

SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

HITACHI

Jul./Aug. 1993
VOL.36 No.1

目次

特集 ナノエリアへのアプローチ

巻頭言

「ものを見る」……………外村 彰 -1

報 文

電子顕微鏡による臨床診断

……………福田 覚
日野 治子 木村健二郎 別所 文雄 -3

HF-2000形日立電界放出形電子顕微鏡による実用電子線ホログラフィー

……………11
D.C Joy, L.Allard, T.A. Nolan, X.Zhang, Y.Zhang and R. D. Bunn

解 説

Natural SEM 日立走査電子顕微鏡

……………久保木健三 -22

学会発表ミニファイル

日本電子顕微鏡学会 第49回学術講演会の巻

……………18

技術資料 新刊紹介

テクニカルデータ最新版ダイジェスト

……………20

ラウンジ

1,400°Cにおける原子の世界(材料

研究における透過電子顕微鏡) -2

特集 ナノエリアへのアプローチ

巻頭言

「ものを見る」

To See Objects

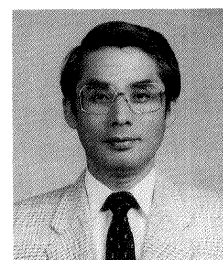
外村 彰*

身近にある自然の景色やその移り変わり、どれ一つをとってみても、自然が作ったもののみに感嘆せずにはいられない。ミクロの世界も同じである。近年、電子顕微鏡や走査トンネル顕微鏡の発展によって、原子レベルで「もの」が見えるようになってきた。原子が規則正しく整列していたり、動いている様子をじかに見ると、自分がミクロの世界に足を踏み込んでしまったような気になって、想像力をかきたてられる。

直接「ものを見る」ことの出来なかったときには、いろいろな実験データから、未知の世界を探ってきた。それでも、その姿を実際に描いてみようとする、それだけの情報では不可能ことが多い。これまで観察できたことのない「もの」の写真が撮れたとしたら、その中には数限りない情報が含まれている。

今、私たちは干渉性の良い電界放出形電子顕微鏡を使って、超伝導のミクロな構造の観察に熱を上げている。超伝導体と言えば、対をなした電子達が試料中をコヒーレントな運動を行って、抵抗なしに電流を流す。まったく構造など無いように思えるが、実はそうではない。電流を流したり、磁場を印加すると、太さ0.1 μm という細い糸状の磁束量子が超伝導体を貫き、電流を流すとそれが動き回る。電流を増すと磁束量子の流れが激しくなり、やがて超伝導状態が壊れる。この臨界電流を決めているミクロのメカニズムを、この目で見たいと思っている。格子を組んだ磁束量子が超伝導体の中を流れ、時には欠陥で引っ掛かり、あるいはよけて通る。格子のある部分が一瞬止まったかと思うと、また熱的に励起されて再び動き始めたり、と想像は尽きない。

じかに見えたら実に楽しいと思って努力してきたが、どうやらその可能性が開け始めてきた。材料開発に役に立つに違いないが、さらに新しい発想に結び付くように思う。



* 株式会社 日立製作所 基礎研究所 主管研究員

筆者経歴

氏名 外村 彰
 現住所 〒350-03 埼玉県比企郡鳩山町楓ヶ丘2-19-5
 生年月日 昭和17年4月25日
 略歴 昭和40年3月 東京大学理学部物理学科卒業
 昭和40年4月 株式会社 日立製作所 中央研究所入社
 昭和50年8月 同社 中央研究所 第4部主任研究員
 昭和60年2月 同社 中央研究所 主管研究員
 昭和60年4月 同社 基礎研究所 主管研究員
 平成元年10月 新技術事業団
 「位相情報プロジェクト」総括責任者兼任
 平成2年8月 同社 基礎研究所 主管研究員
 現在に至る
 経歴 入社以来、一貫して電子線装置の開発および応用研究に従事、
 電子線エネルギー損失、電界放射型電子銃の開発を経て、昭和
 49年から本格的に電子線の干渉性を利用した電子線ホログ

ラフィーの研究に従事、現在に至る
 学位 昭和50年3月 工学博士
 「電子線ホログラフィーに関する研究」
 名古屋大学
 賞罰 昭和44年5月 山下賞 日本電子顕微鏡学会
 昭和55年4月 光学論文賞 応用物理学会
 昭和55年5月 瀬藤賞 日本電子顕微鏡学会
 昭和56年4月 金属組織写真賞 日本金属学会
 昭和57年12月 仁科記念賞 仁科記念財団
 昭和59年4月 研究功績者表彰 科学技術庁
 昭和62年1月 朝日賞 朝日新聞社
 平成3年6月 学士院賞 日本学士院
 恩賜賞
 学会活動 Advisory Editorial Board: Ultramicroscopy
 日本電子顕微鏡学会 評議員

私のアイディア・工夫・失敗談

Lounge

既存の材料の特性の向上や新機能の開発は、工業の進歩、発展には不可欠なテーマであり、産業界すべての分野でその挑戦が繰り返されている。材料に定められた特性を持たせるためにはいくつもの複雑な工程が必要であり、それらの工程が設計どおりの成果をもたらしているかどうかは綿密に調べられる。そのようなニーズ、すなわち、さまざまな状態の、さまざまな材料の構造や組成を調べるために、これまたさまざまな分析装置が開発され、利用されている。TEM（透過電子顕微鏡）もそのひとつである。TEMは、物質の内部構造を直接観察できるという点で他の分析装置と一線を画しているが、最近では容易に原子レベルの観察ができるまでにその性能が向上している。一方、先端材料をはじめとする新素材の製造技術は、今や一原子層の制御ができるほどにその緻（ち）密さが増している。そのような材料の評価には、当然TEMでの観察は不可欠となる。また、その観察を行うための試料前処理法も年々改良が加えられ、最近ではほとんどの工業材料の微細構造が明らかにされている。しかし、そのような観察から得られる情報は、あくまでもある工程を経た材料の、言わば完了形の構造であって、どのような構造または組成の変化を経て、

1,400℃における原子の世界

(材料研究における透過電子顕微鏡)

その材料が形成されたかは知ることにはできない。もちろん、綿密な計算のもとに工程が組まれているわけであり、結果が設計値どおりであれば、設計者が頭に描いたとおりの物理現象がその工程で起こったと解釈できるわけで、とりわけそこに、細かくせんさくする必要はないかもしれない。しかし、例えばさらにその材料の機能を向上させようとするとは違ってくる。すなわち、それぞれの製造工程での材料の変化をより正確に把握する必要が生じてくる。それでもできれば、物質の最小ユニットである原子レベルで。しかし、TEMを反応層の中に持ち込むわけにはいかない。それならいっそのこと、電子顕微鏡のなかで材料の処理をしながら原子レベルの解析を行ったらどうだろう。この考えから生まれたのが、最近われわれが取り組んでいる直接加熱型高分解能試料加熱ホルダである。試料を高い温度に加熱しても電子顕微鏡内部の部品に悪影響を与えないよう、その容積を小さくし、また、高温加熱状態でも原子レベルの高分解能透過像観察が行えるよう、電源として最も安定度の高い乾電池を用いているのがその特徴である。ヒータであるワイヤに直接に試料を付着させて加熱する方式のため、試料の形状は限定されるが、世は正にナノコンポジットの時代、エンジニアリングセラミックスをはじめ、い

ろいろな新材料の合成と、その場観察に威力を発揮し始めている。写真は、そのホルダを用いて、融点(1,414℃)直下の1,400℃に加熱したSi単結晶の高分解能透過像である。結晶が融解する直前に発生するひずみ(大きい矢印)、局所的な配列の乱れ(小さい矢印)などが如実に観察された例である(H-9000NAR型300kV分析電子顕微鏡を用い、加速電圧300kV、直接倍率40万倍で撮影)。ちなみに、写真中に見られる結晶格子像は、0.314nmと0.192nmの間隔のものである。宇宙での新素材開発が真剣に検討される世の中になってきているが、まだまだ地上に存在する技術にも工夫と発想の転換が必要であるという話である。

(上野武夫 記)

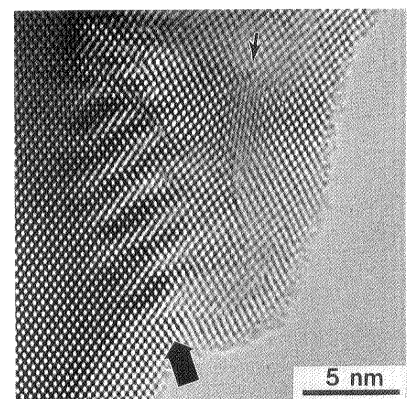


図1 1,400℃に加熱され、融解寸前のSi単結晶の高分解能透過像

報 文

電子顕微鏡による臨床診断

Clinical Diagnosis and Electron Microscopy

福田 覚* 日野 治子** 木村 健二郎*** 別所 文雄****

(平成5年3月31日受理)

1. はじめに

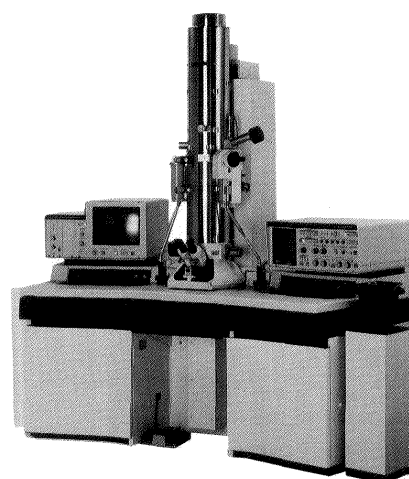
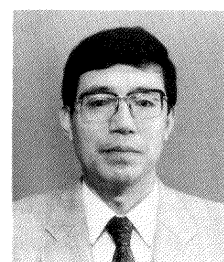
現在、一般的には、臨床診断は光学顕微鏡（以下、光顕と略す）で確定診断をつけており、電子顕微鏡（以下、電顕と略す）は補助的である。学会発表やClinical conferenceでも同様である。しかし、近年、細胞内小器官の変化や細菌、ウイルス感染と細胞内病変については電顕所見によらなければならない事が多くなってきた。事実、光顕では診断がつかなかったものが、電顕によってはじめて確定診断をつけることができた症例が報告されている。町並ら¹⁾は「病理組織診断における電顕の有用性（病理と臨床vol.10 臨時増刊号）」を発表し、電顕の検索が実際どのように病理組織学的診断に役立つかとまとめており、鑑別診断について検討し、病理組織診断における電顕の有用性について述べている。柳原ら²⁾は頭部にドーム状に隆起する腫瘍について、細胞内小器官の変化より、横紋筋肉腫と診断した1例を報告している。そして、皮膚との癒着がないことから転移性腫瘍と原発性悪性軟部腫瘍との鑑別診断を行い、電顕により、腫瘍細胞の細胞質に細線維がZ-bandsを作っている所見から横紋筋肉腫と診断することができた。また、光顕による病理組織学図譜は数多く出版されているが、電顕による病理組織学図譜はまだ少ない。

本報では、東大病院電子顕微鏡室において扱った症例の中で、光顕では診断がつかず、電顕により初めて確定診断ができた症例のいくつかを述べ、今後、電顕が臨床診断に大いに利用されることを期待するものである。

2. 標本の作成法

材料は臨床生検、手術材料、末梢血液、骨髓血である。

摘出された手術材料、臨床生検材料は直ちにKarnovskyの固定液（2.5% glutaraldehyde, 2.0% paraformaldehyde, 0.1M 燐酸緩衝液 pH7.0の混合固定液）で固定しながら1mm³の大きさに細切した。血液材料はヘパリンを加えて採取後遠心し、血漿を除去後、固定液を重層した。その後、4℃で3～6時間固定した。同じ緩衝液で簡単に洗い、1% 四酸化オスミウム（同緩衝液）で4℃、2時間固定した。その後アルコール上昇系列で脱水し、propylene oxideを通した。Epon812に包埋し、薄切後、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し、日立H-700形および日立H-7000形電顕で観察



H-7000形日立電子顕微鏡

した。また、電顕的細胞化学については、Besshoら³⁾の方法で行った。この場合、電子染色はクエン酸鉛の単染色を行い観察した。

3. 臨床

3. 1 皮膚科領域における電顕による臨床診断

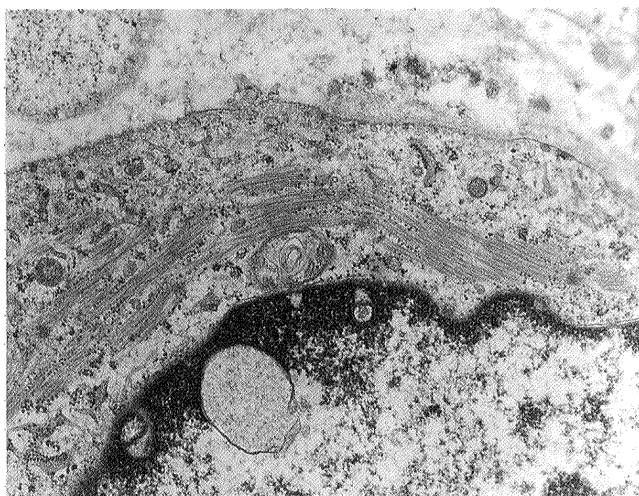
皮膚科においては、その診断に光顕、蛍光・酵素抗体法

* 東京大学 医学部 附属病院 電子顕微鏡室 室長 医博

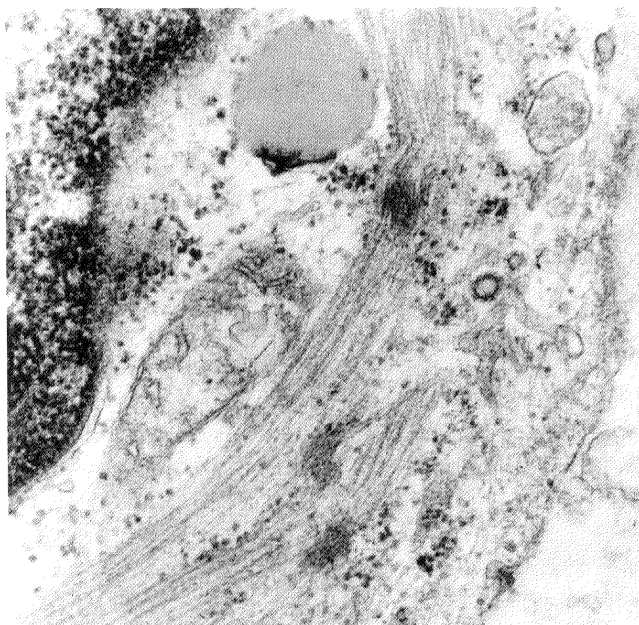
** 関東中央病院 皮膚科 部長 医博

*** 東京大学 医学部 第二内科 助手 医博

**** 東京大学 医学部 小児科 助教授 医博



(a) 横紋筋肉腫



(b) 横紋筋肉腫

図1 胞体内に細線維束およびZ帯を認める。

以上に電顕を必要とすることが多い。

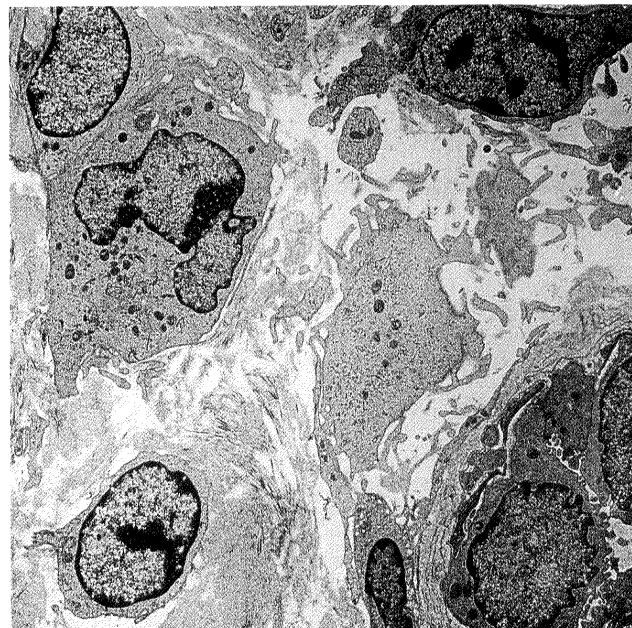
最近経験した数例を挙げてみる。

(1) 横紋筋肉腫

22歳，女性 主訴；右側頭部腫瘍

急激に腫大してきたこと，所属リンパ節を触知したことなどから，その臨床像と併せ，悪性リンパ腫，悪性線維性組織球腫，横紋筋肉腫等を疑った。手術時摘出した腫瘍の組織検査では，大型の悪性度の高い腫瘍細胞であり，通常的光顕では腫瘍名を同定するのは困難であったが，電顕で，腫瘍細胞の胞体内に細線維束およびZ帯を認め，酵素抗体法の結果と併せ，胞巣型横紋筋肉腫と診断した〔図1 (a)，(b)〕。

