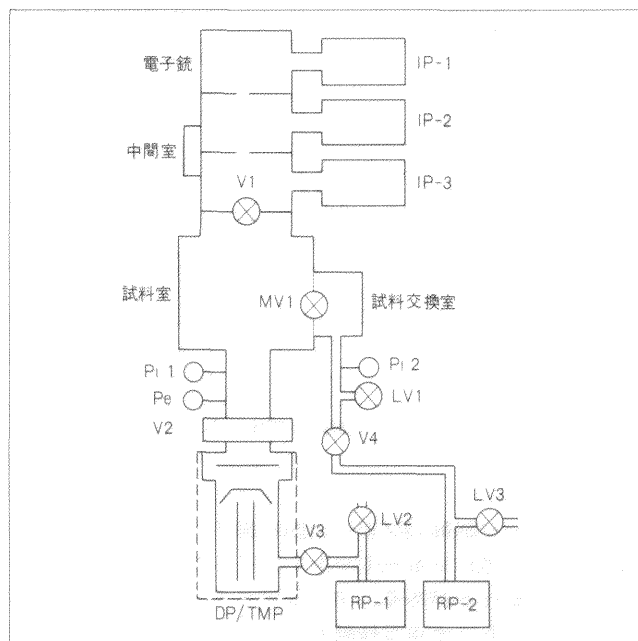


図11 排気系統図

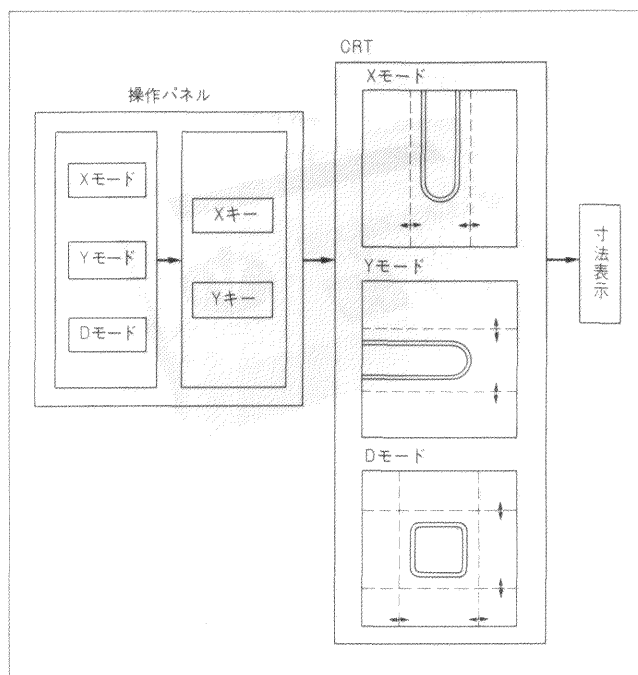


図12 測長方式

倍率	×50~×100,000
電子光学系	電子銃 クリュータイプ電界放射電子銃
加速電圧	0.5kV~5kV (100V ステップ)・・・プロセス評価用
	5kV~25kV (1kV ステップ)・・・断面観察用
試料ステージ	移動量 X/Y 150mmストローク
	Z 5~35mm (WD)

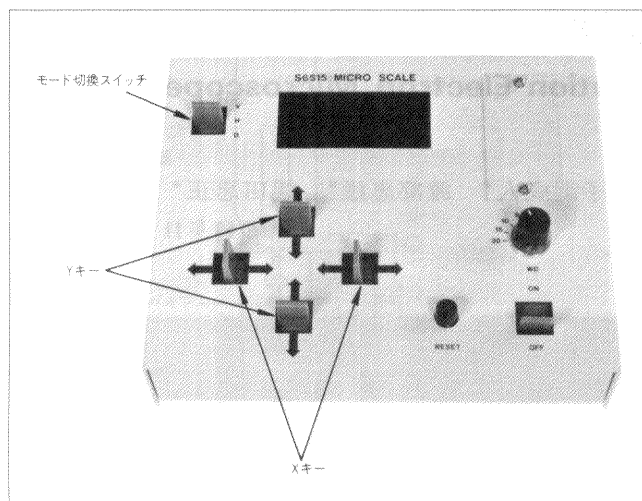


図13 マイクロスケール操作パネル

	回転	360°
	傾斜	0°~60° (ユーセントリック傾斜)
試料サイズ	6インチ (150mm) 径最大	
駆動方式	コンピュータ制御 (X, Y, Z, 回転, 傾斜)	
CRT	観察用 9インチ×2	
	撮影用 8インチ×1	
操作モード	自動画像調整 (オートブライトネス／オートコントラスト), 極性反転, オートフォーカス, 全自動データ表示, 他	

5. 応用例

ここでは、S-806形 SEM を用いて撮影された2, 3の応用例について述べる。また、図14は、5インチ径シリコンウェーハ上のレジストパターンを、試料傾斜角度45°で無蒸着観察したもので、S-806形 SEM の特長として、大径ウェーハ全域を同じ条件で観察可能であり、またユーセントリック傾斜方式を採用しているため、試料を傾斜した状態でX-Y平面移動をしてもピントのずれなどを生じない。

図15に特別付属品のマイクロスケールユニットを用いてパターン幅の測長を行った例を示す。S-806形 SEM においては、低加速電圧で高分解能が得られるため、大径ウェーハ上のレジストパターンの非破壊、無処理、低ダメージの条件での測長が可能である。

6. おわりに

以上、述べたように、本装置は半導体プロセス評価装置として、低加速電圧で高分解能を有する電界放射電子銃を搭載し、またコンピュータ制御による大形試料ステージにより6インチウェーハを直接観察することが可能になった。

したがって、今、本格的量産化に入ろうとしている2μmルールの256kメモリーや、1~1.5μmルールを実現しようとする試作、開発段階の1Mビットメモリーの評価には、本装置のような低加速電圧によるSEM評価法が主流になるものと予想される。

今後、半導体デバイスが高密度集積化、微細化するに伴い、プロセス技術は、デバイス構造や性能に合わせ新しい

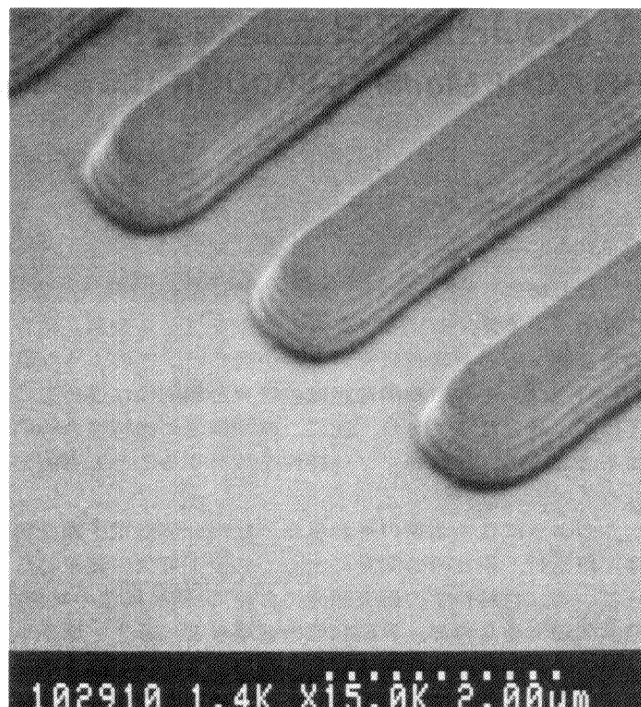


図14 5インチSiウェーハ上のレジストパターン(5インチウェーハを45°傾斜して観察したもの)

