

トピック1

DigitalMicrograph® による電子顕微鏡の簡単な制御および画像解析

石川 亮¹⁾ 田中利空²⁾ 柴田直哉³⁾ 幾原雄一³⁾

1. はじめに

今世紀に入り、収差補正装置が広く普及し、原子分解能での電子顕微鏡観察が従来よりも比較的容易となった。収差補正装置は多段の多極子レンズから構成されているが、すべてのレンズを最適化するためにコンピュータによる自動制御が行われている。レンズのヒステリシスを取り除くためのリラクゼーションや幾何収差の最適化にも自動調整のプロセスに組み込まれており、従来の電子顕微鏡と比較すると手動調整のプロセスが大幅に削減されている。しかし現在でも、最終的な光学系調整の部分では手動で行うため、得られる像やスペクトルの質には必然的に個人差が出る。この手動調整を可能な限りコンピュータに任せる自動調整を導入することができれば、誰でも質の高い実験データを取得することが可能となる。また、研究者はより高度・複雑な実験やデータの解析に集中でき、科学的な生産性の向上が見込める。本稿では顕微鏡の自動化からは程遠いが、全くプログラムの知識がない方を対象とした入門として、簡単なスクリプトによる電子顕微鏡の制御や画像解析法について紹介する。

各社から販売されている電子顕微鏡はそれぞれ独自のスクリプティングによる制御を備えているが、本稿では Gatan 社の DigitalMicrograph® (DM) に付属しているスクリプティングについて紹介する(オフライン版は無料公開されている⁽¹⁾)。DM は CCD (Charge Coupled Device), CMOS (Complementary metal-oxide-semiconductor) などのカメラ、電子エネルギー損失分光器 (EELS: Electron Energy-Loss Spectroscopy), あるいは走査プローブを制御する DigiScan を備えた電子顕微鏡に付随してくるソフトウェアである。顕微鏡に配備されている Gatan 社の装置は DM スクリプトを用いて、CCD のゲイン調整やゼロロスのビーム調整がボタン一つで最適化されるようにプログラムされている。DM スクリプトを習得すれば、これらの調整もユーザー側で組むことが可能となる。

2. 簡単な制御

本稿では日本電子社 (JEOL) 電子顕微鏡を例として用いるが、Gatan 社との通信がサポートされている顕微鏡であれば実行可能である。スクリプトの編集は Ctrl+K あるいは上部のメニューから File/New Script... を選択すると編集画面が起動する。

(1) 蛍光板の上下

最近では CCD を搭載した顕微鏡がほとんどであり、蛍光板を用いた調整をするユーザーも減ってきているが、分かりやすい例として蛍光板の上下をスクリプトにより行う。下記のスクリプトを参考にして実際に実施して頂きたい。

```
// screen up (0) or down (2)
if(ShiftDown( )) {
    JEOLCOM_SetScreen(0);
    result("screen up \n");
} else {
    JEOLCOM_SetScreen(2);
    result("screen down \n");
```

スクリプト編集画面を選択し、右下の Execute または Ctrl+Enter でスクリプトを実行できる。Shift キーを押しながら実行すると蛍光板が上がり、そのまま実行すると蛍光板が下がるだけのプログラムである。インタプリタ型の言語なので、ヘッダ部分の記述やコンパイル(機械語への変換)が不要であり、直ちに実行することができる。If 分岐文からも分かるように、DM スクリプトは C 言語の流れを組んでいる。これは DM 自体が C++ で開発されていることに起因しており、文法体系も C++ に基本的に従うようである。JEOLCOM_SetScreen(x) は顕微鏡本体との通信コマンドであり、x = (0, 1, 2) に応じて蛍光板の角度が (0°, 7°, 90°) となる。ShiftDown() は Shift キーが入力されているかを検出するコマンドで、その他にも CtrlDown(), AltDown() なども準備されており、while 文や for 文などのループから

* 東京大学総合研究機構; 1)助教 2)大学院生 3)教授(〒113-8656 東京都文京区弥生 2-11-16)
Electron microscope control and image analysis by DigitalMicrograph; Ryo Ishikawa, Riku Tanaka, Naoya Shibata and Yuichi Ikuhara
(Institute of Engineering Innovation, The University of Tokyo, Tokyo)
Keywords: digital micrograph, scripting, atomic-resolution STEM, differential phase contrast STEM, image analysis
2018年8月30日受理[doi:10.2320/materia.57.584]

抜け出したい時や上述の If 分岐文などの引数として利用するとよい。コメントや得られた結果などを外部出力するには result(“Hello World! \n”)を用いると、ダブルクオテーションの中身が output に書き込まれる。改行するために末尾には “\n” などの改行コードを入れると良い。本スクリプトでは蛍光板が上がった際には “screen up” が output に表示される。行頭の//から始まる部分はコメントであり、実行されない。次のスクリプトに示すように、複数行のコメントは /*comments*/ のように記述する。行端のセミコロンは無くても問題ない。