(2) Histiocytosis-X



(a) Histiocytosis-X



(b) Histiocytosis-X

図2 真皮上層の組織球系浸潤細胞

生後6か月の男児 主訴；体幹の粟粒大の小丘疹
単なる乳児湿疹にしては，僅かながら浸潤をふれ，痒痒もないため，生検した。光顕で，真皮乳頭層に組織球系の細胞を認めたため，電顕で観察した。出現している組織球系の細胞は，胞体が豊富で，その胞体内に多数のBirbeck顆粒を見いだしたことから，Langerhans cellと判明し，本患者をHistiocytosis-Xと診断し得た〔図2 (a)，(b)〕。

(3) Disseminated xanthoma

53歳，女性 主訴；全身の丘疹

14～15年前から顔面，掌蹠をのぞくほぼ全身に，爪甲大

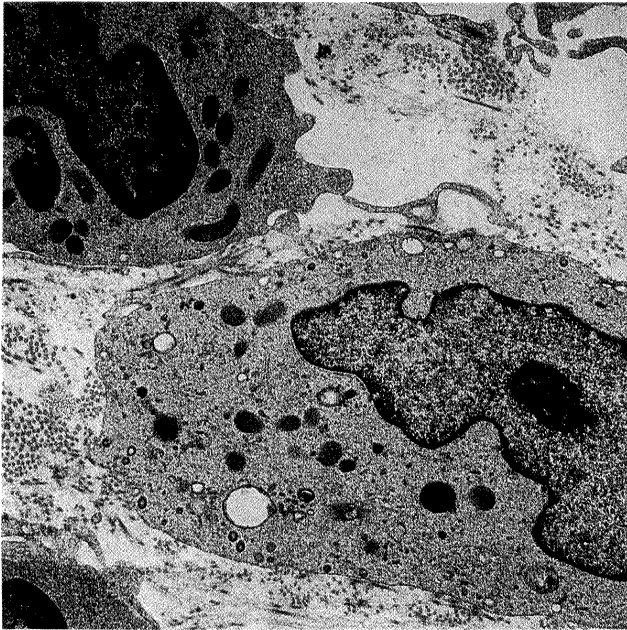


図3 組織球系浸潤細胞
胞体内に小空胞を認めるがBirbeck顆粒は見られない。

までの褐色の小丘疹が多発し、増加してきた。

臨床像だけでは診断できず、皮膚の生検をした。光顕では、組織球系の細胞であることまではわかったが、詳細は不明なので、電顕で観察してみたところ、確かに組織球系の細胞であるが、胞体内に、Birbeck顆粒は見られず、小空胞などの細胞内小器官のみであった。この電顕所見などから、本患者をdisseminated xanthomaと診断した〔図3〕。

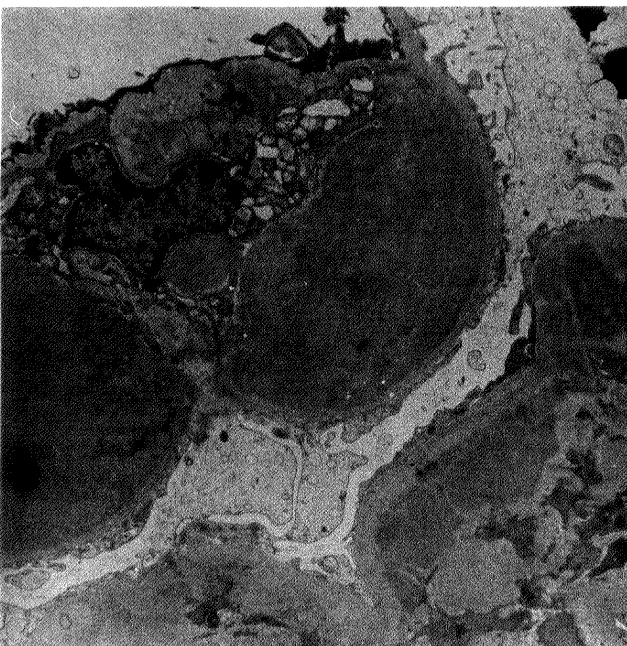


図4 (a) IgA腎症 メサンギウム領域に巨大半球状の沈着物を認める。

これらの例はもちろんであるが、水疱症、例えば、epidermolysis bullosaやpemphigus類は、電顕がなくては診断し得ない。また、Merkel cell tumorは、電顕で、腫瘍細胞内に特徴的なcored vesiclesを認めることがその診断に必須である。このように、皮膚科学における電顕の役割は欠くべからざるものである。

3. 2 腎疾患における電顕による臨床診断

一般に、腎生検においては光顕、免疫組織化学（蛍光抗体法、酵素抗体法など）、および電顕の3者がそろって初めて確定診断を得ることが出来る。光顕と免疫組織化学の2つでおおよその診断を得ることが出来る場合も、電顕により診断を確定することが出来る。また、光顕と免疫組織化学の2者では確定診断を得ることが困難で電顕所見により確定診断を得る場合や予後をより適切に予測することができる場合もある。さらに、電顕はその腎疾患の病態を理解する上で極めて有用である。

このように電顕は腎疾患の臨床診断上極めて重要であるが、以下に具体的に腎生検診断における電顕の役割を述べる。

(1) IgA腎症

IgA腎症の診断はメサンギウム領域にIgA優位の沈着を免疫組織化学で証明することにより得られる。電顕ではそのIgA沈着に相当する高電子密度（electron dense deposits）の沈着物をメサンギウム領域に証明することによりその診断をより確実なものとする事が出来る〔図4 (a)〕。また、電顕により高電子密度の沈着物がメサンギウム領域のみではなく内皮下にも見られるかどうかは予後を推測する上で極めて重要な所見である。免疫組織化学ではそこまでの細かい所見を得ることはしばしば困難である。最近経験した顕微鏡的血尿のみの症例では光顕では糸球体微小変化、免疫組織化学でもIgAのみわずかにメサンギウム領域に見られ、IgA腎症の確定診断には至らなかった。電顕では高電子密度の沈着物をメサンギウム領域に認め〔図4 (b)〕、3者の所見を併せてIgA腎症の確定診断を得ることが出来た。



図4 (b) IgA腎症 メサンギウムにわずかな沈着物を認める。



図5 膜性腎症Ⅱ期
上皮側の沈着物をとりかこむように基底膜が刺状に突出してきている。

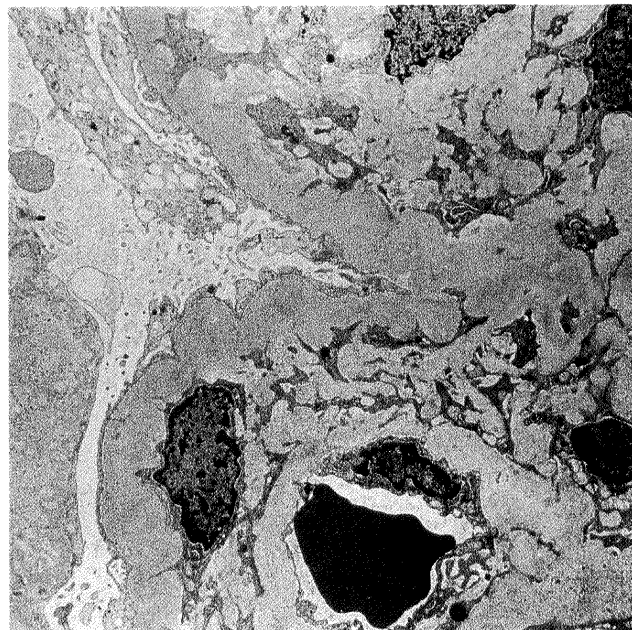


図7 膜性増殖性糸球体腎炎
メサンギウム細胞が糸球体係蹄の方へ侵入し、基底膜と内皮の間に入り込む。新たな基底膜が作られ、光顕上基底膜の二重化として認められる。

(2) 膜性腎症

膜性腎症では病期が進めば糸球体基底膜の変化が強くなり、光顕のみでも診断がつく場合が多い。しかし、初期のものはほとんど変化がなく光顕上、微小変化群との鑑別診断に苦慮する場合が多い。この場合、免疫組織化学が診断上有用であるが、沈着がごく軽度の場合もあり確定診断を得るには電顕が必須となる。電顕で高電子密度の沈着物を

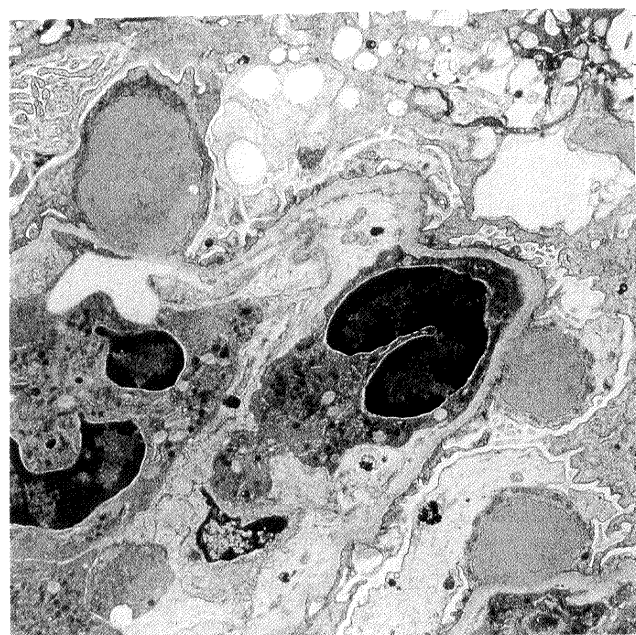


図6 溶連菌感染後急性糸球体腎炎
基底膜上皮側に巨大な沈着物(hump)を認める。

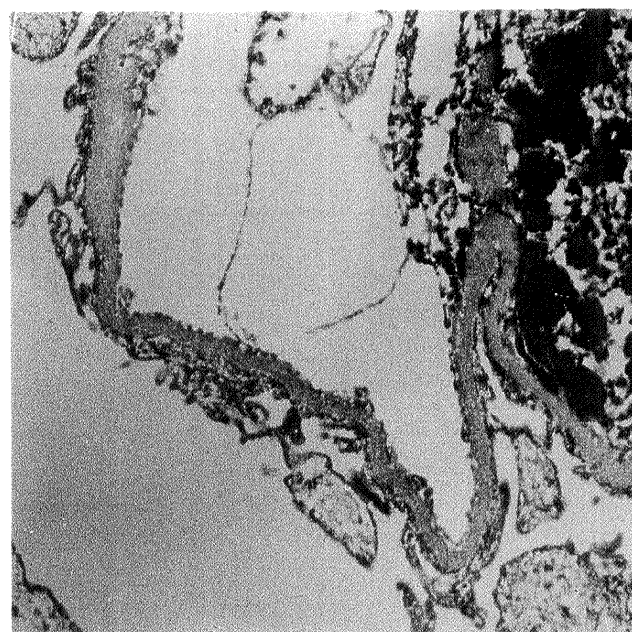


図8 Alport症候群
糸球体基底膜が薄くなり、また、部分的に層状になっている。

上皮下に認めれば確定診断に至る〔図5〕。

(3) 溶連菌感染後急性糸球体腎炎

これは光顕上、管内増殖性腎炎の像で、免疫組織化学的には免疫グロブリンや補体の顆粒状の沈着を糸球体係蹄やメサンギウム領域に認めるが、確定診断に至る特徴的な所見は得られない。電顕にて上皮下に巨大な半球状の高電子

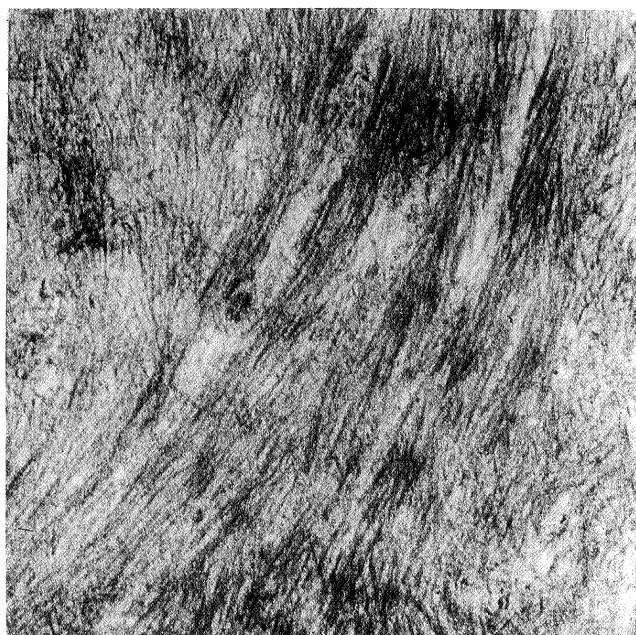


図9 (a) 糸球体メサンギウムに沈着したアミロイド細線維

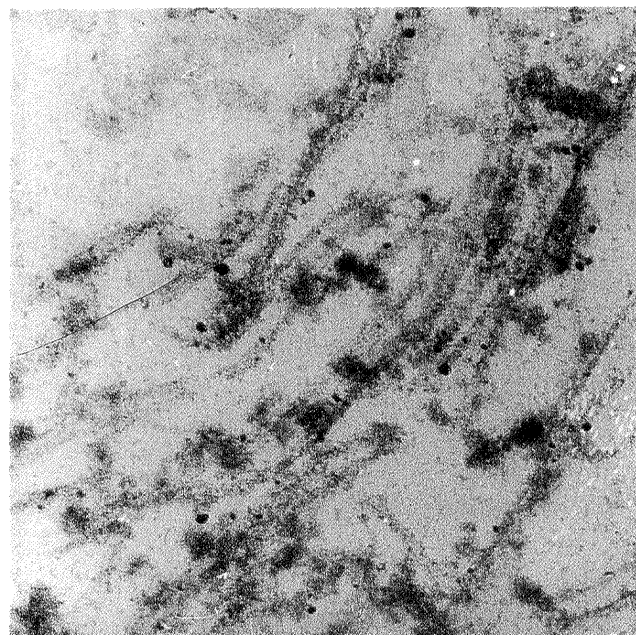


図9 (b) 尿中のアミロイド細線維

密度の沈着物 (hump) を見いだせば〔図6〕本疾患の確定診断とすることが出来る。この場合電顕が極めて診断上重要な役割を持つ。

(4) 膜性増殖性糸球体腎炎

この腎炎はメサンギウム細胞の増殖と糸球体係蹄壁への進入 (mesangial interposition) により特徴付けられる。そのため糸球体基底膜の二重化が見られる。免疫組織化学的には特徴的な所見はない。そのためやはり電顕によりメサンギウム細胞の糸球体係蹄壁への進入と糸球体基底膜の二重化を証明する必要がある〔図7〕。

(5) 遺伝性腎炎

これは光顕的には様々な程度のメサンギウム細胞の増殖と硬化性病変が見られ、免疫組織化学ではほとんど免疫グロブリンや補体の沈着を認めない。確定診断を得るためには電顕で糸球体基底膜が薄くなったり、層状になっていることを見いだすことが必要である〔図8〕。この腎炎の診断にも電顕は非常に重要な役割を演ずる。

(6) アミロイドーシス

進行したアミロイドーシスでは光顕上、特異的な沈着物を糸球体係蹄や血管壁に認め、アミロイドーシスを疑うことは容易である。アミロイドーシスを疑った場合には、コンゴレッド染色、あるいはアミロイドA蛋白などを染めて組織化学的検討により診断に至る。しかし、この場合でも電顕でアミロイド細線維を証明することが診断をより確実なものとする〔図9 (a)〕。また、初期のものではアミロイドーシスの特異的な所見は光顕あるいは組織化学で得られ難く、この場合には電顕によるアミロイド細線維の証明が唯一の診断手段となる。さらに、全身状態が悪く腎生検を施行しえない患者では尿の沈渣を電顕で観察しアミロイド細線維を見だし〔図9 (b)〕、腎アミロイドーシスの診断を得

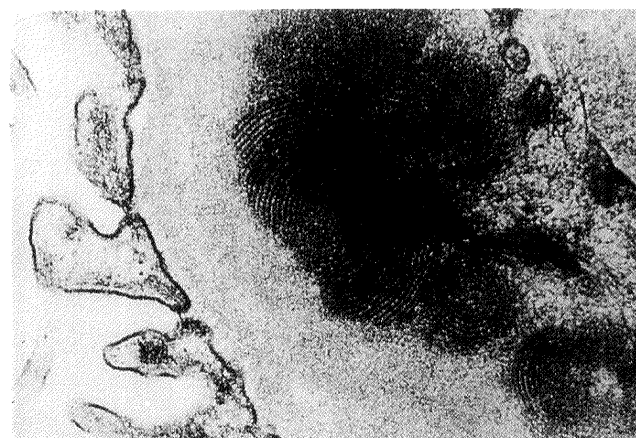


図10 ループス腎炎に認められたfinger print(指紋)deposit.