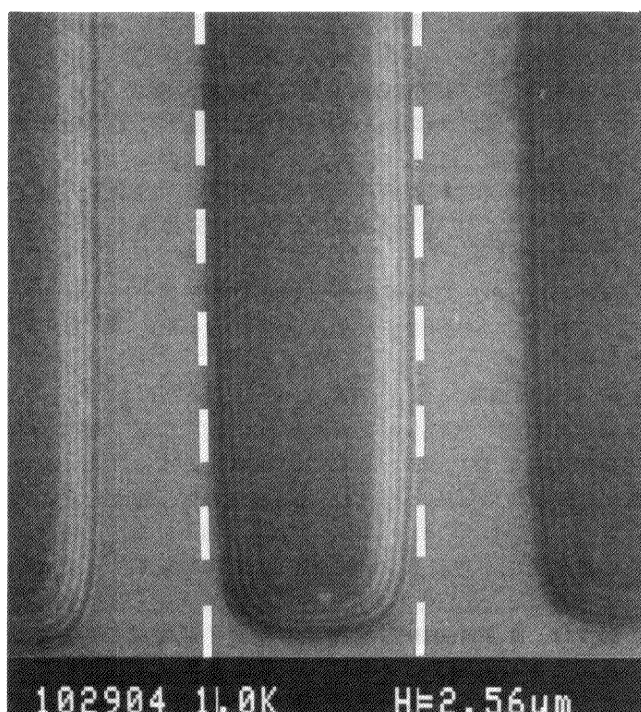


図15 5インチSiウェーハのレジストパターンについて測長を行った例

材料が開発されることが予想される。したがって、プロセス評価用の本装置も、観察、測長など表面の評価のみでなく、薄膜、層構造の元素分析などの機能を付加し、さらに高度な評価ができるよう改良され、半導体プロセス評価装置として大いに役立つものと期待する。

H-800UHR 形日立超高分解能電子顕微鏡

HITACHI Model H-800UHR Ultra-High Resolution Electron Microscope

砂子沢成人* 渡部忠雄* 鶴田忠正* 上村昌司*

(昭和 59 年 11 月 6 日 受理)

1. はじめに

近年、半導体、セラミックス、アルモファス金属、化合物半導体などの新素材研究の発展が著しい。このような新素材研究は、その微細構造組織の研究と無関係に進めることは不可能となっており、逆に、微細構造の諸特性を解明することから、材料のマクロ特性を設計することも可能となっている。

このように技術革新の進む現在、超高分解能電子顕微鏡は、新素材、新技術の開発にとって必要不可欠の装置となっている。材料科学の研究開発において、結晶構造の解析、結晶欠陥、結晶粒界、界面状態の観察など、分子・原子レベルでの結晶構造の直接観察の手段としては、超高分解能電子顕微鏡以外には考えることができない。このような超高分解能電子顕微鏡像を日常的に利用するには、電子顕微鏡のすべての性能の総合安定性が必要とされる。

ここでは、超高分解能電子顕微鏡 H-800UHR 形における技術開発の内容と、その結果得られたいくつかの応用データの紹介を行う。

2. H-800UHR 形超高分解能電子顕微鏡の構成

いままでの電子顕微鏡の技術開発は、すべてその分解能向上のための開発であったと言っても過言ではない。

電子顕微鏡の技術要素は、(1) 真空排気系、(2) 高電圧電子源、(3) 電子レンズ系、(4) 機構系、そして (5) 操作性と考えてよい。

我々は、200kV 電子顕微鏡 H-800 形を超高分解化するため、それぞれの技術要素に関し開発を行ったので、以下にその概要を述べる。

2.1 真空排気系

超高分解能で試料を観察する場合、真空は、電子顕微鏡の技術要素の 1 つである。それは高分解能化するほど、直接観察倍率が高くなり、狭い試料領域を強い電子線で明るく照射することが求められ、このとき真空度および真空の質が悪いと試料汚染が生じ、試料の正しい構造が隠されてしまうからである。

図 1 は、H-800UHR 形超高分解能電子顕微鏡の外観を示した図であり、図 2 にその排気系構成を示す。

この排気系には、次のような特徴があり、清浄な高真空排気系を実現している。

(1) 清潔でかつ高真空度が要求される試料室および電子銃の真空排気系とアウトガス源の多い観察室、およびカメラ室の真空排気系とを、それぞれ独立に排気する独立 2 系統排気系の構成になっている。

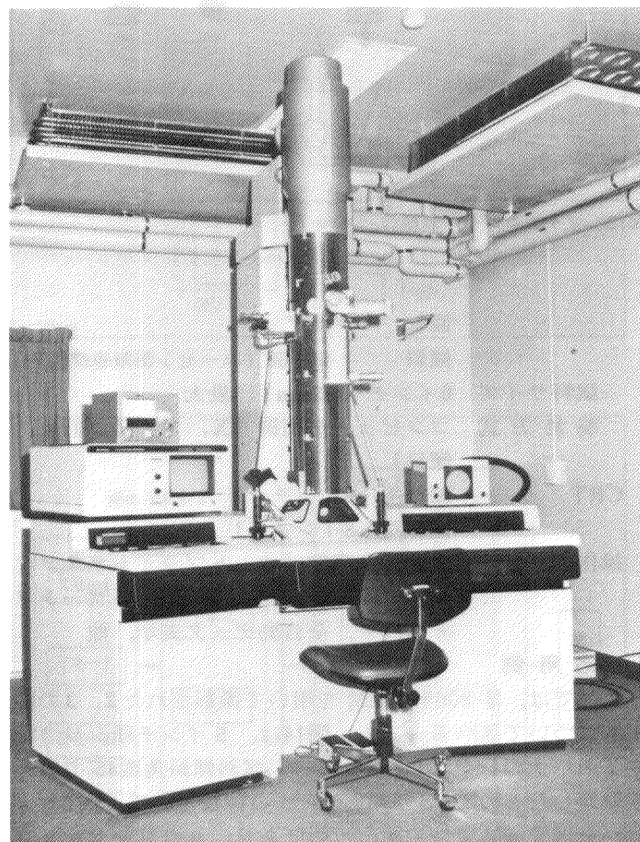


図1 H-800UHR形超高分解能電子顕微鏡
(超高分解能評価室に設置した状態)