(2) ステージの制御

試料の移動や傾斜はトラックパッドなどの制御パネルが各社より提供されているが、そのステップ(強度)は任意に変更できない。走査透過型電子顕微鏡(STEM: Scanning Transmission Electron Microscopy)では観察場所を探すために、試料高さ(Z方向のステージ)を頻繁に移動することが多いが、ここでは任意に高さを変更できるプログラムを作成してみる。以下のスクリプトを参考に実施して頂きたい。

```

// $BACKGROUND$
/* Aug-19-2018
 * stage & tilt functions
 */
void SetStageZ(number zstep) {
    number curr_sz = EMGetStageZ( );
    if(AltDown( )) zstep = 10*zstep;
    if(ShiftDown( )) zstep = (-1)*zstep;
    EMSetStageZ(curr_sz + zstep);
}
void SetTiltX(number xtilt) {
    number curr_tx = EMGetStageAlpha( );
    EMSetStageAlpha(curr_tx + xtilt);
}
void SetTiltY(number ytilt) {
    number curr_ty = EMGetStageBeta( );
    EMSetStageBeta(curr_ty + ytilt);
}
// main
SetStageZ(10);
//SetTiltX(0.5);
//SetTiltY(0.5);

```

コンピュータは複数のプログラムを並列して実行するために、各スレッドにプロセスを割り当てる。しかし、DM スクリプトは他のプロセスを中断してスクリプトを優先実行しようとする。これを避けるには、冒頭にコメントアウトされた // \$BACKGROUND を記述する必要がある(CCD で見ながらステージを動かすなど)。他のインタプリタ型言語とはやや異なり、使用する変数の型を宣言する必要がある。DM

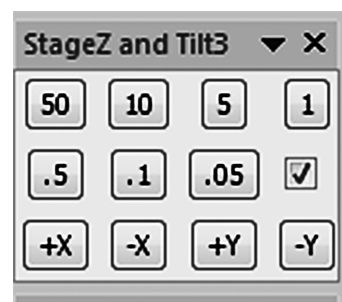


図1 TagGroup で作成したステージ Z および試料傾斜の GUI。上 2 段のボタンはステップの異なるステージ Z コントロール、最下段は x, y 方向の試料傾斜に対応する。

スクリプトはオブジェクト指向であり、Number, String, Image, TagGroup などのクラスが準備されている。上から行ごとに処理を行うため、関数は main の前に記述する。関数名は自由に名付けられるので、ここでは SetStageZ(number zstep) とした。この関数はステージ Z を変更するのみなので、戻り値は void となる。また、引数(zstep)は変更したいステップ値であり、単位は μm である。Alt/Shift キーを入力している場合には 10 倍あるいは負のステップとなるようにしてある。現在の高さにステップ値を加え、EMSetStageZ() で高さを変更する。x, y 方向への傾斜についても現在の傾斜角度を取得し、ステップ値を加えるという方針は同様であり、EMGetStageAlpha(), EMSetStageBeta() を用いることで実行できる。main 以降が実際に実行されるコマンドとなり、この場合、ステージ Z が $10 \mu\text{m}$ 動くことになる(Alt/Shift キーを入力した場合は挙動が異なる)。ステージステップを変更するには、SetStageZ(x) の引数を入力し直す必要がある。これを避けるには図 1 に示すようなグラフィカルユーザーインターフェイス(GUI)も有効である。図 1 のようなフロートウィンドウは TagGroup を用いることにより容易に作成が可能である。プルダウンメニューや数値入力領域を設けることでマウスだけでステージのコントロールが実施可能になる。

(3) TagGroup による実験条件の管理

DM で取得したデータは Tag で管理されている。例えば CCD 画像の詳細な実験条件は画像上で右クリックし、/ImageDisplay.../Image/Tags/の下に表示される。例えば、露光時間を知りたければ、/DataBar/Exposure Time (s):/に記述してある。この露光時間の数値をスクリプト中に組み込むにはどのようにしたら良いだろうか？これは TagGroup クラスで管理されている。以下のスクリプトを参考に CCD 画像の実験条件値を取得して頂きたい。

```

number exposure;
image img := GetFrontImage( );
TagGroup tg = img.ImageGetTagGroup( );
tg.TagGroupGetTagAsNumber("DataBar:Exposure Time