る場合もある。図9 (b)の症例は後の剖検で腎アミロイドーシスの診断を得ている。

(7) ループス腎炎

ループス腎炎は全身性エリテマトーデスにともなう腎炎で多彩な病像を呈する。電顕でも高電子密度の沈着物が多彩に見られる。ループス腎炎は臨床的に全身性エリテマトーデスの診断を得て初めて診断しうるものである。しかし、finger print depositsとよばれる指紋状の模様のある高電子密度の沈着物〔図10〕は比較的特徴的といってもよく、この沈着物を見いだせばループス腎炎がかなり強く示唆される。われわれはループス腎炎の重症度とこのfinger print depositsに密接な関係を見だし報告している。この腎炎の診断や病態の把握にも電顕は必須である。



図11 横紋筋肉腫細胞
細胞質内にZ帯を有する筋原線維の束が多数認められる (矢印)。

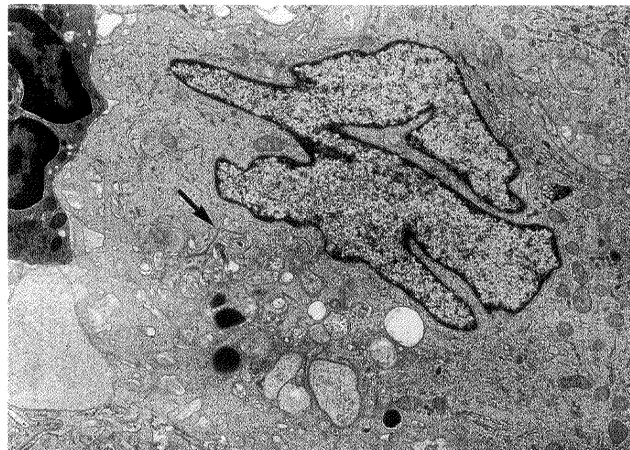


図13 Langerhans cell histiocytosisの症例の組織球。
枝分れたBirbeck顆粒(矢印)が特徴である。

3. 3 小児科領域における電顕による臨床診断

いわゆるsmall round cell sarcomaには、神経芽腫、その他の神経原性未熟腫瘍、Ewing肉腫、横紋筋肉腫、悪性リンパ腫などがあるが、その治療はそれらのどれかによって全く異なる。相互の鑑別診断には電顕による検索が必須ないしは最も有用である。現在では様々なmonoclonal antibodiesもこの用に供されているが、特異的な超微形態学的特徴はより鋭敏でかつ特異的である。特に、僅かな検体しか得られない場合のその有用性は際だっており、それによる検索は必須といえることができる。

(1) 横紋筋肉腫

図11は光顕的にsmall round cell sarcomaとされた腫瘍の電顕像であるが、細胞質内のZ-bandsを有する特異的なfilaments (矢印) により横紋筋肉腫と診断される。

(2) 神経芽腫

図12は、small round cell sarcomaの一種である神経芽腫細胞の一部であるが、骨髓穿刺吸引により得られた試料を電顕によって観察し、特異な神経分泌顆粒 (矢印)、神経

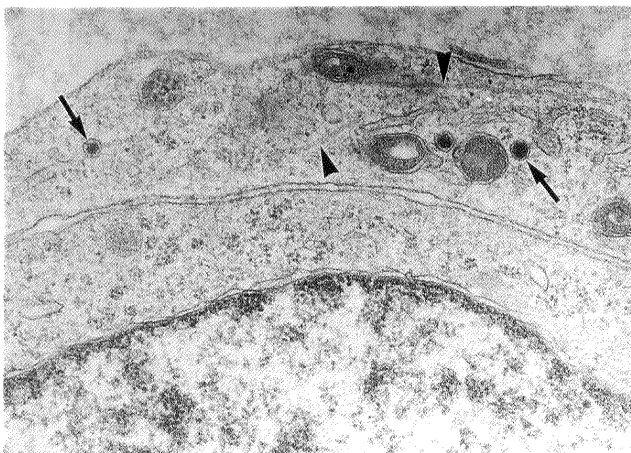


図12 骨髓中の神経芽腫細胞
二細胞が接しているが、その一つの細胞に神経分泌顆粒(矢印)、神経細管(矢印)が認められる。

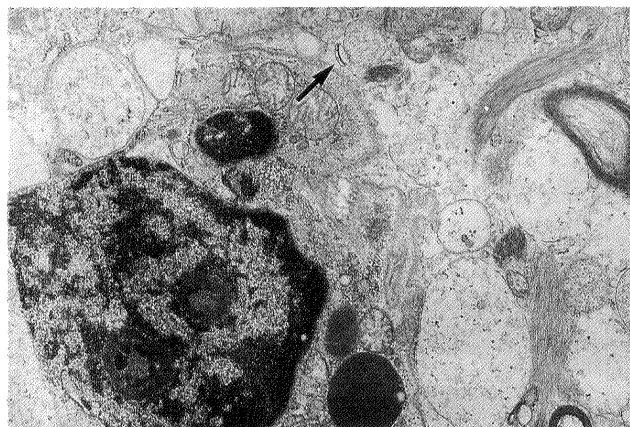


図14 小脳症状を示したLangerhans cell histiocytosisの小脳生検材料にみられたBirbeck顆粒(矢印)。

細管 (neurotubules) (矢印) を証明することにより神経芽腫の診断を得ることが出来た1例である。この例では、初診時すでに骨髓転移による骨髓抑制状態にあり、開腹生検は危険であったが、骨髓穿刺吸引によって得られた試料の電顕による観察により、危険を伴う開腹術を避けることが出来たものであり、この点からもこの症例は電顕による検索の有用性を示す好例といえる。

(3) Langerhans cell histiocytosis

図13は、前胸部正中部に出来た胸骨に達する潰瘍部組織の細胞の電顕像であるが、特異な5層構造を有するBirbeck顆粒がみられ (矢印)、これによりLangerhans cell histiocytosis (LCH) の診断がなされた。LCHの診断確定には、凍結組織を用いてCD1(OKT6)陽性細胞を証明するか電顕によりBirbeck顆粒を証明することが必須である。図14は、LCHの患者が小脳性失調を呈したために小脳の生検を行い得られた試料の電顕像であるが、Birbeck顆粒 (矢印) を認めることによりLangerhans cellの小脳浸潤と診断し得た。この例では光顕レベルでの様々な検索を行うには試料



図15 骨髓線維症から白血病化した例の末梢血中に認められた巨核芽球。血小板ペルオキシダーゼ反応を行ったもの、反応産物が核膜腔(矢印), 粗面小胞体(矢尻)に認められる(鉛単独染色)。

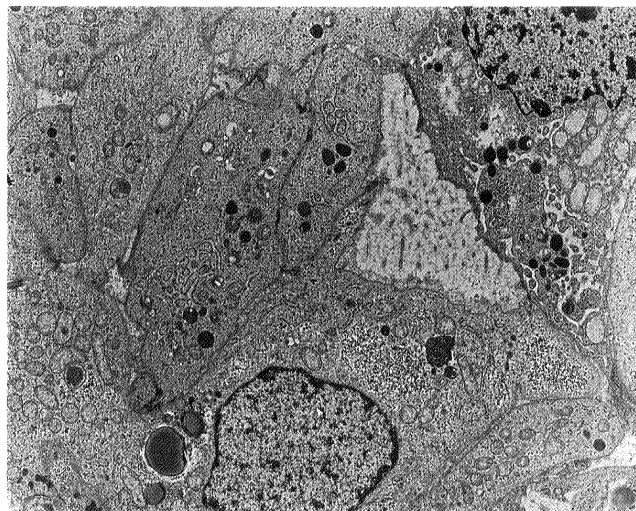


図17 未分化肺腫瘍

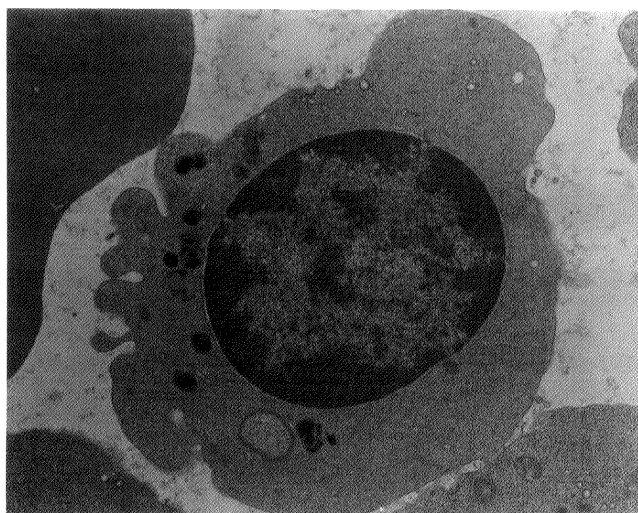


図16 骨髓赤芽球

が少なく、電顕による検索がなければ診断し得なかった例である。

(4) 巨核芽球性白血病

図15は、電顕細胞化学により血小板ペルオキシダーゼを証明した像である。DAB反応の特異な分布〔反応産物が粗面小胞体(矢尻)、核膜腔(矢印)に陽性で、Golgi装置(矢印)で陰性〕により巨核芽球と判定され、巨核芽球性白血病と診断された例である。この型の白血病の診断には、monoclonal抗体により血小板関連抗原を証明することと並んで電顕細胞化学により血小板ペルオキシダーゼを証明することが必須である。

原因不明の貧血例の骨髓赤芽球に、ミトコンドリア内鉄沈着〔図16〕を認め、不応性貧血であることの診断を得た。又、小児の肺腺癌は極めて稀であるが、未分化肺腫瘍に、microvilliを伴った腺腔様構造およびデスモソーム様細胞接着装置〔図17〕を認めたことにより、このような診断を下

すことができた例がある。先天性赤芽球異形成症候群2型(congenital dyserythropoiesis type II)では、電顕上赤芽球の細胞膜に平行に走る小胞体がdouble membrane構造を作ることが特徴で、この型の診断のために有力な所見となる。

4. 病理組織材料と人工産物

電顕による病理組織診断は光顕による病理組織診断の補助として使われることが多い。しかしながら、電顕でなければ診断がつけられないものも報告されるようになった。例えば、平滑筋肉腫⁶⁾、横紋筋肉腫^{2) 5)}、ランゲルハンス細胞組織球症(Langerhans cell histiocytosis)、Fabry病、溶連菌感染後急性糸球体腎炎⁴⁾、ウイルス感染症など数多くの報告がある。その他、特殊なものとして、電顕と分析装置を組合せたX線マイクロアナライザーを使い、ウイルソン病や硅肺症のような、組織細胞内に取込まれた沈着物が直ちに決定され確定診断となるものもある。

このような病理組織材料を電顕によって観察するには、電顕標本作製を行わなければならない。周知のことではあるが、透過型電顕用、走査型電顕用、分析電顕用とそれぞれ異なった標本作製を必要とする。生検材料や手術材料は採取してから固定するまで多少の時間がかかる。これは人の材料を取扱うのであるからどうしても避けられない。材料の採取、細切には機械的に押潰さないように丁寧に扱い、できるだけ早く浸漬固定を行う。採取してから時間が過ぎれば、血液の遮断による組織細胞の自己融解が起き、細胞の微細形態の変化が起きてしまう。できれば水などを用意しておき、冷やしながら固定し細切の方がより新鮮標本に近くなる。良い電顕写真を撮るには固定という操作が大切だからである。生検、手術材料の電顕による診断は病変部を観察することであるから、正常な組織細胞の形態はどのようになっているかを知っておくことも重要である。臨床診断において、いくつかあげた例のように、細胞内小器官の形態を観察するには電顕が使われる。そして、電顕による形態変化の観察が臨床診断の決め手となる。固定後

043-2 病理組織顕微鏡検査 (1臓器につき)	800点
注1. 検査に当たって、3臓器以上の検査を行った場合は、3臓器を限度として算定する。	
注2. 検査に当たって、電子顕微鏡による検査又は免疫抗体法を用いた検査を行った場合は、所定点数にそれぞれ1,200点又は300点を加算する。	
注3. リンパ節については、所属リンパ節ごとに1臓器として数える。	
注4. 当該保険医療機関以外の医療機関で作製した組織標本を診断した場合は、1件につき200点とする。	
→注「2」について	
病理組織顕微鏡検査の注「2」の電子顕微鏡検査を行った場合の加算は、腎組織、甲状腺腫を除く内分泌臓器の機能性腫瘍、異所性ホルモン産生腫瘍、軟部組織悪性腫瘍、ゴーシェ病等の脂質蓄積症、多糖体蓄積症及び心筋症に対する心筋生検である。また、免疫抗体法を行った場合の加算は、方法(蛍光抗体法、酵素抗体法)、試薬の種類の場合を問わず1臓器につき1回のみ算定する。	
(61.2.18, 保険発11・63.3.19, 保険発21)	

図18 病理組織顕微鏡検査料

の操作は省略することにして、電顕により病理材料を観察する場合、もう一つ大切なものに人工産物がある。これには細胞膜の破壊、基質の欠損、細胞内小器官の変形など様々なものがある。病理材料は病的な変性や変化を既に持っている。得られた電顕所見が正しいものであるかどうかは常に注意しておかねばならない。人工産物の問題は材料を固定するところから始まっている。その要素には固定液の濃度、固定時間、固定液の種類、緩衝液のpHなどがあり、電顕所見が大きく変わってくる。しかし、これらをroutineにしておけば、病変か人工産物かの判別はつけられるので、それほど心配しなくてもよいと思われる。電顕写真を撮り、電顕所見を得るためには人工産物の極めて少ない試料作製技術の熟練が大切である。