(2) 電子線通路を可能な限り、細いステンレススチールパイプで構成し、排気容積を減すと共に、最大のアウトガス源である O リングの数を少なくした。

(3) 真空部品をすべて真空脱ガス処理し、アウトガス量を低減させた。

(4) 第 2 排気系の真上に、大容量のコールドトラップを設け、これをクライオポンプとして動作させることにより、清浄な高真空が得られる。

これらの開発の結果、試料室での真空度は約 1×10^{-7} Torr となり、常に超高分解能像観察の条件を維持している。

2.2 高輝度高電圧電子源

電子源に高電圧が安定して印加され、輝度が高く、可干渉性の良い電子線が得られることが、超高分解能像観察の必要条件の 1 つである。

図 3 は、H-800UHR 形超高分解能電子顕微鏡の 200kV 電

*日立製作所 那珂工場

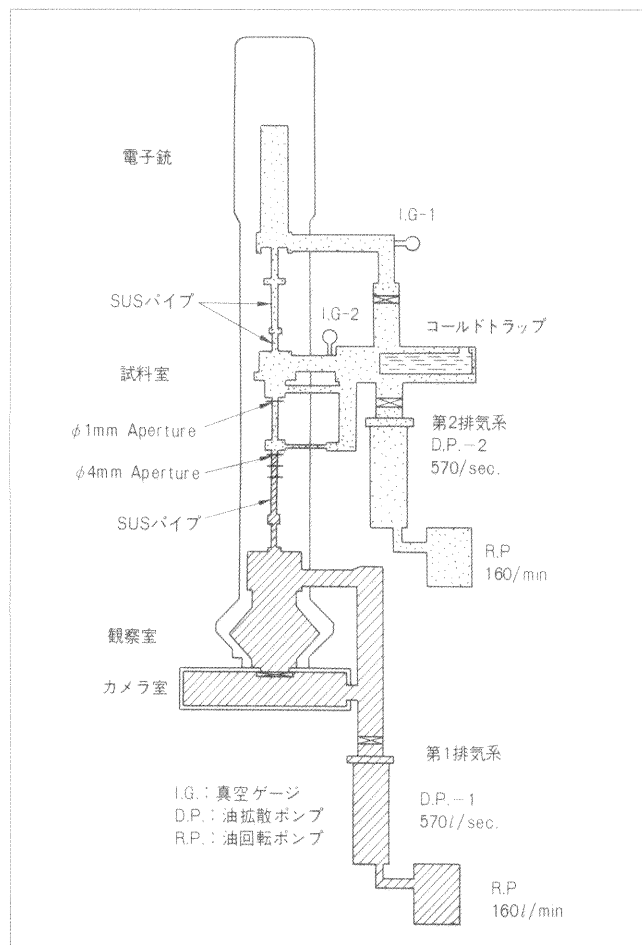


図2 高真空独立2系統排気系

電子銃部の概略断面である。電子線は、6段の電極により加速され、200kVのエネルギーを得る。高輝度フィラメントであるポイントフィラメント、 LaB_6 フィラメントの特性を十分に発揮させるためには、バイアス電圧の精密なコントロールが要求される。このため、0～1500Vまでのバイアス電圧が、つまみ1つで連続的に変化できるバイアス連続コントロール機能が組み込まれている。そして、バイアス電圧を連続的に変えることにより、フィラメントに最適な飽和点が容易に得られる。ヘアピン、ポイント、 LaB_6 のいずれのフィラメントでも使用できるが、H-800UHR形では実測の結果、 LaB_6 に比べ、電子線のエネルギーのゆらぎが小さいポイントフィラメントを常用している。

2.3 超高分解能対物レンズ

対物レンズの収差係数を小さくすることが、超高分解能化にとって本質的に重要である。我々は、H-800UHR形用として、200kVの電圧に対してレンズ形状を最適化した収差の最も小さい対物レンズを開発した。

レンズの開発にあたっては、図4に示すような磁場計算のための有限要素の手法を開発した。これにより、複雑な形状の対物レンズの磁場強度分布を正確に求めることができ、対物レンズ形状の最適化を図っている。

図5に、最終的に得られた対物レンズの収差係数を示す。

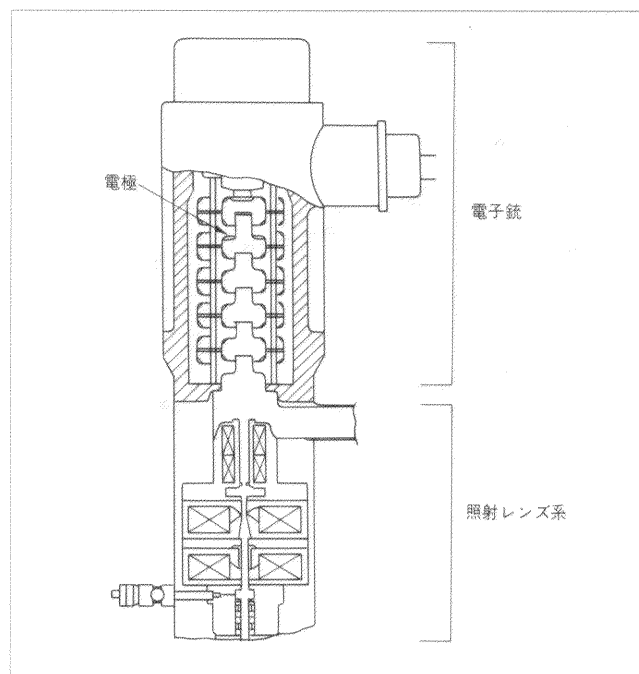


図3 6段加速200kV電子銃

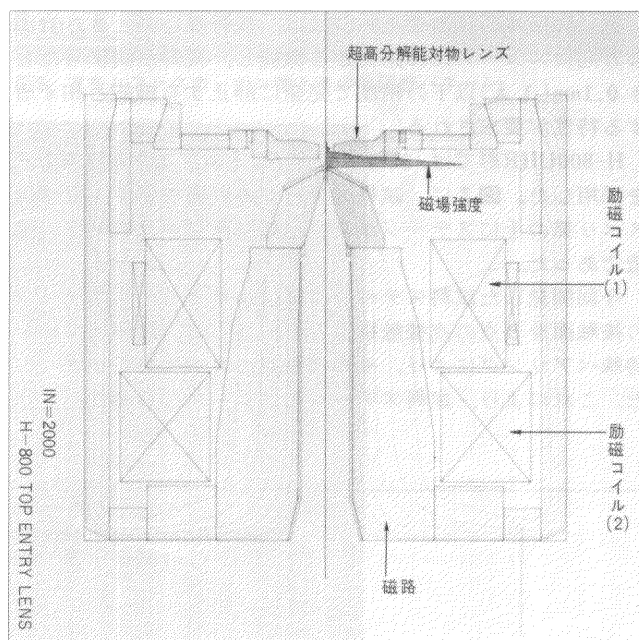


図4 有限要素法による磁場強度シミュレーション

同図から明らかなように試料位置2mmで、球面収差係数 $C_s=1.0\text{mm}$ 、色収差係数 $C_c=1.2\text{mm}$ と、200kVとしては世界で最も小さい収差係数が得られた。なお、この条件で $\pm 10^\circ$ の試料2軸傾斜が可能である。収差係数の実測値も、実験誤差範囲内で計算値と一致していることがわかる。

図6に、これら収差係数から期待される位相コントラストの伝達関数を示す。この図から約0.23nm(2.3Å)の点分解能が得られることがわかる。

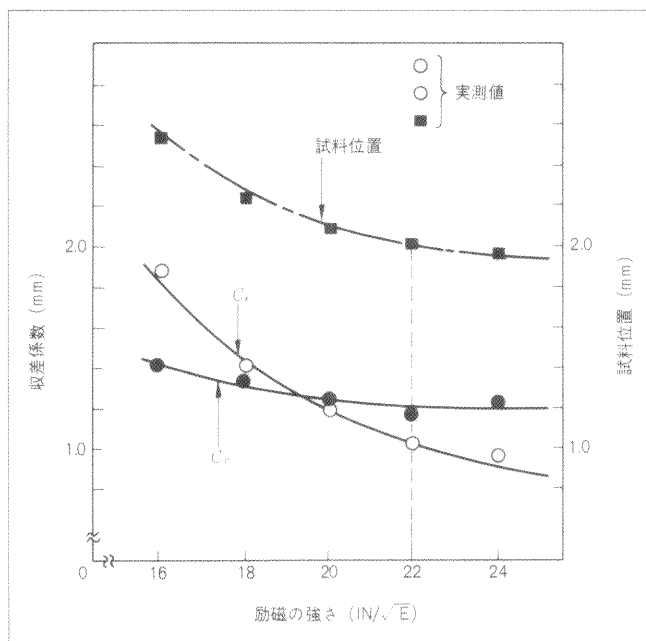


図5 超高分解能対物レンズの特性

なうことなく、押し付けバネ圧を従来より1桁強くすることができ、耐振性を大幅に向上させることに成功した。また、このステージには、 $\pm 10^\circ$ 2軸傾斜が可能な試料ホルダを組込むことが可能である。

図8に2軸傾斜試料ホルダの外観を示す。

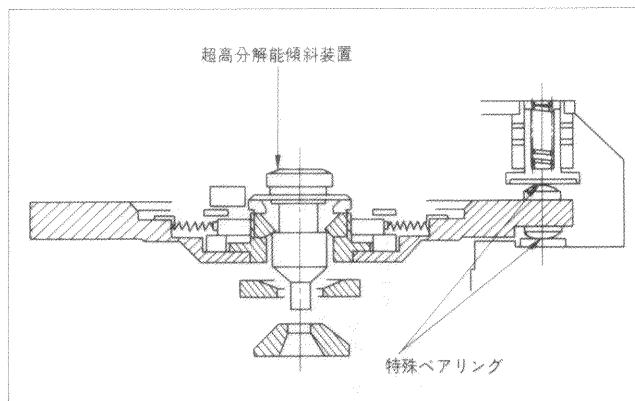


図7 試料ステージ

2.4 試料ステージ

電子顕微鏡の試料ステージには、視野探しのとき、自由な方向にスムーズに移動できる機能と、視野が決まったとき0.1nm(1 Å)以下の精度で完全に静止する機能と相矛盾する特性が要求される。

H-800UHR形では、試料ステージにトップエントリー方式を採用した。図7に、試料ステージの断面を示す。従来はスベリ皿の上にステージが乗り、接触面積が比較的広い構造であった。

今回開発した試料ステージは図に示すように、ステージの接触面を3点の点接触構造とし、さらに、超硬メタルと特殊ベアリングにより、その接触点の摩擦係数を小さくした。これにより、試料ステージのスムーズな移動性能を損

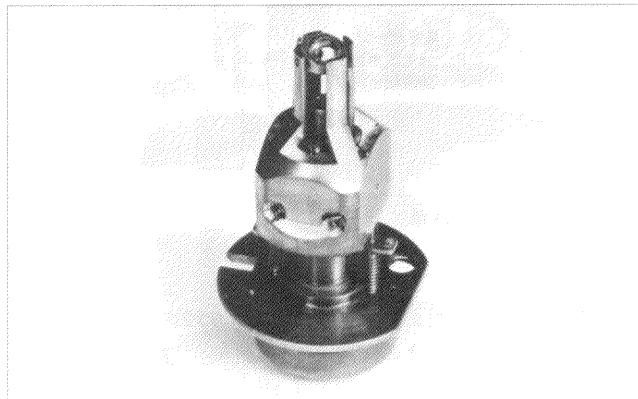


図8 2軸傾斜試料ホルダ外観図

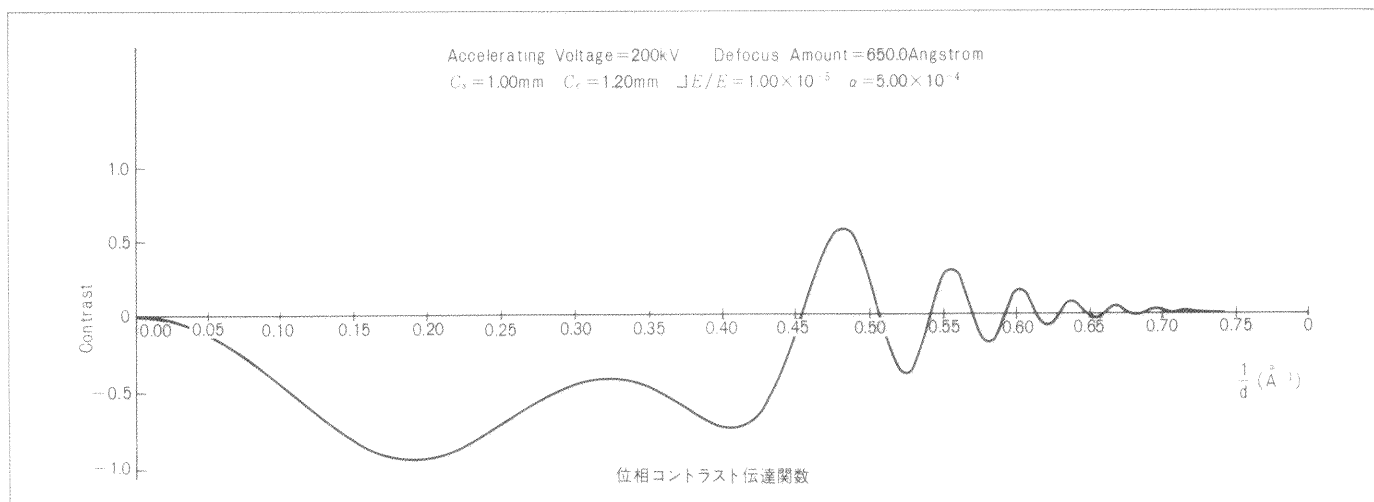


図6 位相コントラスト伝達関数

2.5 操作性

従来、電子顕微鏡においては、性能を重視するあまり、操作性をややもすれば軽視するきらいがあった。しかし、操作性が良いことは、データを出す能率の上で極めて重要である。H-800UHR形では、超高分解能と容易な操作性が共存するように配慮した。

H-800UHR形の制御はすべてCPUを介して行なわれており、次のような大幅な操作性の向上を図ることができた。

(1) リモード別電子線アライメントシステム

明/暗視野像、低倍像、極微小領域の電子線回折モードなど、各モードに独立に電子線偏向系、スティグメータ系をメモリすることにより、モードを切替えても明るさ、非点など変らない状態を保持できる。

(2) 自動露出

設定された明るさに対して最適露出になるよう、自動的にシャッター時間が定まるため、オペレータは露出のパラツキを心配する必要がない。

(3) 自動スルーフォーカス

最適フォーカスを得るため、スルーフォーカスで写真を撮影する場合があるが、このときには、フィルム送り、シャッター操作、フォーカス変化が自動制御されるので、オペレータは、フォーカス変化幅、撮影枚数、撮影視野のみを設定すればよい。