5. 電顕検査による保険点数

電顕による検査を行った場合、保険点数が何点になるかは治療基準早見表⁷⁾に掲載されている(これは年度により変更されることがあるので注意する)。図18は病理組織顕微鏡検査の一部を抜粋したものである。これによると、病理組織顕微鏡検査を行い、電顕検査を行えば800点に1,200点が加算され2,000点となる。また図19は診断穿刺、検体採取料の一部を抜粋したものである。右側の診料点数は穿刺料、採取料であるから、臓器を穿刺あるいは採取し、電顕検査を行えば1,200点が加算された点数が請求できることになる。電顕による検査が必要かどうかは受持医が決めることになるが、患者の負担を考えれば光顕で診断が困難であるものだけでも電顕による検査を行うことが適当であると考ええる。

6. おわりに

東大病院電顕室で扱った症例のうち、電顕による検査で診断ができた例を挙げた。電顕がもっと普及し、臨床研究が進んでくるとこのようなものが増えてくると思われる。

また、この他にも心臓病、肝臓病、消化器病、整形外科領域の病気など、臨床に電顕を応用できるものがたくさんあるとの信念を持っている。医学の進歩とともに、電顕を臨床に使うことによって治療の方針も決められるという時代になっている。多くの病院で電顕を使い保険診療をしてもらいたいと願うものである。

091 脳室穿刺	250点
注 6歳未満の乳児の場合は、25点を加算する。	
091-2 後頭下穿刺	180点
注 6歳未満の乳幼児の場合は、25点を加算する。	
091-3 腰椎穿刺(脳脊髄圧測定を含む)	120点
注 6歳未満の乳幼児の場合は、25点を加算する。	
091-4 骨髄穿刺	
1. 胸骨	70点
2. その他	80点
091-5 関節穿刺	50点
091-6 上顎洞穿刺(片側)	50点
091-7 腎嚢胞又は水腎症穿刺	230点
注 6歳未満の乳幼児の場合は、25点を加算する。	
091-8 ダグラス窩穿刺	230点
091-9 リンパ節等穿刺又は針生検	120点
091-10 乳腺穿刺又は針生検(片側)	120点
091-11 甲状腺穿刺又は針生検	130点
092 経皮的針生検法(透視、心電図検査及び超音波検査を含む)	800点
092-2 前立腺針生検法	200点
093 内視鏡下生検法(1臓器につき)	200点
093-2 経気管肺生検法	3,000点
094 臓器穿刺、組織採取	
1. 開胸によるもの	6,500点
2. 開腹によるもの(腎を含む)	4,000点
注 6歳未満の乳幼児の場合は、750点を加算する。	
095 組織試験採取、切採法	
1. 皮膚、筋肉(皮下、筋膜、腱、腱鞘を含む)	450点
2. 骨、骨盤、脊椎	2,100点
3. 眼	
イ. 後眼部	600点
ロ. 前眼部、その他	300点
4. 耳	360点
5. 鼻、副鼻腔	330点
6. 口腔	390点
7. 咽頭、喉頭	600点
8. 甲状腺	600点
9. 乳腺	600点
10. 直腸	600点
11. 膀胱	450点
12. 睾丸・副睾丸	350点
13. 前立腺	2,800点

図19 診断穿刺、検体採取料

参考文献

- 1) 町並陸生, 泰 順一: 病理と臨床, 10 (臨時増刊号) (1992)
- 2) 柳原康章, 入江広弥, 大西善博, 荻野 智, 長村洋三, 日野治子: 皮膚臨床33 (9): 1307~1311 (1991)
- 3) Bessho, F., Hayashi, Y., Hayashi, Y., Ohga, K.: Am. J. Clin. Pathol., 89: 627~633 (1988)
- 4) Kimura, K., Takagi, M., Tashiro, T., Sugimoto, T., Ishimitsu, T., Ishii, M., and Sugimoto, T.: Japanese Journal of Nephrology 29 (9): 1167~1173 (1987)
- 5) Mierau, G. W. P. J. Berry., and Orsini, E. N.: Ultrastructural Pathology 9: 99-111 (1985)
- 6) Henderson, D. W, Papadimitriou, J. M., Coleman, M.: Ultrastructural Appearances of Tumours: 231~238 (1986)
- 7) 治療基準早見表: 平成4年4月, 標準点数と準用点数

U.D.C. [621. 385. 833. 28 : 621. 3. 0269. 1 : 537. 533. 2.] 087. 5 : 537. 533. 3. 082. 54

HF-2000形日立電界放出形電子顕微鏡による 実用電子線ホログラフィー

Practical Electron Holography on the HF-2000

D.C.Joy^{*†}, L. Allard[†], T. A. Nolan[†], X. Zhang^{*}, Y. Zhang^{*} and R. D. Bunn^{*}

1. 序 文

ホログラフィー (Gabor, 1949) は写真フィルムやテレビジョンカメラのように、強度だけに感応する記録手段で、入射する波面の振幅と位相分布の双方を符号化することを可能とする技法である。これは試料をサンプリングした可干渉照射ビームを参照波と干渉させて、干渉像またはホログラムを生成させることによって達せられる(図1)。波面はその後、次のいずれかの方法によって、どちらかと言えば物理的に再生される。別の干渉ビームをホログラムに照射することによるか、またはホログラムのデジタル化で、

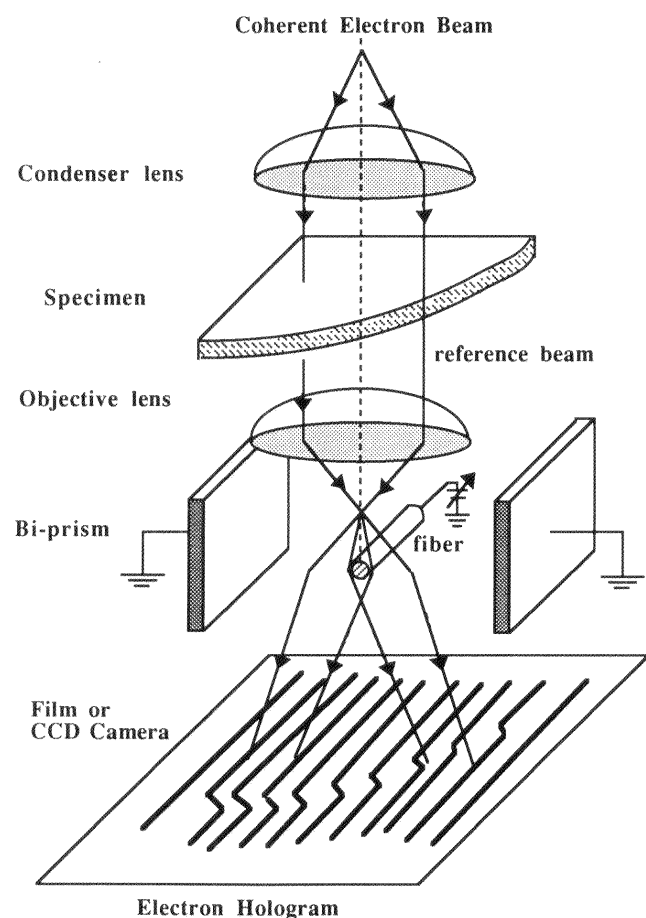
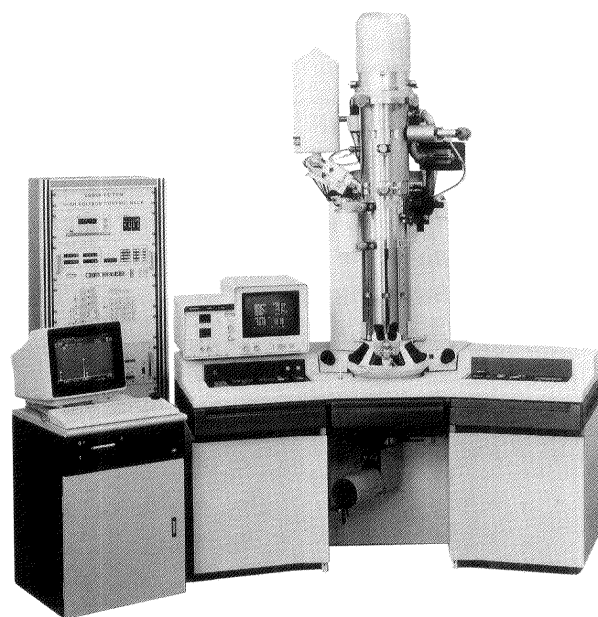


図1 電子線ホログラフィーの原理



HF-2000形日立電界放出形電子顕微鏡

数学的に等価の操作をコンピュータにさせるかのいずれかである。

ところで、ホログラフィーの最も一般的な形はレーザから得られる可視光、もしくはマイクロウェーブを用いて行われるが、Gaborの最初概念は電子ビームを用いることであつた。電子線ホログラフィーの実験はいくつか早くから行われていたけれども、(Haine and Mulvey, 1952, 日比, 1956) 電子線ホログラフィーが実用的な実現を見たのは高輝度、可干渉電子源である冷陰極電子銃の開発が行われてからのことであつた(総説 外村, 1987参照)。

日立HF-2000形は、高分解能電子線ホログラムを日常的に作ることでできる最初の商用透過電子顕微鏡である。ホログラフィーは二つの明白な理由で重要な技法であつて、理由は共にホログラムが試料を通過した電子線の波面について、可能な情報をすべて蓄えているという事実から導かれる。

最初にホログラフィーはその可能性においてTEMの分解能を高める一方法である。これは対物レンズにおいて、究極的に分解能限界を設定する球面収差が、波面の位相を変化させるが、ホログラムを再生するとき計算し補正することができるという理由から高分解能化が可能となる。第二に、波面の振幅が位相のどちらかの変化をホログラムから取り出すことができ、像形成に用いることができる。こ

* EM Facility, University of Tennessee, Knoxville, TN37996-0810, U. S. A.

† Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN37831, U. S. A.

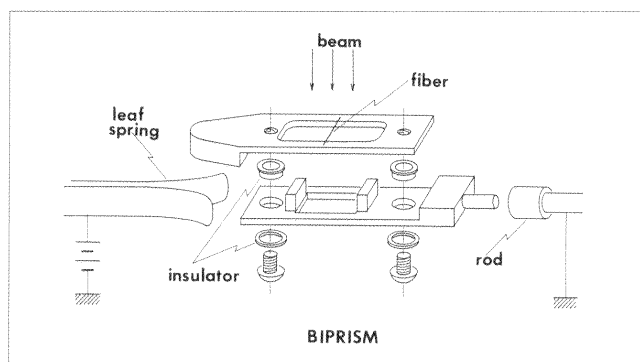


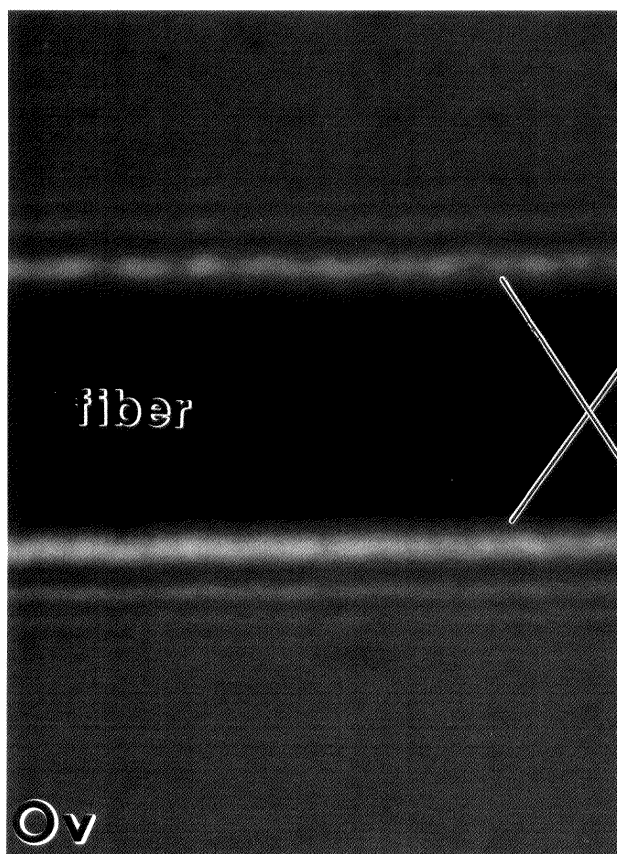
図2 バイプリズム組立部品図

のようにして薄い透明な試料や、電界または磁界によって生ずる場合のように、位相変化が弱いときに像を強く焦点外れにすることによってだけ観察される従来のTEMと違って、電子線ホログラムから再生された像の中の位相の情報は正焦点位置で高いコントラストで見ることができる。

2. 装置の必要条件

電子線ホログラフィーに対する基本的必要条件は可干渉

な電子ビーム、すなわちその波面にわたって位相関係が固定されたビームと、電子ビームの透過、および参照波部分を干渉させてホログラムを作成するためのバイプリズムである。原理的にはどのような電子ビームでも照射角を $2 \sim 3 \mu\text{rad}$ にしてビームを平行照射することによって十分可干渉にすることができる。ところが従来の熱電子照射を用いた場合、この程度の平行度を持たせるために電子ビームを広げると満足な作動を行わせるには入射電流が小さくなり過ぎる。これに代わってFEG (冷陰極電子銃) が用いられなければならない。FEGは小さな電子源でエネルギー分散が低く、しかも非常に輝度が高い。これらの特性は、顕微鏡内に適正に設計された照射系に装着されたとき、試料面上で何百オングストロームにわたって可干渉で数秒間で撮像するに十分な高い電流密度を持ったビームを形成することができる。もう一つの重要な項目は、バイプリズム (図2) で、これは二つの接地された板の間に張られた細い繊維か



(a) ファイバに電圧を印加前

図3 バイプリズム像



(b) 印加後

ら構成され、繊維は導電性を持たせるため金またはクロムがコーティングされている。繊維はその直径が $1\ \mu\text{m}$ よりも太いものではあってはならない。そうでないと視野を多く遮ってしまう。したがって、水晶（石英）がただ一つの実用的材料である。プリズムは顕微鏡の対物レンズの下に置かれ、ビーム通路に挿入または取出しが行えて、任意の望まれる方向に平行となるよう回転できるものである。この繊維に電位を加えると、二つの対向電場が繊維のどちらの側にも生成され、参照ビームと透過ビームを交わらせる。この重複した領域に繊維に平行な縞（しま）模様が形成される。電圧を加えない繊維のシャドウイメージを図3に示す。繊維に電圧を加えると、シャドウイメージは消失して縞模様が見えてくる。縞の間隔は繊維に加えられる電圧に逆に依存し、 $100\ \text{V}$ 前後の電位に対しては典型的には $3\sim 0.5\ \text{\AA}$ の範囲である。ホログラムから再生された像で得られる空間分解能は、典型的には縞間隔の2～3倍である。

3. ホログラムの生成

ホログラムを生成する方法は通常の顕微鏡写真を撮影す

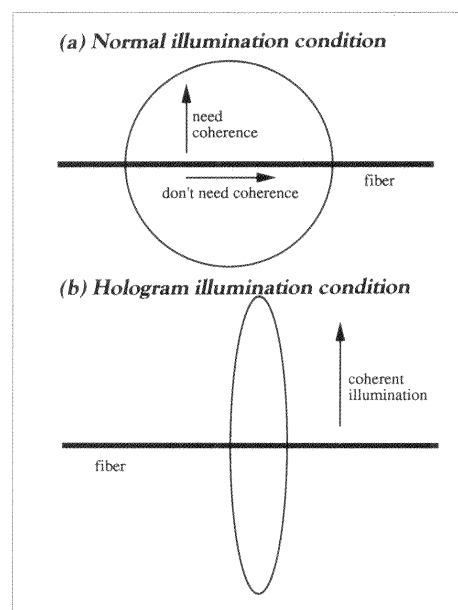


図4 ホログラフィーにおける非点強調照射条件のスケッチ

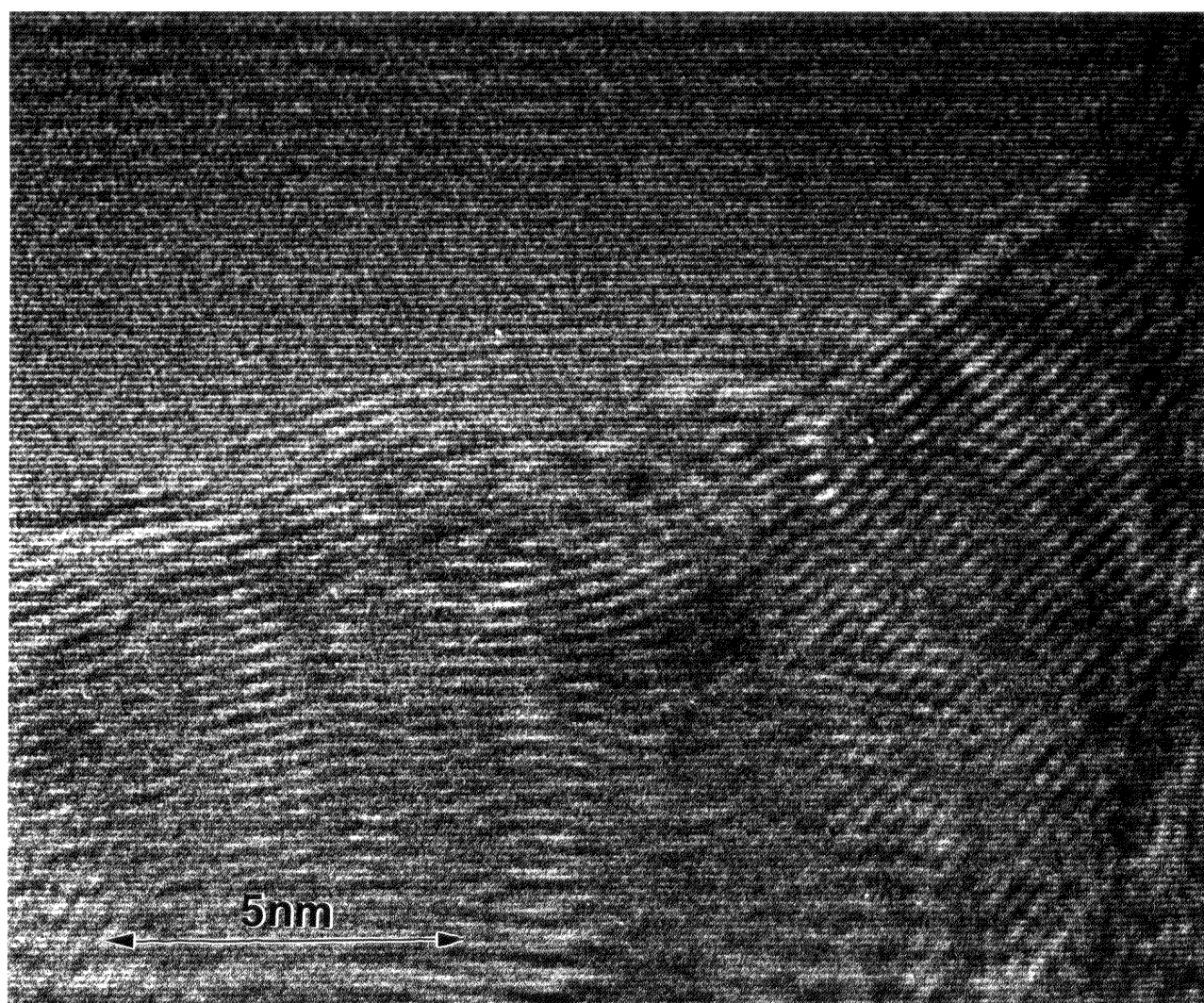


図5 カーボンブラックの高分解能電子線ホログラム

日立HF-2000を用いて 200keV の電子エネルギーと干渉縞間隔 $1\text{\AA}$ で記録されたもの。

るのとはほとんど同じである。パイプリズムを鏡体中のビーム通路から外して、望ましい試料部分を見つけて焦点合わせを行う。理想的にはこの領域は、選んだ視野を照射するビームの一部が遮られずに通れるよう、穴または縁の近くであるべきである。可干渉の領域は大きさが限られているので、通常、例えば50万倍またはそれ以上の比較的高倍率が要求される。次いでパイプリズムはビーム通路の中に挿入され、試料を一方の側に、穴を他の側に置くようにし、プリズムが穴の縁に平行になるように調節する。ファイバに電圧を加えればホログラムが形成される。

適切な結果を得るためには、通常、照射系のある注意深い調節が要求され、つまり平行照射のための適性条件を選ぶことで、可干渉性をできるだけ高くすること、像の中に最大電流を得るという双方のためにである。これは図4にスケッチしたように、コンデンサーレンズの非点収差と照射系を調整することによって、ビームがその長軸（最も可干

渉な方向）がファイバに直角に、短軸（最小可干渉方向）がファイバに平行になるように長円に伸ばされる。

縞間隔約1 Åで記録されたカーボンブラック結晶のホログラムを図5に示す。ホログラムは3.4 Åオングストローム間隔の格子面を示す通常の像に似た振幅成分と、縞間隔や方向が点から点で変化して見える縞模様の位相成分の二つのタイプの情報を含んでいる。この場合の装置の倍率は100万倍で、露出時間はKodakのAAタイプX線フィルムの上に10秒であった。

一般に、ホログラムからどんな情報を引き出すかは、後述のように光学的かまたはデジタル化のどちらかの方法で関連した像を再生することが必要である。しかし、ある特別な状況ではホログラムは直接解釈することができる。一つの例は試料が透過電子ビームの振幅に何の影響も及ぼさず（すなわち完全に透明なとき）その位相だけを変化させる場合である。この場合試料での位相分布に関する定量的

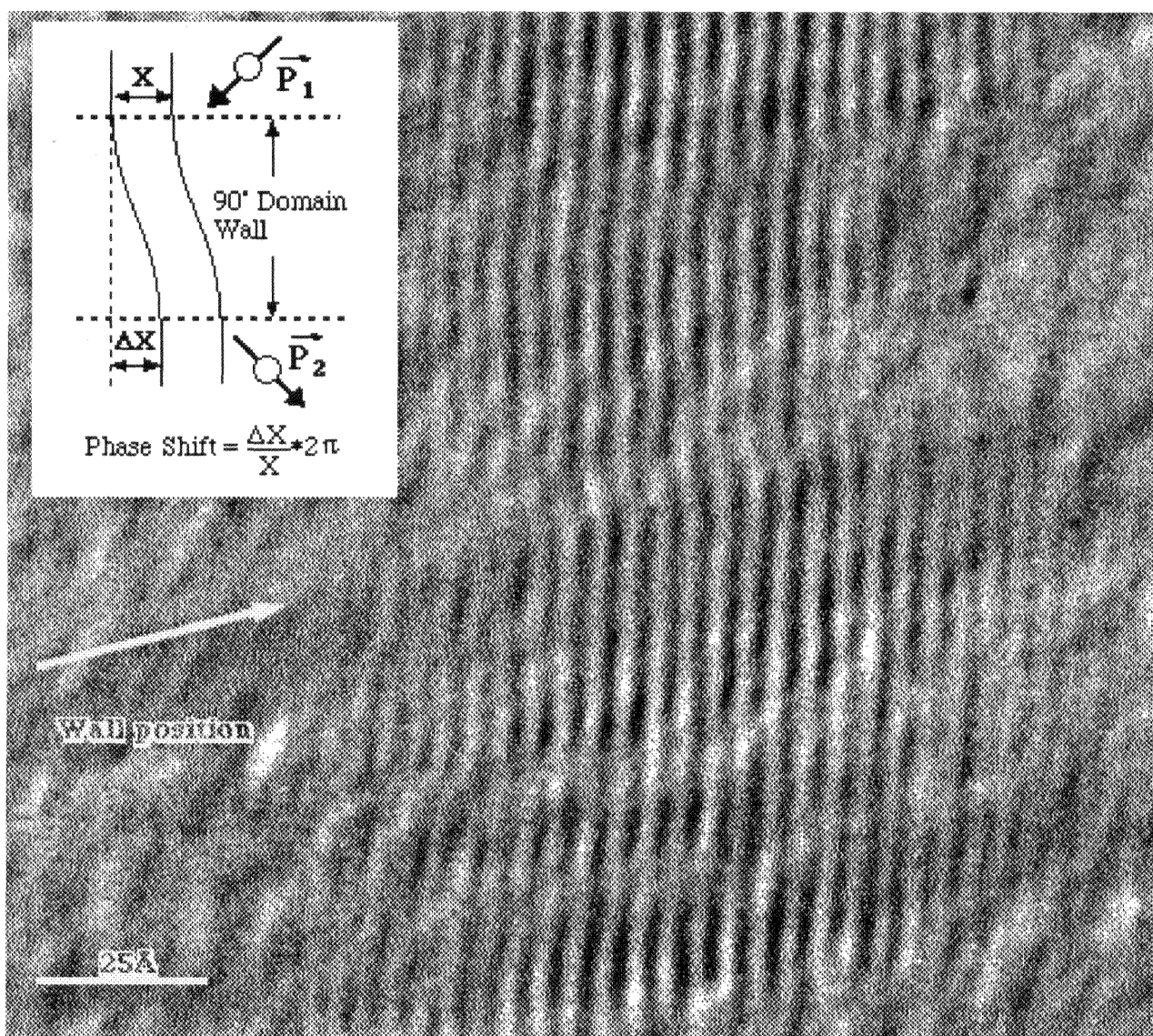


図6 チタン酸バリウムの中の90°ferroelectricドメイン壁を横切る高分解能ホログラム

情報は、縞間隔を調べることによって得られる。図6はこのように例を示し、正方晶のBaTiO₃の誘電分極の壁を横切って記録された。この物質の個々の誘電分極域の中では、分極の方向はC軸に沿っていて三つの[100]立方体軸のいずれかに平行である。こうして試料の中には90度と180度の二つの分極壁が存在し、それらの角度は境界のそれぞれの側の分極ベクトルの間の角度である。分極の方向が変わるにつれて透過電子ビームの位相ずれもまた変化するのである。こうして分極壁を横切って記録されたホログラムによって分極方向の変化を図示化することができるであろう。壁のどちらの側でも干涉縞は直線状であるが、壁の近辺では縞が曲がっているのが観察される。スケッチに示したように、もしも縞のものの位置に沿って線を延長していくと、縞の横方向のずれは、試料の異なった位置を通過した電子の位相ずれの微分に直接比例する。この位相ずれは二つの成分から成り、その一つは試料の内部電位によるもの、他の一つは誘電分極によるものである。いずれの場合にも位相ずれの総量はビームが横切る領域の厚さに依存する。観察している範囲は幅が数十オングストロームぐらいであるので、BaTiO₃の厚さは一定で、位相の変化はビームが試料を通過したときに検知した静電ポテンシャルの変化だけによるものである。分極壁の幅、すなわち誘電分極場が変化している領域は縞が見かけの壁位置を横切るとき、それぞれの縞が曲がりの始めから終わりまでを直接測定すればわかる。多くの90度壁からの測定によって壁の厚さが15~25 Åの間にあることがわかった。一つの縞の極大と次の間の位相変化は2πで、縞のずれの測定から位相変化の定量測定もまた行うことができる。こうして局部分極ベクトルの大きさを見いだすことができる。位相φと静電ポテンシャルVとの間の関係は次のように書かれる(Yanzi, 1984)。

$$\phi = \frac{\pi}{\lambda E} \int_z V dz \dots\dots\dots(1)$$

ここで、λおよびEはそれぞれ電子線の波長と加速電圧で、Zは電子の運動方向に平行である。自然発生的Vを自発分極Pに関係づけると、

$$V = \frac{\int P \cdot dz}{\epsilon_0(\epsilon - 1)} \dots\dots\dots(2)$$

となる。ここでボールド体の文字はベクトル量を示し、ε₀は自由空間の誘電率、そしてεは試料の誘電率である。こうして厚さtの箔(はく)に対しては、

$$\phi = \frac{\pi \cos \theta P t^2}{2 \lambda \epsilon_0 (\epsilon - 1)} \dots\dots\dots(3)$$

ここでθは電子ビームと分極ベクトルPの間の角度である。分極ベクトルがビームとθ₁、およびθ₂を成すような90度分極壁の場合、壁と交わる所に生ずる位相の変化の総量は、

$$\Delta \phi = \frac{\pi P t^2}{2 \lambda E \epsilon_0 (\epsilon - 1)} (\cos \theta_2 - \cos \theta_1) \quad (4)$$

となるであろう。位相変化Δφの測定はこうしてPを決定することを可能とする。例えば、図6に示したホログラム

ではビームは[111] 晶体軸に沿って進み、分極ベクトルは[100]および[001]に沿っている。するとcos θ₂=+1/√3とcos θ₁=-1/√3となり、200 keV 電子に対するλは0.0251 Åである。この方位に対してはε≈ε_c、ここで下付き小文字はC軸に沿った誘電率で、こうして300Kでのεは約300(Merz 1952)、そしてε₀は8.85×10⁻¹² C²/J,mである。

縞は壁に交わるところで平均して縞間隔0.32本分の段ができ、したがって位相のずれΔφは0.65πとなる。これらの値を(4)式に代入してP=1.5×10⁻⁵C/cm²であることがわかるが、これはバルクについて測定された平均値P=2.4×10⁻⁵C/cm²に近い値である。これに相当するポテンシャルは3.2 Vで、5.6×10⁵V/cm²の電場を与え、ユニットセル当たり約2個の電子の変位に相当する。

4. ホログラム再生

上述のように、分析された状況の中で位相のずれは局限され、特定の相互作用に帰せられた。そして事柄を複雑にする振幅信号はなかった。

しかし、一般的にホログラムは振幅と位相細部の双方を含むであろうし、したがって、電子線ホログラフィーの第二段階——像の再生に対しては適正な準備がなされなければならない。二つの異なる方法、光学法もしくはデジタル法が利用できる。光学法は、ホログラムを生成する光路と似ているが(例えば図1)、ただし、電子の代わりに可視、可干渉の光ビームを用いて行われる。方法は施行するのは簡単で、単にレーザと若干のレンズおよびプリズムを要するだけである。直接の再生以外の操作はやっかいであるのが欠点で、したがって方法の柔軟性は限定される。

こうして、最も一般的な処理方法はデジタル(数値的)再生である。これはホログラムがコンピュータ読み取りの形で利用できることを要し、したがってそれはプリントま

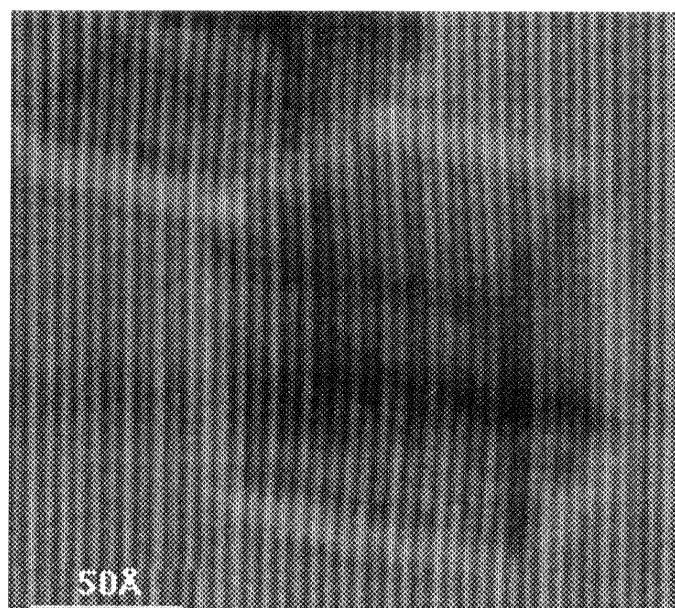


図7 干涉縞間隔4Åで記録された酸化マグネシウム立方体の低分解能ホログラム (JEM1990 VOL.39 P475 Fig5)