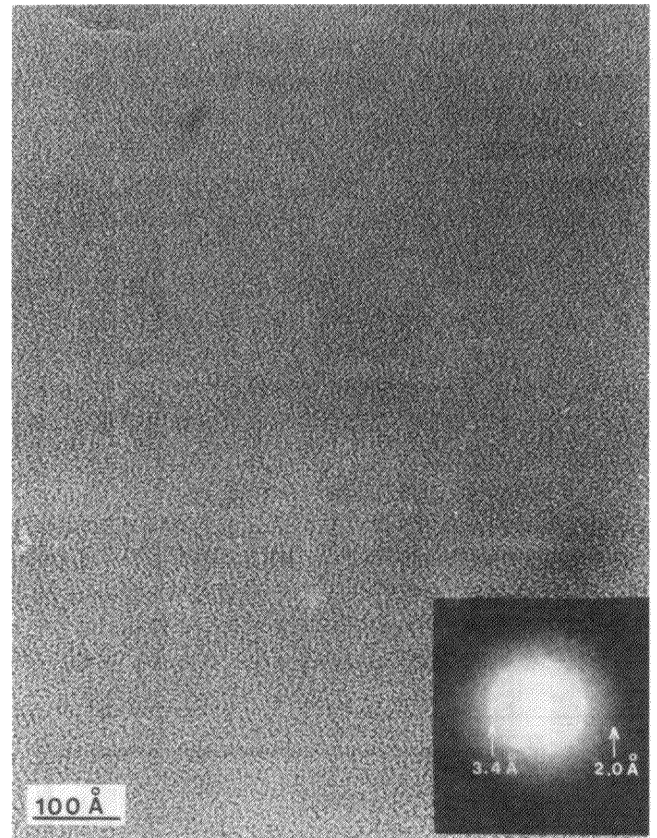


図9 アモルファスカーボン像とその光回折パターン

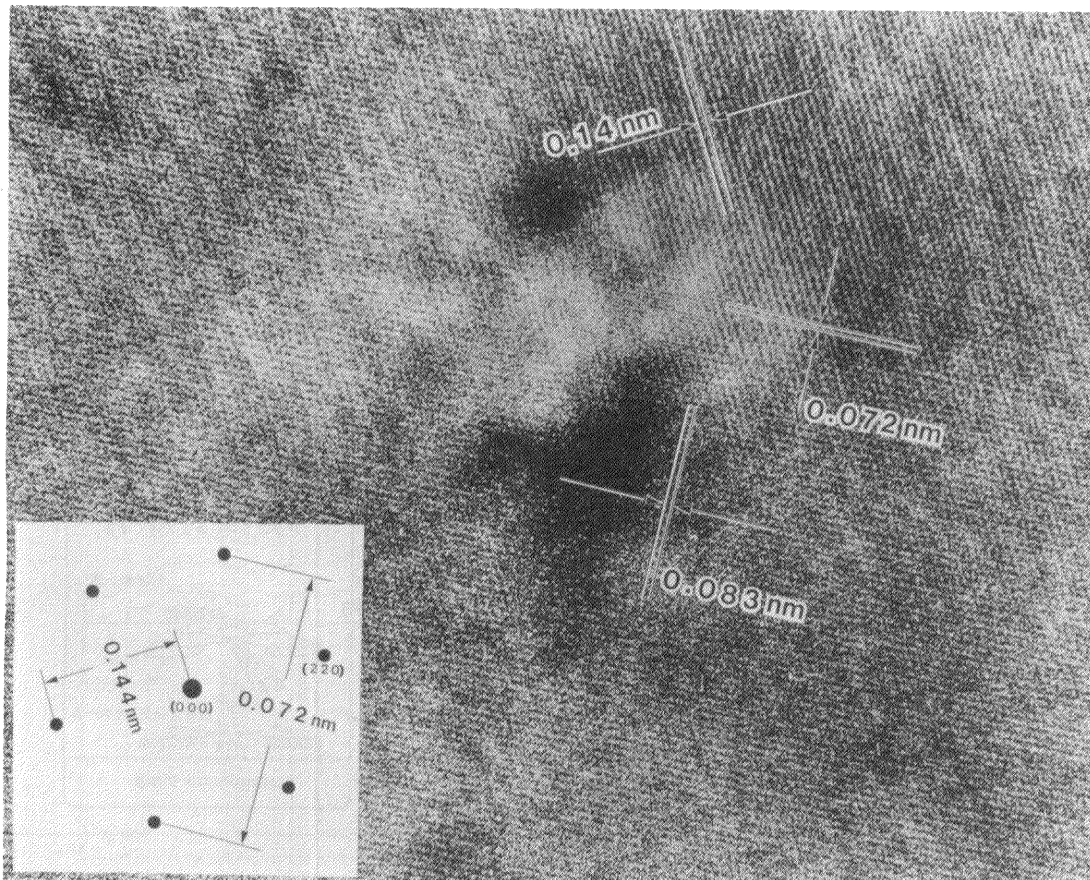


図10 Au単結晶の0.072nm(0.72 Å)の格子像

3. 限界分解能の検討

以上、述べてきたような設計思想のもとに開発された H-800UHR 形において、その分解能限界を明らかにすべく次のような検討を行った。

3.1 点分解能

図 6 に示したように、対物レンズの収差係数と加速電圧から期待される点分解能は、約 0.23nm ($2.3\text{\AA}$) である。

これを実証するために、アモルファスのカーボン蒸着膜をシェルトワーフォーカス付近で撮影した。図 9 はその結果である。撮影ネガをレーザー光を用いて光回折させた結果を右下に示す。光回折像から、カーボン蒸着膜ネガでは 0.2nm ($2\text{\AA}$) 以下の空間分解能が得られていることがわかる。すなわち、理論的に期待された点分解能が十分に得られていることになる。

3.2 0.072nm ($0.72\text{\AA}$) の格子分解能

格子分解能の限界を調べるため、金単結晶 (220) 面の $\frac{1}{2}$ 周期像 0.072nm の撮影を行い、図 10 に示すように 0.072nm ($0.72\text{\AA}$) の実証に成功した。この分解能 0.072nm は、現在、商用電子顕微鏡で得られている世界最高分解能である。

また、極限的分解能の評価をするにあたり、音響レベル

の振動、空気動きなど外乱により本来の性能を損なうことのないよう図 11 に示すような超高分解能評価室を設けた。これは、無風でしかも断続がないように、冷却温度がコントロールできる冷却体を部屋の上部に設け、電子顕微鏡から発生する熱による空気の自然対流を利用して、温度制御が行なわれる。さらに壁は、防音、吸音など外部振動が遮断できる構造となっている。

4. 応用 例

以上、述べた超高分解能電子顕微鏡の技術要素については、具体的に多くの実試料を用いデータを積み重ね、個々の試料の特質と観察目的に合った試料ステージなどの性能向上や、電子銃の高輝度化の検討改良を行った。

従来、分解能写真は、電子顕微鏡のもつ総合性能を保証する 1 つの目安として重要な意味をもっていた。したがって、超高分解能領域では、単なる性能評価のための理想的試料(単結晶)がその対象であった。

しかし、現在では、超格子半導体などの異種元素で構成される試料や、セラミックスなどの絶縁物を超高分解能領域で観察する要求が高まっており、これらの試料で目的のデータを得るためには、試料作製技術がそのカギを握るこ