たはネガのどちらかからディジタル化されるか、コンピュータに接続されたCCDまたはテレビジョンカメラを用いて、ディジタル形式で直接記録される必要がある。方法の手順は約4 Åの縞間隔で記録されたMgO立方結晶のホログラム(図7)を用いて説明する。ホログラムの中の振幅情報は、立方体の量の輪郭として観察することができるのに対して、ホログラムの中の位相情報は縞の曲がりの中に見ることができる。

最初の操作はホログラムのフーリエ変換を行うことである。[図8(a)]。これは三つの部分、すなわち通常の明視野像の情報を効果的に包含する中心領域(自己相関関数)およびそのそれぞれがホログラムからの情報を包含する二つのサイドバンドから成っている。フーリエ変換の中の情報は複素行列(すなわち実成分と虚成分の双方を持つ)として実在する。こうして可視化の目的に対してはおおのほの画素の位置が行列中の対応する値の位置を表し、画素の明るさ

がその行列の成分の大きさを表すグレースケールマップを作るのが有用である。このデータは非常に広い範囲の量をカバーするので、これを表示するのに対数スケールが用いられる。これはサイドバンドの間および周囲にあるまだらなバックグラウンドノイズを見えるようにする——これは容易に見られるが、サイドバンド中のデータの強度の1%またはそれ以下でしかなく実際には何ら問題はない。次にサイドバンドのうちの一つを囲む領域を選び[図8(a)], そこに含まれるデータを再びフーリエ変換して複素行列を得る。この行列の実部分のグレースケールマップは、ホログラムから再生される振幅像であるのに対して、グレーの濃さによって位相のずれ($0 \sim 2\pi$ rad)を表示することにより、行列中の複素成分から作られたマップはホログラムから再生された位相像を構成する[図8(b)]。この場合試料はビームに対してほとんど透明で、したがって振幅像は——これはわれわれが顕微鏡で見る通常の明視野像とほぼ同等であ

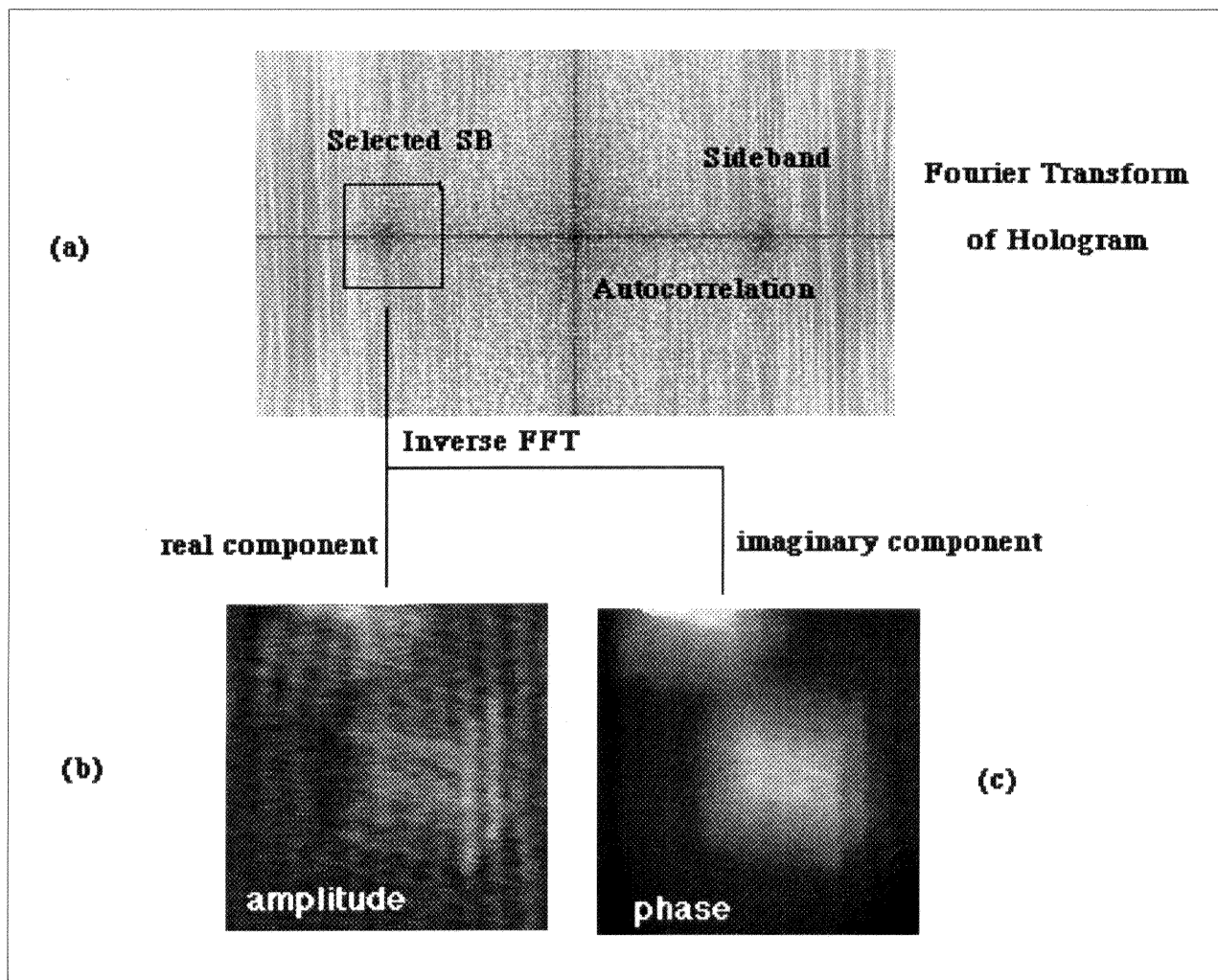


図8 ホログラムからの像再構築

(a) 図7のホログラムのフーリエ変換パワースペクトル (b) 振幅像 (c) 位相像——図8(a)の四角で囲ったサイドバンド領域のフーリエ変換から得られた。

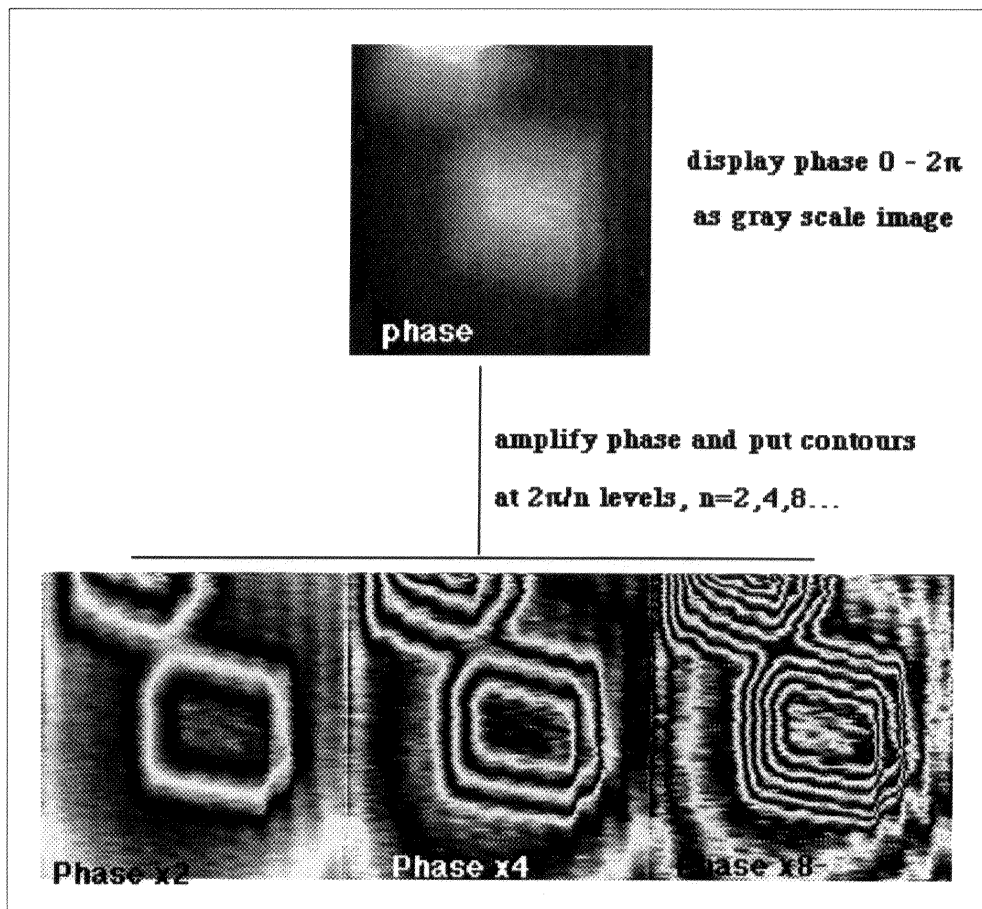


図9 図8(c)の基本位相像の2倍, 4倍および8倍増幅を行った位相増幅像 8倍での等厚線は約65Åの厚さ変化に相当する。

るが、——あまり鮮明でなく有用なコントラストも持っていない。一方位相像では外形のはっきりした高いコントラストの立方体の像が観察でき、電子の波面中の位相情報を用いることの利点を示している。この像はプロット方法を変えることでさらに強調することができる(図9)。明るさを黒から白に変えるのに、0から 2π の位相変化の代わりに $0 \sim 2\pi/n$ ——ここで $n=2, 4, 8$ ——などが用いられる。もし位相のずれが値 $2\pi/n$ を超えると明るさスケールが単に繰り返される。この位相増幅法は試料の厚さ変化の投影像の上に一定の位相ごとの等高線を生成する。 n を大きくすることによって縞間隔は減少し、より詳しいマップを作り出していく。ここに示す $n=8$ の場合、等厚線間隔はわずか65 Åの厚さ変化に相当する。非点収差や球面収差の補正のほかに、ただ1枚のホログラムから完全なスルーフォーカスシリーズを再生するなど、他にも多くの操作をディジタル化されたホログラムについて行うことができる。こうしてホログラフィーでは、ユーザーの時間の大部分はすべての可能な必要性をカバーするため、膨大な数の顕微鏡写真を撮るこ

とではなく、むしろわずか1～2枚のホログラムから欲しい情報すべてを抽出するためにコンピュータのところで費やされるであろう。

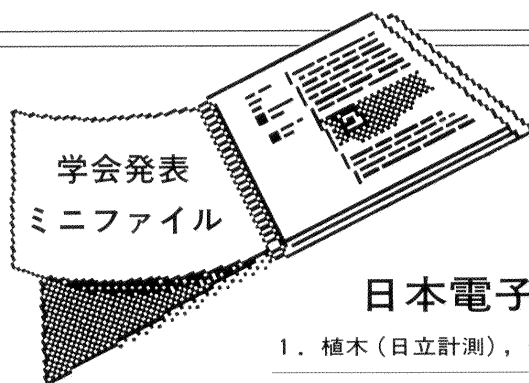
5. おわりに

この研究は、USエネルギー庁の契約DE-AC05-84OR2140 Oのもとに、マーチンマリエッタエネルギーシステム会社によって管理されているオークリッジ国立研究所の研究所主導R&Dプログラムから資金援助を一部受けて行われた。

(邦訳文責 土倉秀次)

参考文献

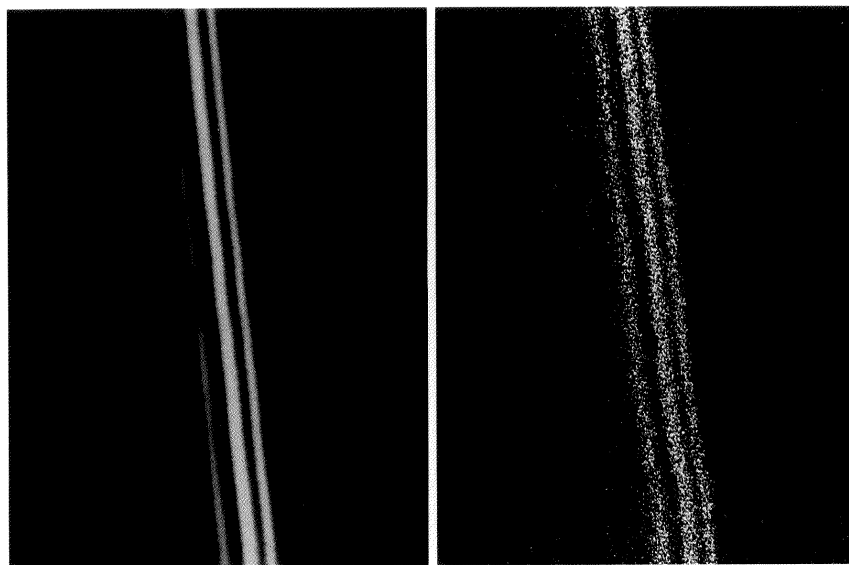
-
- Gabor D. Proc. Roy. Soc. A **197**, 454 (1949)
- Haine M. E. and Mulvey T., J. Opt. Soc. Am., **42**, 763, (1952)
- Hibi T., J. Electr. Micros., **4**, 10, (1956)
- Merz W. J., Phys. Rev., **88**, 421, (1952)
- Tonomura A., Rev. Mod. Phys., **59**, 639, (1987)
- Yanzi M., Optik, **68**, 319, (1984)
-



日本電子顕微鏡学会 第49回学術講演会の巻

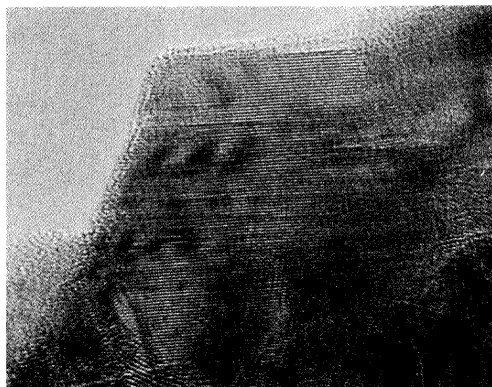
1. 植木(日立計測), 他: FE-TEMによるマッピングとライン分析の応用

冷陰極電界放出形電子銃タイプの電子顕微鏡を用いて, CrとSiの多層膜断面を観察した。厚さ3 nmのCr層の存在が明確にとらえられた。



2. 上野(日立計測), 他: 試料直接加熱によるSiC結晶成長の高分解能像観察および分析

Si単結晶微粒子とグラファイト微粒子を混合したものを, 電子顕微鏡内で1,500℃に過熱すると新たな結晶が成長した。高分解能透過像, 電子線回折像およびEDX分析結果からSiCであることが確認された。



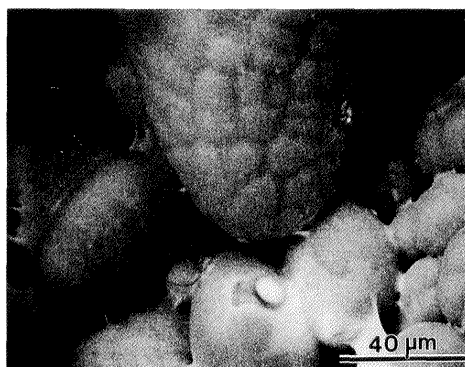
3. 田盛(日立計測), 他: 耐衝撃性ポリスチレン(HIPS)の電顕内引っ張り試験に関する研究

耐衝撃性ポリスチレンに引っ張り応力を加えたときの構造変化を、電子顕微鏡で観察するための試料ホルダを開発した。応力に対して垂直方向に発生したクレーズとその周辺の構造変化が明確にとらえられた。



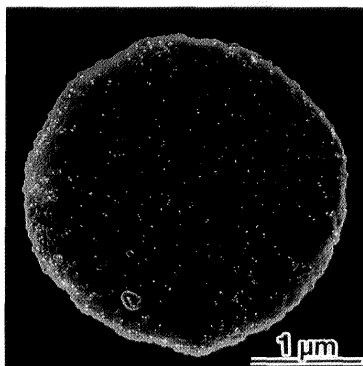
4. 植田(日立計測), 他: 低真空SEMによる低温観察の試み

真空度130Pa, 温度0℃にすることによって水の蒸発を抑え、アサガオの成長点のように特別軟弱な植物組織の観察に成功した。



5. 中川(日立計測), 他: コロイド金標識SEM試料のカラー合成表示法の試み

ヒト結晶板の膜糖蛋白を金粒子で標識し、血小板表面構造を二次電子で、金粒子を反射電子で検出し、両信号をおのおの異なったカラーで1枚の画像に表示することによって、より明確なSEM像を得た。