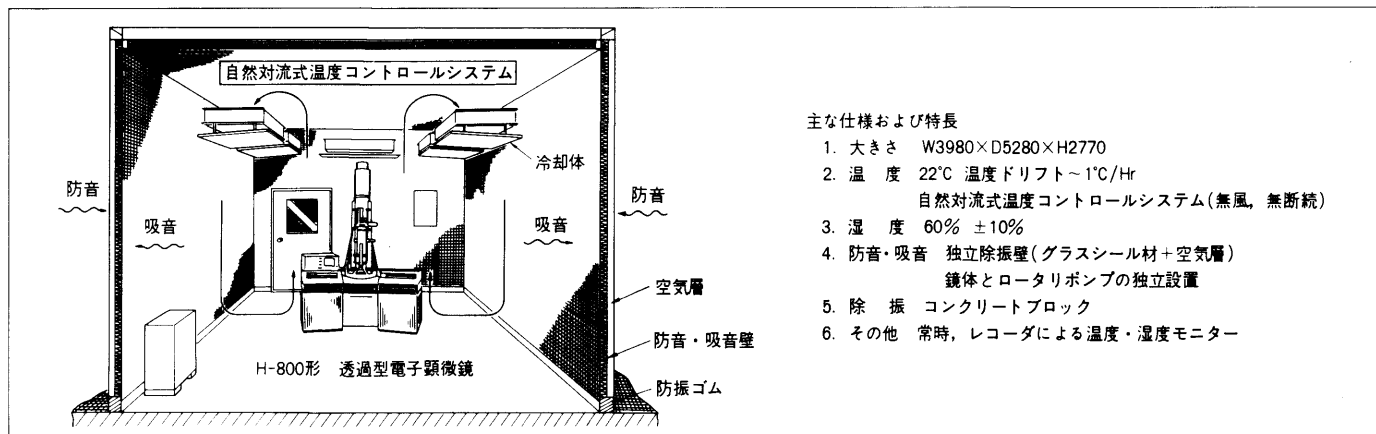


図11 超高分解能電子顕微鏡評価室

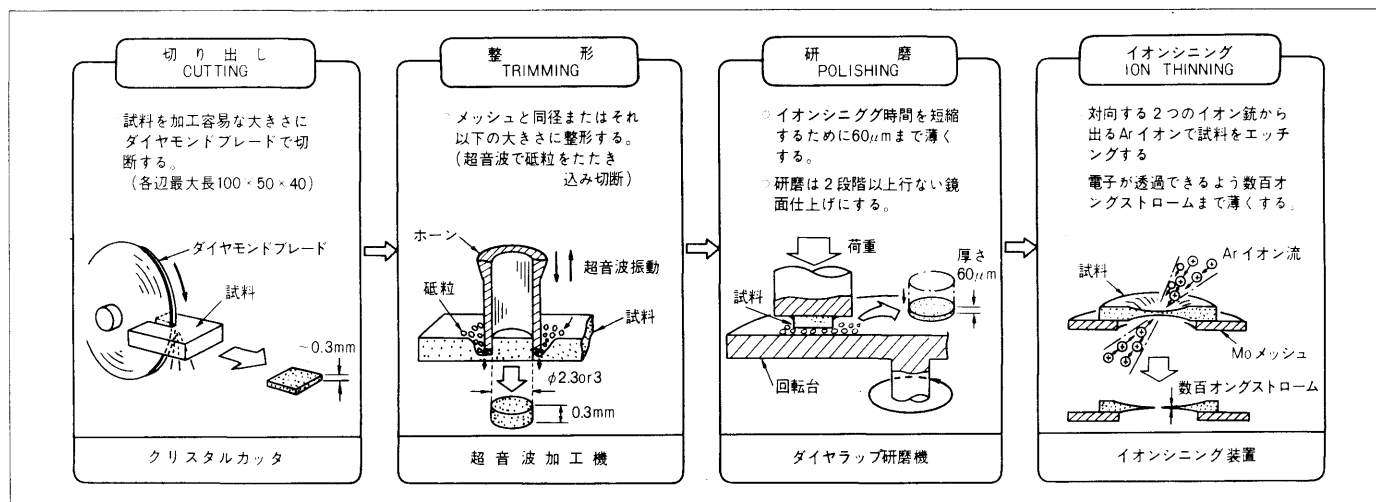


図12 電子顕微鏡の試料薄切前処理工程の一例

とは言うまでもない。そのために、従来のレプリカ法など
と異なり、直接観察する部位を数十nmまで均一に薄膜化す
ることが必要になる。図12に、試料薄膜作製法の一例とし
て、イオンシニングの試料前処理法を示す。これらトリミ
ングからイオンシニング完了までは、試料によって異なる
が、15時間～50時間かかる。

次に、新素材半導体を中心とした超高分解能観察応用例
を紹介する。

4.1 VLSI 素子断面の格子像観察例

半導体デバイスは、超微細加工技術やプロセス技術の進
歩と共に、従来のLSIのように基板結晶の表面領域のみに
デバイスが形成されるだけでなく、基板の内部にデバイ
スを作り込む技術や多層構造をもつようなデバイスが開発さ
れようとしている。そのため、デバイスの断面の微細構造
および界面の原子配列や、多結晶構造の結晶粒界などの観
察、評価法が必要となってきた。またこれらと合わせ、超
格子半導体素子など材料開発においても同様層構造の界面
での平坦さや界面幅、結晶構造を原子レベルで評価する要
求が高まっている。

図13は、1MビットDRAMのメモリーセル断面部分の拡大
を示す。この写真からは、多層薄膜の積層状態、細孔(1 μ m
径)の断面形状充填物質の多結晶SiやAl配線の結晶粒界
など、従来の観察技術で得られなかった多くの新しい情報
が、鮮明に観察できる。図13の試料作製工程を図14に示す。

図15にVLSIの断面観察例を示す。試料は1Mビット
MOSメモリーで、選択酸化(LOCOS)後の断面模式図の
A部を順次拡大したものであり、C部拡大部では各層Si₃N₄、
/SiO₂/Si界面において、その界面の平坦さは0.5nm程度で
あることがわかる。

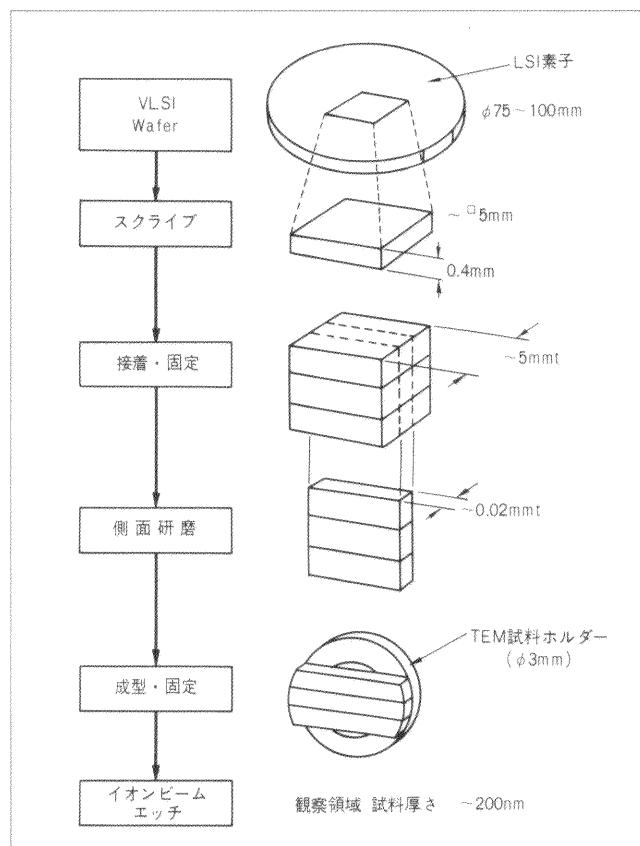


図14 断面試料作製工程

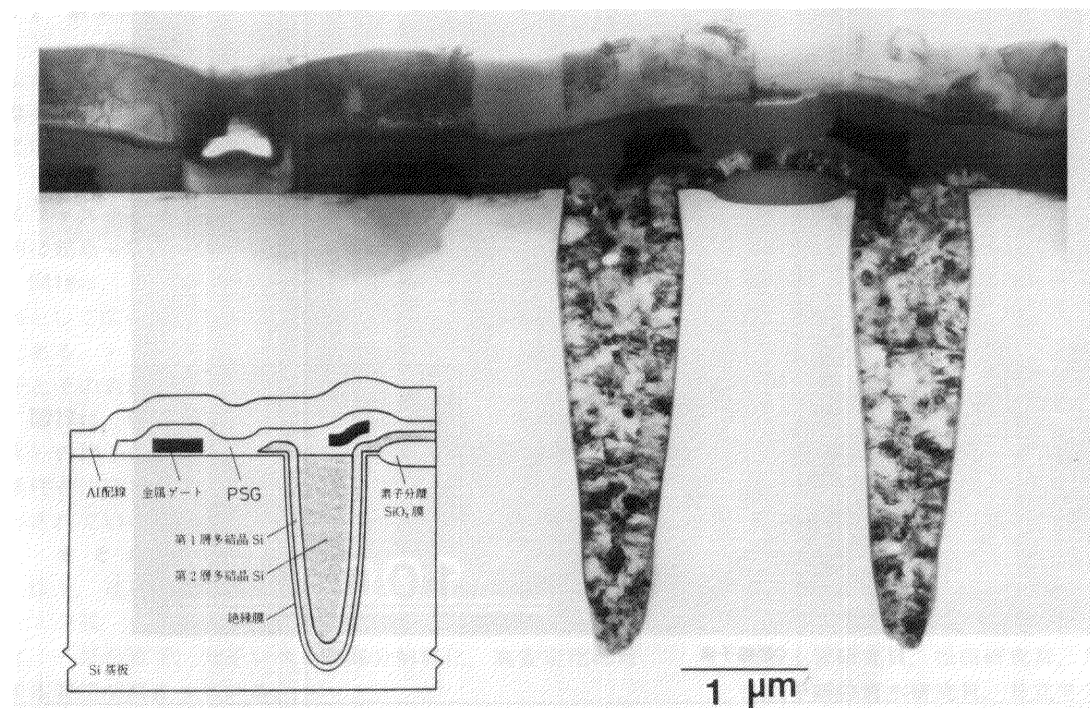
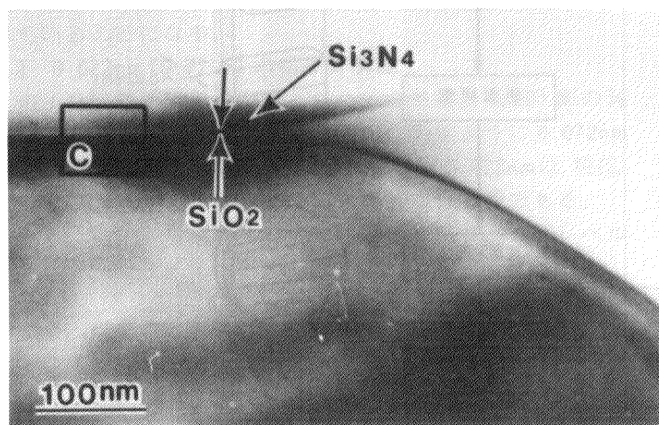
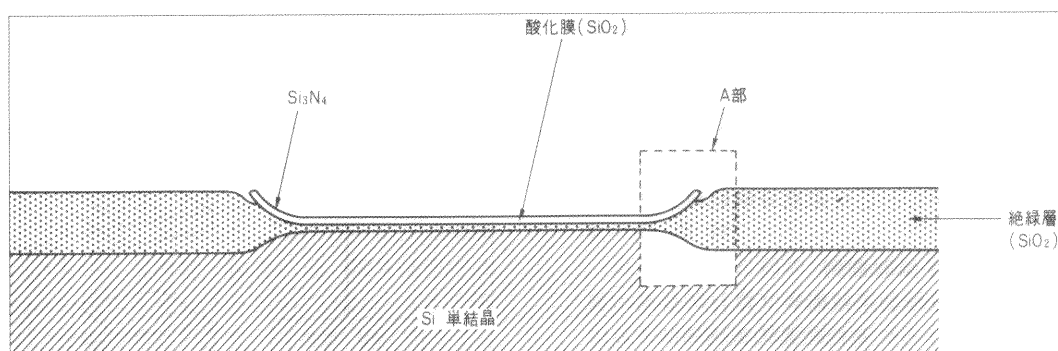
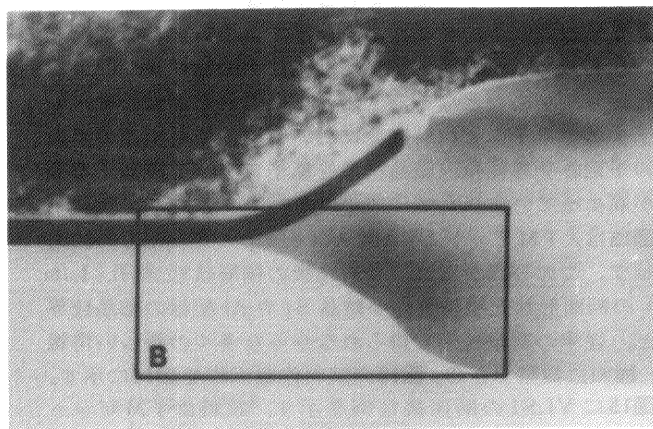