6. 矢口(日立計測), 他: 集束イオンビーム装置による断面TEM試料作製とTEM観察

7. 小林(日立計測), 他: 試料形状と二次電子像コントラスト

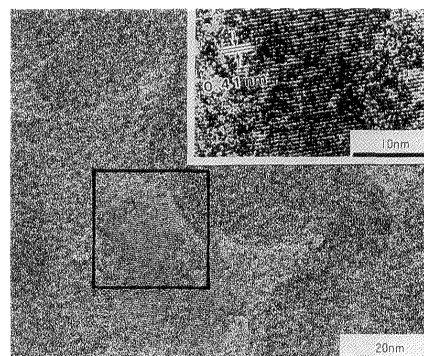
8. 山崎(日立計測), 他: EDX付きFE-SEMによる多層膜の定量分析



テクニカルデータ 最新版ダイジェスト

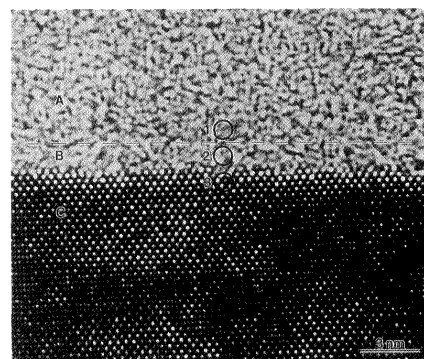
1. パラフィン結晶の低温高分解能観察 (TEM No.57)

電子線によって熱的損傷を受けやすい代表的な観察対象物であるパラフィンにチャレンジ。クライオトランスファホルダを用いることによって結晶格子像をとらえることができました。



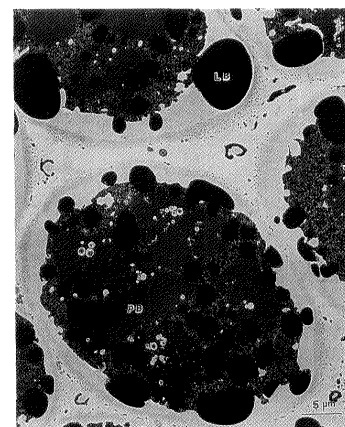
2. Si自然酸化膜の微小部EELS分析 (TEM No.60)

右に示す断面TEM像は上から順にA：アモルファスSi, B：自然酸化膜, C：Si単結晶を示します。形態的にはAとBの区別はつきませんがEELS分析するとBだけに酸素が検出され、酸化膜であることが証明されました。



3. 大豆とその加工品の電子顕微鏡観察 (TEM No.61)

右の写真は納豆のTEM像です。納豆菌によって変質した蛋白質と、それを取り巻く細胞膜が鮮明にとらえられています。このほか、枝豆や豆腐、湯葉など多数の観察例が紹介されています。



4. Natural SEMとその応用・第2集 (SEM No.63)

チョコレートのように熱に弱いサンプルでもクライオシステムによって鮮明なSEM像が得られます。このほかEDX分析の例として生麵、ステレオ観察の例としてユリ花粉など第1集後登場した新機能による観察例が集められています。



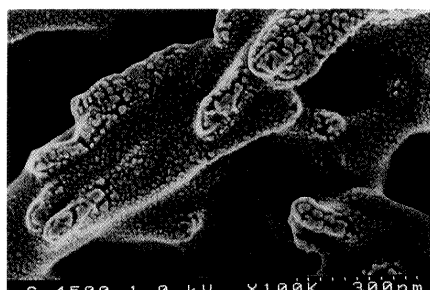
5. S-5000形超高分解能SEMの応用 (SEM No.67)

超高感度YAG検出器の効果としてGaAs/AlAs積層ファセット構造の観察、スキャンインテグレーション機能による鮮明なコンタクトホール撮影をはじめ、S-5000形ならではの観察例が豊富に掲載されています。



6. S-4500形走査電子顕微鏡とその応用 (SEM No.68)

低加速電圧での驚異的な分解能を駆使して、エレクトロニクス分野、高分子材料分野、および生物分野のさまざまな物質のSEM像が紹介されています。右の写真はその一例を示すもので、磁気テープ上のAu粒子です。



7. その他最近発行されたテクニカルデータ

H-9000形NARによる動的観察と微小部観察 (EM No.52)

H-7000形のリモートオペレーションシステムとその応用 (EM No.53)

HF-2000形によるEDX分析の空間分解能 (EM No.54)

ステップスポットスキャンTEM法とその応用 (EM No.55)

スロースキャンCCD-TVシステムの応用 (EM No.56)

H-7100形による植物細菌およびウィルスの観察 (EM No.58)

インレンズFE-SEMによる高精度EDX分析 (SEM No.59)

カラー合成ステレオ写真集 (SEM No.60)

S-6200形高分解能FEB測長装置の構成と応用 (SEM No.61)

S-6280形のオートアドレス機能とその応用 (SEM No.62)

異物・欠陥評価システムの構成と応用例 (SEM No.64)

EDX分析による薄膜の組成および膜厚の測定 (SEM No.65)

低エネルギーX線によるWDX定量分析 (SEM No.66)

解 説**Natural SEM 日立走査電子顕微鏡****“Natural SEM” Hitachi Scanning Electron Microscope**

久保木 健三*

1. はじめに

SEM (Scanning Electron Microscope : 走査電子顕微鏡) は、実用化されてから二十数年、物質表面の微細構造を観察する装置として、生物分野から材料分野まで、研究室から、あらゆる産業分野での品質管理、故障解析など、その有用性が多方面で認められ、活用されている。

その用途も、観察の面だけでなく、分析、計測と広範囲にわたり、装置の性能はもとより操作性、信頼性の向上が強く要望されている。

信頼性の面では、装置が故障しないことが基本である。また、観察、拡大写真の質が常に試料の正しい状態を、忠実性よく得られることが重要である。そのためには、試料を長時間電子ビームにさらさないことである。観察を始めたらず、まず、焦点合わせ、視野、倍率の選択、非点、焦点合わせ写真撮影の手順をすばやく行うことであり、操作性の良し悪(あ)しがポイントとなる。

操作性の向上は、特定のオペレーターを必要としない使いやすい装置、生産部門などでの試料処理時間の短縮、つまり、効率向上にもつながる。S-2000シリーズの汎(はん)用SEMには、以下に示すような多くの自動化機能が盛り込まれている。

(1) 自動排気操作

排気操作および停電、断水等に対する安全処置などすべての操作をワンタッチで行える完全自動排気システムを採用している。

(2) オートフォーカス(自動焦点合わせ)機能

試料の位置に関係なく、対物レンズ電流を自動調整して正焦点の位置を設定し、約2秒以内でシャープな画像を表示する。

(3) オートスティグマおよびフォーカス

(自動非点補正・焦点合わせ)機能

最も煩雑な操作の非点収差補正も、補正コイルと対物レンズ電流を交互に制御を行う独自のアルゴリズムで、非点補正、焦点合わせを約4秒以内で行う。

(4) 自動画像調整機能

画面の明るさ、コントラストを常に一定レベルに合わせ、同じトーンの写真が失敗なく簡単に撮影できる。

以上の主な自動機能のほか、高倍率観察時のわずかな視野移動のためのイメージシフト、ツインキーによる簡単な倍率設定、視野選択などに便利なプリセット倍率設定など

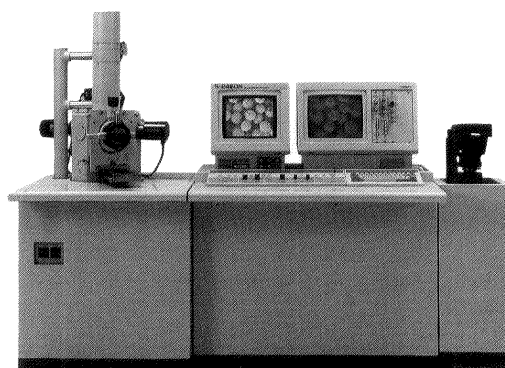


図1 S-2460N形の外観

多くの機能がすべてキー操作で行うことができる。

一方、SEMによる観察では、試料は高真空雰囲気中で電子ビームの照射を受けるため、非導電性試料には帯電現象による像障害を防ぐため、試料表面に金属膜の蒸着を行う。また、生物、植物などの含水物試料には、蒸発、乾燥による収縮などによる表面形態の変化を抑えるため、固定、脱水、乾燥のうえ蒸着といった、いわゆる試料前処理が必要となる。

しかし、最近試料前処理を一切行わず、そのまま自然(Natural)の状態を観察したいというニーズが高まり、試料の周囲を低真空雰囲気にする観察法が注目を集めてきている。

そこで、S-2000シリーズ汎用SEMに、低真空観察モードを付加して、機能拡大を図ったNatural-SEM(以下、N-SEMと略す)3機種(S-2250N、S-2360NおよびS-2460N)のシリーズ製品化を行ったので以下に紹介する。S-2460Nの外観を図1に示す。

2. 低真空観察法

低真空観察法の原理を図2に示す。前処理をしていない非導電性試料に電子を照射すると、試料表面は電子が帯電して負の電位となる。このため二次電子が出やすくなり、局部的に明るい像となったり視野移動が起こる、いわゆるチャージアップ現象が生じる。

ここで試料近傍の雰囲気を低真空(～数百パスカル)にすると、電子の平均自由行程は残留ガス分子の存在によって著しく短くなる。したがって、照射した電子は途中ガス分子と衝突する確立が高くなり、ガス分子に衝突した電子はガス分子をイオン化する。この正イオンは負に帯電している試料表面に引き付けられ、電子と再結合して帯電現象を

* 株式会社 日立サイエンス システムズ 第一設計部

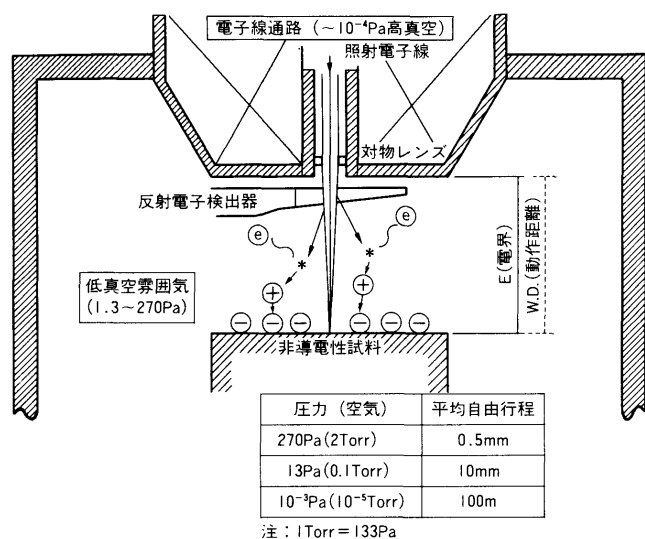


図2 低真空観察法の原理

中和する。

この帯電-イオン化-再結合の連続作用により、試料表面は常に帯電現象のない状態を維持して、像観察を可能にする。また通常SEMの信号源である二次電子は、低真空雰囲気では使えないため、照射電子とほぼ同等のエネルギーの反射電子を信号として像表示する。

なお試料近傍の圧力を高めることは、比較的高い蒸気圧の試料でも、水分や油分の急速な蒸発を抑制する効果があるので、含水試料は試料装填(てん)から観察、写真撮影をすばやく処理することで、より自然な表面形態を忠実に再現できる。

3. N-SEMによる主な観察対象物

低真空雰囲気では効果のある観察対象物として、主に下記
のものがあげられる。

- (1) セラミックス、プラスチックなどの絶縁体試料
- (2) 植物、食品などの水分、油分を含んだ試料
- (3) セメントなどのアウトガスの多い試料
- (4) 考古学上の出土品や刑事上の証拠品など、試料前処理の加工ができない試料

4. 装置の構成

標準のS-2000シリーズの性能、操作性を一切阻害することなく、低真空観察機能の一体化を基本としている。

4. 1 排気系の構成

排気系統を図3に示す。高真空モード・低真空モードを一体化したシーケンスで動作させ、操作性の向上を図っている。

主な特長として、

- (1) 操作に制限がなく、だれでも安心して使用できる。
- (2) 排気操作も全自動のため煩雑さが一切ない。
- (3) DP (油拡散ポンプ) の背圧は常時専用のRP (油回転ポンプ) で排気を行い、オイルミストの吹上げを抑え、クリーンな真空を維持する。
- (4) 低真空度の範囲を1~270 Paとワイドに設定可能なため、広い範囲の試料に対応できる。
- (5) 含水試料、含油試料からの過剰な蒸発を抑えるため、必要以上に高真空とならないシーケンスを組み込んでいる。

4. 2 低真空度の自動設定

試料の種類や状態により、最適な低真空度の値は変わる。最適な低真空度を簡単に設定できる独自の R. V. F. (Realtime Vacuum Feedback) 方式によって完全低真空度自動設定を行っている。試料室は独立した真空計で常に監視しておき、新たな設定真空度に対して試料室に導入す

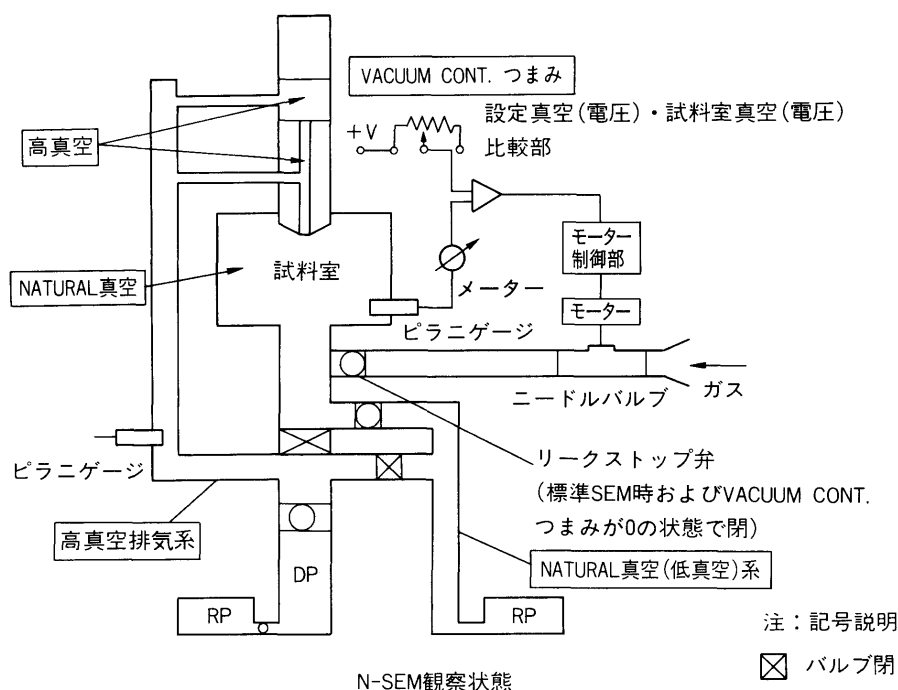


図3 低真空度の自動設定

るガス量を制御し平衡圧力を維持する。自動設定のメリットとしては、

- (1) 同種の試料の再現性の良い観察条件の設定が可能である。
- (2) アウトガスの多い試料でも、一定圧力での観察が可能である。
- (3) 設定操作の煩雑さからの解放
- (4) 誤操作による試料の損傷、装置のトラブルからの解放などその効果は大きい。