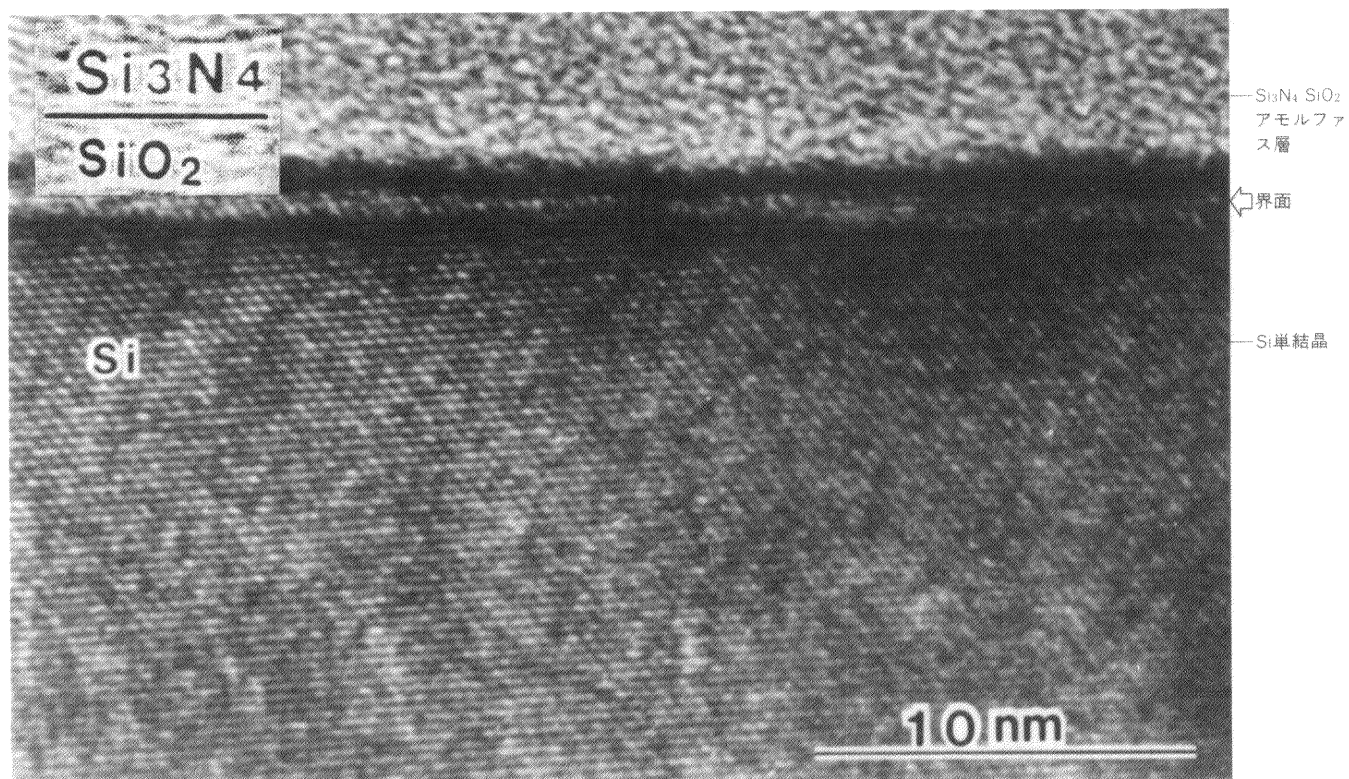
図13 1MビットDRAMのメモリーセル断面



B部拡大断面像

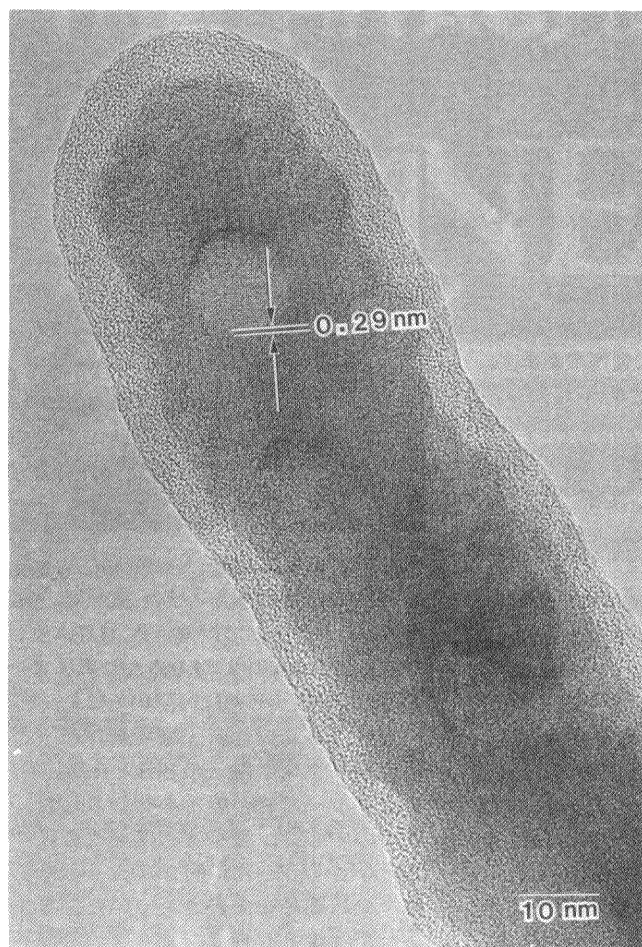


A部拡大断面像



C部格子像

図15 1M1T1 MOSメモリの断面構造観察例

図16 γ - Fe_2O_3 微粒子の高分解能像（格子像）図17 γ - Fe_2O_3 超微粒子の高分解能像（格子像）

4.2 新素材，超微粒子の観察例

ニューセラミックスや磁気記録用材料などで、これまでにない優れた特性をもつ材料を開発するには、その原料となる微粒子の結晶構造や表面構造を原子レベルでとらえることが必要である。