4. 3 反射電子検出器

反射電子の検出器は2種類に分けられる。一つはプラスチック形シンチレータで、もう一つはアニュラー形の半導体検出器がある。プラスチック形の特長としては、二次電子検出器同様、信号応答速度が速いため、TVモードでの視野選択、通常SEMの自動化機能の併用が可能となり、より二次電子像に近い像がすばやく観察できる。なお、組成像や凹凸像が鮮明に観察できる。特に平滑度の高い試料（主にX線分析用）では、平均原子番号の分離度は約 $Z=0.01$ 以下と組成の差を表示できる。以上の性能や操作性から、この検出器をN-SEMの標準構成としている。半導体の検出器は、従来、通常のSEMの付属装置として4分割アニュラー検出器がある。4個の独立した検出器の信号を組み合わせることにより、立体像、組成像および凹凸像が簡単に得られる。

上記2種類の検出器は、それぞれの特長を生かし、選択および同時装着も可能である。

検出器による像質の差の例を図4に示す。

4. 4 操作性

装置の操作性は重要である。特にN-SEMモードでは、試料によってすばやい処理が要求される。通常SEMの信号処理の自動化に加え、試料装填から真空排気、低真空度の設定など、像観察までを迅速に行い、真空による試料損傷を抑える。N-SEM (S-2250N/S-2360N) の真空、信号の操作パネルの外観を図5に示すとともに、各機能について説明する。

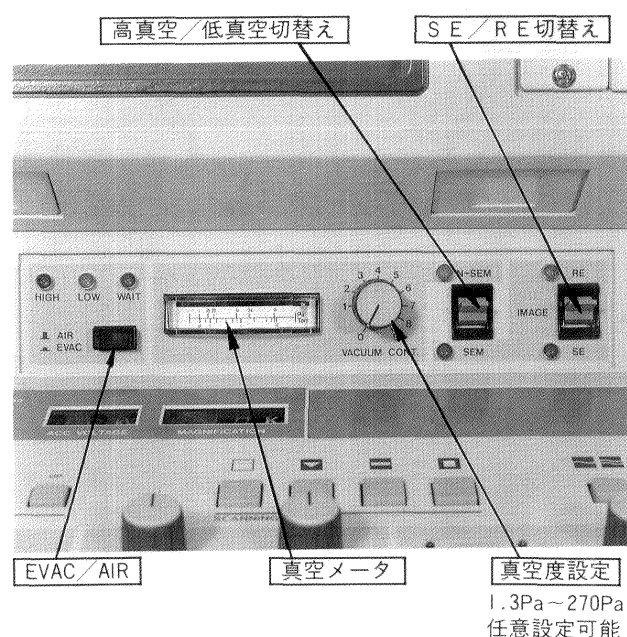


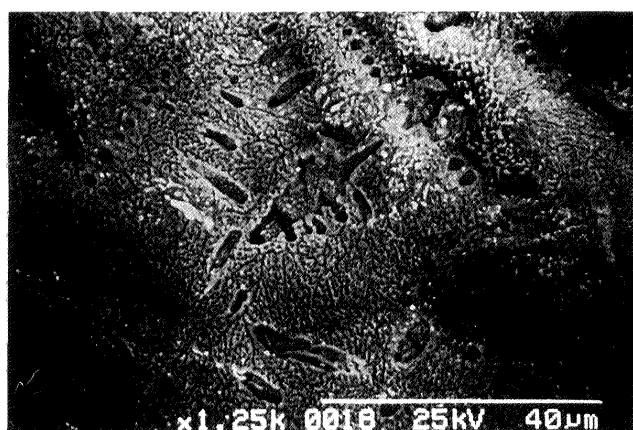
図5 操作パネル

EVAC/AIR : 排気・大気の操作がワンタッチで行える。

高真空・低真空切り替え : SEM/N-SEMモードの切り替えができる。この切り替えにより、真空系、信号系が装置がどんな状態でも関係なくできる。

SE/RE切り替え : 二次電子・反射電子の信号切り替え。N-SEMモードではスイッチ位置に関係なく、反射電子だけとなる。

真空度設定 : N-SEMモード時だけ動作。つまみで目盛設定すると、約1分前後で目盛位置に相当する真空度に自動設定を行う。設定真空度はメータ (Pa/Torr) で確認できる。S-2460Nでは、操作メニューによるCRT画面上へデジタル設定 (Pa) ができるため、さらに再現性の良い設定が可能として、画像写真上にもデータとして記録される。



(a) ロビンソン検出器



(b) アニュラー検出器
(試料：はんだの表面)

図4 検出器の違いによる像質の差

4. 5 試料微動装置

観察したい試料の形状などにより、下記の3種から選択できる。

(1) スーパーユーセントリックステージ

比較的小形の試料の傾斜観察に適している。真空外から試料の観察面を傾斜軸に一致させる機構付きのため、傾斜時視野の逃げを最小にできるため、高倍率の傾斜観察が可能である。また、両眼の視差に相当する角度を、電子線に対し試料表面を左右に傾け、ツインフォト（1枚の写真上に2枚の画像を記録）機能で撮影すると鮮明な立体像が観察できる。

(2) 大形ユーセントリックステージ

平板状試料（最大直径150 mm）の観察に適している。

(3) 標準ステージ

不定形（塊状）試料の観察に適している。特に周辺部の側面の観察に便利である。

4. 6 静止画像表示、メモリ機能（S-2460Nのみ対応）

(1) 12インチ白黒モニターによる静止画像表示、また、高精細画像メモリも二面標準装備で、鮮明な再生写真の撮影が可能である。

(2) 多彩な画像処理機能がある。画質改善、積算、4分割画像表示、階調変換、4分割複写、ガンマ補正などの機能がある。また、キーボードから画面上にコメントを入れる

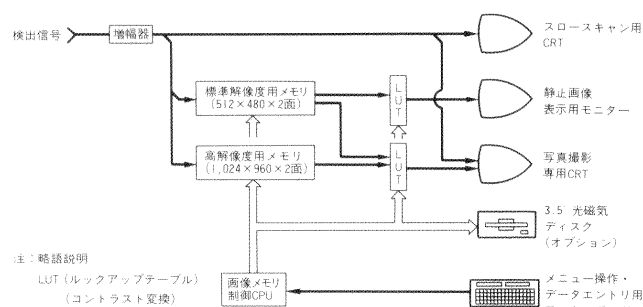


図6 画像メモリシステム構成図

表1 Natural SEMシリーズ仕様

項 目	S-2250N	S-2360N	S-2460N
高真空分解能	4.5nm	4.0nm	4.0nm
低真空分解能	8.0nm	6.0nm	6.0nm
倍 率 範 囲	20～200k 33段階	20～200k 41段階	20～200k 41段階
加 速 電 圧	0.5～25kV 11段階	0.5～25kV 39段階	0.5～25kV 39段階
走 査 モード	全画面 制限視野	全画面 制限視野 ツインフォト	全画面 制限視野 ツインフォト
走 査 速 度	TV (NTSC) 制限視野1段 スロー2段 撮影1段	TV (NTSC) 制限視野2段 スロー4段 撮影3段	TV (NTSC) 制限視野2段 スロー4段 撮影3段
モニターCRT	SEM像：9"	SEM像：9"	SEM像：12" メモリ像：12"
撮 影 C R T	モニター兼用	専用：9"	専用：9"
画 像 メモリ	オプション	オプション	512 ² ×2面 1,024 ² ×2面
画像信号処理	オプション	オプション	リカーシブフィルタ 画像積算 反転 2値化、N値化 ガンマ変換 中間強調
画面分割表示	オプション	オプション	四分分割
コメント入力	オプション	オプション	標準装備
真空度設定法	パネルのつまみ操作	パネルのつまみ操作	メニュー操作
設定真空度	メーター(Pa/Torr)	メーター(Pa/Torr)	モニター画面に表示(Pa)
真空度範囲	1～270Pa	1～270Pa	1～270Pa
GUNアライメント	メカニカル	メカニカル	電磁2段

機能もある。

(3) 3.5インチ光磁気ディスク（MOD）搭載が可能（オプション）である。コンパクトなディスクに110枚の画像データの保存が可能である。また、必要時に再生写真、またはプリントアウトが可能である。

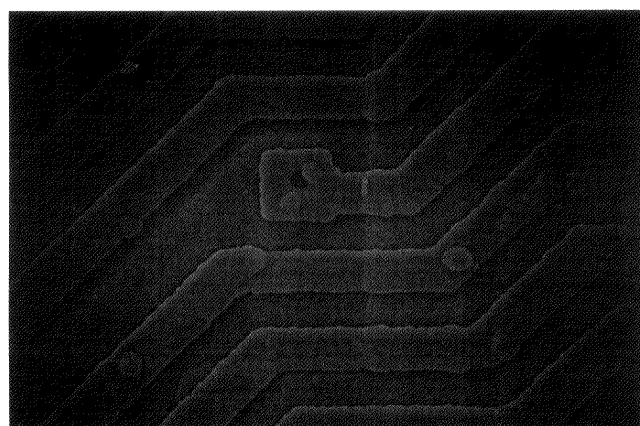
画像メモリシステムの構成を図6に階調変換実行例を図7に示す。

5. 仕 様

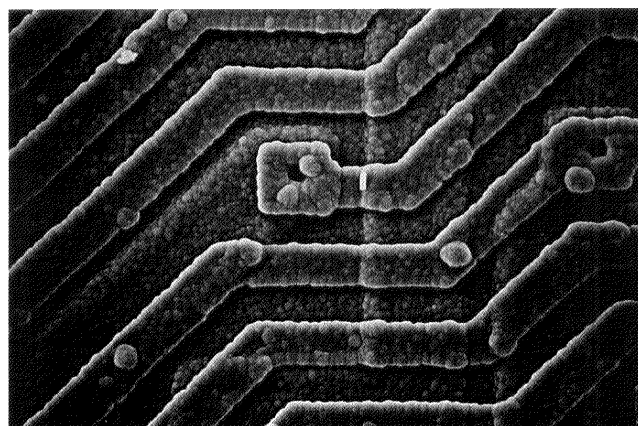
N-SEMシリーズ3機種の主な仕様を表1に示す。使用目的に合わせて機種が選択できる。

6. 応用データ

N-SEMによる観察例を図8に示す。このように含水物でも充分観察が可能である。

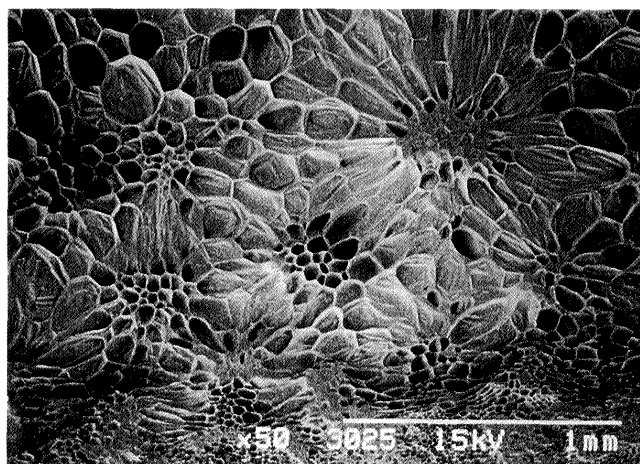


(a) 原画像



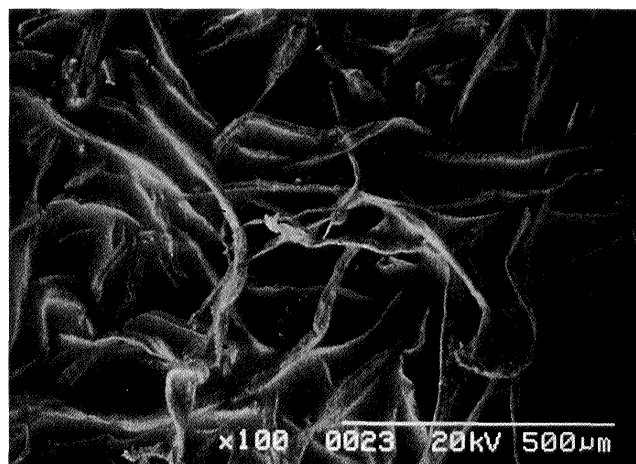
(b) 実行後の画像

図7 階調変換実行例



(a) 梨(なし)の果肉

倍率: 50倍 真空中: 133Pa(1Torr)



(b) エンジンオイルフィルタ

倍率: 100倍 真空中: 270Pa(2Torr)

図8 N-SEMによる観察例

7. X線分析

N-SEMシリーズは、すべてEDX (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) /WDX (Wavelength Dispersive X-ray Spectroscopy) の同時装着が可能である。ただし、N-SEMモードでは使用に制限がある。

7. 1 EDX

低真空雰囲気では、照射電子の一部は雰囲気ガス分子との衝突作用により、照射位置の周囲の広い範囲(加速電圧、真空度および動作距離によって異なる)に散乱するため、照射位置以外からのX線を検出する。定性分析時には、分析データの解釈を誤るおそれがあるので注意が必要である。

7. 2 WDX

N-SEMモードでのWDX分析はできない。その理由は、

分光したX線を検出する検出器(比例計数管)は高電圧(～2 kV)を印加して使用する。低真空雰囲気での電圧印加は必ず放電現象が起こる。その結果電気回路の破損などにつながる。

8. おわりに

以上、N-SEMについて紹介してきた。SEM観察の基本条件は試料本来の表面微細形態をいかに忠実に拡大観察できるかであると思う。試料前処理を行わずに観察できるN-SEMは、今後幅広い分野で活用され通常SEMでは得られない新しい知見が数多く報告されることを期待する。

日製産業株式会社

本社 電話 東京(03)3504-7211
 筑波支店 電話 土浦(0298)23-7391
 千葉営業所 電話 千葉(043)247-4151
 新潟営業所 電話 新潟(025)241-3011
 中部支店 電話 名古屋(052)583-5841
 四国営業所 電話 高松(0878)62-3391
 九州支店 電話 福岡(092)721-3501

北海道支店 電話 札幌(011)221-7241
 北関東営業所 電話 大宮(048)653-2341
 横浜支店 電話 横浜(045)451-5151
 北陸営業所 電話 富山(0764)24-3386
 京都営業所 電話 京都(075)241-1591
 岡山営業所 電話 倉敷(0864)25-1316
 沖縄出張所 電話 那覇(0988)78-1311

東北支店 電話 仙台(022)264-2211
 西関東営業所 電話 八王子(0426)43-0080
 厚木営業所 電話 厚木(0462)96-6831
 豊田営業所 電話 豊田(0565)28-5191
 関西支店 電話 大阪(06)366-2551
 中国支店 電話 広島(082)221-4514

<編集後記>

- 表紙の色を変えてVol.36, No.1を発行する運びとなりました。本号は、『ナノエリアへのアプローチ』特集として、透過形電子顕微鏡の応用についての報文を2件掲載しました。
- 福田先生には、臨床診断への応用についてご執筆頂きましたが、従来、主に光学顕微鏡によっていた分野への新しい手法の適用と、その有用性を示して頂けたと思います。
- ホログラフィーに関する報文は、海外からの寄稿で、既に、海外向けの英文ニュースに掲載したものを和訳したものです。
- 共に大作で、写真を明瞭にするため、紙質を変えました。

- 本ニュースに関するお問い合わせは、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。

- 日立計測エンジニアリング株式会社
テクノロジーサーチセンタ
〒312 茨城県勝田市市毛882番地
電話 勝田(0292)73-2111(代)
- 日製産業株式会社
科学システム企画開発部
〒105 東京都港区西新橋1-24-14
電話 東京(03)3504-7811(ダイヤルイン)
FAX (03)3504-7756

HITACHI
 SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
 JUL./AUG. 1993 VOL.36 NO.1

発行 平成5年8月3日
 発行人 本川 忠
 編集人 高田 芳矩
 発行所 株式会社 日立製作所 計測器事業部
 科学機器システム本部技術部
 〒100 東京都千代田区丸の内1-5-1新丸ビル
 電話 東京(03)3214-3122(直通)
 印刷所 日立印刷株式会社