また、人工的に原子層を積み重ねた超格子半導体やアモルファス金属なども同様に、その結晶構造、欠陥などの解明に超高分解能電子顕微鏡が不可欠である。

図16は、ビデオテープ、磁気ディスクなどの磁気記録材料として広く使われている γ - Fe_2O_3 の微粒子の高分解能像である。 γ - Fe_2O_3 微粒子の(200)面の 0.29nm ($2.9\text{\AA}$)の格子とその表面を、 CoFe_2O_4 がおおっている様子がわかる。

図17は、同じ γ - Fe_2O_3 の微粒子の(111)面の 0.48nm ($4.8\text{\AA}$)の格子像である。これらの結晶構造の解明により製造条件を決定し、より細密な情報の記録とS/N比向上の追求がされている。

5. まとめ

以上、述べたように、近年の材料科学におけるアモルファス金属、超微粒子、化合物半導体などの研究開発分野では、一層の原子、分子レベルの高分解能化、高安定化に対する要望が高まっている。

具体的な応用例で紹介したように、超LSIなどのデバイ

ス断面の微細構造や、結晶断面の界面の平坦さなど、電子顕微鏡がとらえる原子・分子レベルの微細構造が素材の強さや、電気的特性と密接に関係することを考えると、超高分解能電子顕微鏡は、新素材、新技術の開発、設計に不可欠の装置と言える。

よって今後も、装置側としては、光源が小さく、輝度が高く、しかも可干渉に優れた電界放射形電子銃の搭載や、超高真空試料室の開発を継続的に進め、これと並行し、操作性、安定性、信頼性に関しても従来以上に力を入れて開発する必要がある。

その他、周辺技術として、電子顕微鏡像の画像処理や、試料作製技術と実試料でのデータの蓄積に基づくソフト技術の開発を忘れてはならない。

今後、超高分解能電子顕微鏡は、ハードおよびソフト技術の進歩と共に、技術開発の最先端における基礎研究、新しい材料開発設計の有力な評価手段として、ますます大きな期待が寄せられることであろう。

本稿執筆にあたり、有益な討論をいただいた日立中研の菰田主管研究員、松田研究員、及び試料御提供いただいた日立中研の青木研究員、日立マクセル(株)に深謝申し上げる。

Topics

833A形日立クロマト データ処理装置



クロマトグラムを記録計の様に記録するなどの新機能を備えた新製品 833A 形クロマトデータ処理装置が完成しました。この装置は多様なニーズに応え、従来製品の833形の操作性を向上し、更に新機能を追加しました。

■ 主な特長

- (1) 記録計モードの選択ができ、クロマトグラムやベースラインの状態を確認できます。
- (2) タイプライタモードの選択ができ、分析条件、成分名およびコメントなど

を好きな場所に印字できます。

- (3) キャリブレーションによる修正百分率法および内部標準法の計算が可能になりました。
- (4) オートゼロの指定ができ、入力信号レベルの測定ができます。
- (5) 入力信号レベルをプリントアウトできます。
- (6) 同時処理は4台まで拡張でき、拡張しても本体の大きさは全く変わらず、分析室のスペースを有効に使用できます。
- (7) 特別付属品が豊富です。

- ① CRT
- ② フロッピーディスク
- ③ コミュニケーション I/F (RS232C 用)
- ④ I/O メモリ
- ⑤ タイマーインタフェース
- ⑥ 外部スタート用インタフェースおよびスイッチ
- ⑦ 信号セレクト

■ 主な仕様

- (1) 入力電圧 $-10\text{mV} \sim +1\text{V}$
- (2) ピーク取込700ピーク(1ch)
- (3) ピーク分割自動判断(ティールングピーク検出可)
- (4) 再計算波形処理条件の変更可
- (5) 再記録クロマトグラムの再生、拡大縮小可、波形処理線の印字可

(6) 定量法 ①10種類の定量法

- ②特殊計算(グルーピング、マルチ計算、多重計算)

第23回分析機器展 盛況裡に閉幕



分析機器業界における最大のイベント——分析機器展が今年も東京都立産業貿易センターにて開催され、11月13日より16日迄の会期中2万4,000人の来場者をお迎えし盛況のうちに終了いたしました。

当社は日立製作所・堀場製作所・平沼産業・コロナ電気の各社と合同して、日立グループ総合展示を行いました。展示の中心は、皆様方の関心の深いシステム化・ソフト化に的を絞り、合わせて数々の新製品を発表させていただきました。今後とも日立グループの製品を御愛顧の程お願い申し上げます。

日製産業株式会社

本社別館 電話 東京(03) 504-7211
新潟出張所 電話 新潟(0252)41-3011<代>
京都出張所 電話 京都(075)241-1591
名古屋支店 電話 名古屋(052)583-5841
岡山出張所 電話 倉敷(0864)25-1316
郡山出張所 電話 郡山(0249)32-0581
札幌支店 電話 札幌(011)221-7241<代>

本郷出張所 電話 東京(03) 815-2051
大阪支店 電話 大阪(06) 366-2551
水戸営業所 電話 水戸(0292)27-2101
豊田出張所 電話 豊田(0565)28-5179
仙台支店 電話 仙台(0222)64-2211<代>
九州支店 電話 福岡(092)721-3501
富山支店 電話 富山(0764)24-3386<代>

横浜出張所 電話 横浜(045)671-5421
四国出張所 電話 高松(0878)62-3391<代>
筑波営業所 電話 土浦(0298)23-7391
広島支店 電話 広島(082)221-4514<代>
秋田出張所 電話 秋田(0188)64-2244
沖縄出張所 電話 那覇(0988)78-1311-7

<編集後記>

- 本号は、全体を電子顕微鏡特集として編集しました。長文の原稿が多く、掲載できた記事の数が、予定したものより大幅に少くなっています。
- 工学院大学の金谷先生には、電子顕微鏡画像のデジタル画像解析の方法によって、電子顕微鏡の解像度より数倍解像度を向上させて構造解析を行った例について報告していただきました。
- 名古屋市立大学の渡先生には、電子顕微鏡画像の自動定量装置に、パーソナルコンピュータを応用した例について報告していただきました。

- 日立理科学機器による報文のご投稿を歓迎致します。

- 本ニュースに関するお問合せは、下記へ、または、日製産業株式会社の上記各事業所へご連絡ください。

○株式会社 日立製作所 那珂工場 応用技術センター
茨城県勝田市市毛882番地
〒312 電話 水戸(0292)73-2111<代>

○日製産業株式会社
科学機器営業本部 企画開発部
東京都港区虎ノ門1丁目26番5号第17森ビル
〒105 電話 東京ダイヤルイン(03)504-7187

THE HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
WINTER 1984 Vol.27 No.4

発行 昭和60年1月1日(年4回発行)
発行人 鶴沼伸充
編集人 永谷 隆 岩井孝之
発行所 株式会社 日立製作所 計測器事業部
科学機器部
〒100 東京都千代田区丸の内1-5-1新丸ビル
電話 東京(03)214-3123(直通)
印刷所 日立印刷株式会社