```

```
(s)", exposure);
result("Exposure time (s): " + exposure + "\n");
```

DM スクリプトで生成される変数は基本的にオブジェクトである。したがって、各クラスのメソッドを呼び出すことができる。クラスには多くのメソッドが組み込まれているので、スクリプトを編集する前に各クラスにどのようなメソッドがあるかを良く参照すべきである。あるクラスに属しているオブジェクト(obj)のメソッド(method)を呼び出すには obj.method(x, y, ...) or method(obj, x, y, ...) のように記述する。CCD 画像の Tag を取得するには上記のスクリプト中にあるように TagGroup tg = img.ImageGetTagGroup() のように記述する。tg を生成することですべての Tag にアクセス可能となり、露光時間はその次の行の DataBar: Exposure Time(s) を指定することで取得できる。この際に、スペースも正しく入力する必要がある。逆に、TagGroup-SetAsNumber(TagGroup tg, String tagPath, Number num) メソッドを用いることで必要な実験条件を直接画像に書き込むことができる。その場観察などの実験ではノートに必要なコメント等を書き込む時間が取れないケースがある。予めスクリプトを準備しておけば、実験条件やコメントを Tag に書き込めるため、後の解析で役に立つことが多い。また、取得した実験像についても毎度手で保存するのではなく、スクリプトで番号やコメントを付け自動で保存を行っていくことも比較的容易に行える。

(4) ビーム電流量のリアルタイム計測

装置がどんなに改善されても電頭観察では試料ダメージとの戦いが常である。加速電圧の選択や冷却などが一般に有効な方法であるが、電流量も重要なパラメータである。冷陰極電子銃では時間とともに電流量が変化するため、常にモニターすることが好ましい。以下にこれまでのスクリプトよりも実効性の高いリアルタイムの電流計測を示す。ここでは、(1) 電流量を何らかの方法で計測できる環境にあること、(2) Ronchigram を観察するための CCD が付属していることを前提とする。Faraday cup を用いた電流量の計測方法が一般的であるが、付属していない場合には EELS 分光器でも計測可能である。スペクトロメータの調整加速電圧をゼロあるいは数 10 kV に設定すると、金属ドリフトチューブ内に電子が閉じ込められ、電流計を介して計測できる⁽²⁾。この際に小さな EELS のアパチャーを選択し(理想的な Faraday cup に近づけるため)、カメラ長を短く設定する。電流量が既知となれば、真空中でダイレクトビーム像を取得し CCD の較正ができる。以下にスクリプト例を示す。

```
//$BACKGROUND$

number coeff = 1.89; // 300 kv
number e = 1.602e-7; //elementary charge in pico
Coulomb
```

```
number expo, sx, sy, count, current; //expo in sec

// assign CCD image
image img := GetFrontImage( );
img.GetSize(sx, sy);
TagGroup tg = img.ImageGetTagGroup( );
tg.TagGroupGetTagAsNumber("DataBar:Exposure Time
(s)", expo);

while (!ShiftDown( )) {
    count = Sum(img[0,0,0,sx,sy,1]);
    current = count*e/(coeff*expo);
    OpenAndSetProgressWindow(current+ " pA", "",
    "");
    delay(100);
}
result("@@@ Program ended \n");
```

較正により得られた電子一つに対するの CCD カウント数を coeff とする。我々の ARM300CF では 300 kV での Orius カメラの coeff はおよそ 2 程度である(80 kV ではおよそ 6 程度)。CCD 画像のサイズおよび露光時間を(sx, sy, expo)に読み込む。while 中では、まず、CCD 画像全体のカウントを取得する。次に露光時間や電荷素量を用いて電流量(pA)に変換する。Output に出力しても良いが、ここでは Progress (メニュー: / Window / Floating Windows / Progress)を用いる。Progress は 3 つの値を更新して表示することができる。露光時間も表示したい場合は、OpenAndSetProgressWindow(current + "pA", expo + "s", " ") とすれば良い。露光時間を頻繁に変更する場合は露光時間を取得する部分を while 中に組み込むと良い。これらの演算はミリ秒程度で行われ更新が早すぎるため、ここでは delay を用いて表示を遅らせている。更新を遅らせる代わりに平均などを取るのも良い。ループを抜ける条件に !ShiftDown() を用いている。これは Shift キーが長押しされるとスクリプトが終了するようになっている(終了条件が外部から制御できなければプログラムは走り続けることになる)。また、行頭に //\$BACKGROUND を記述しなければ他のプロセスが止まってしまうことにも注意すべきである。プログラムを実行し、CCD でダイレクトビームを観察するとリアルタイムで電流量が計測できていることを確認して頂きたい。ここでは coeff を求めるプログラムを掲載していないが、電流量を計測した直後にダイレクトビーム像を CCD で取得すれば、current を取得する行の計算式を用いれば coeff が求められるので各自で作成頂きたい(current (pA), count, expo (sec) は既知)。なお、計測前には CCD のゲイン調整を行うことを勧める。

(5) プログラム作成時の心構え

どのような場合にプログラムを書くべきであろうか? 筆者

は5回以上繰り返す作業がある場合にはスクリプトを準備することを勧める⁽³⁾。また、手動による調整では不確定要素が多い場合にもプログラムを利用するとよい。上述のように、数行から100行程度で概ねのことは自動化ができるのが、DM スクリプトの良い点である。ただし、スクリプトがそれよりも長くなるようであれば、論理構成に問題がある場合も多いので再考の余地がある。また、スクリプトの更新を想定してコメントをできるだけ多く残しておくことも重要である。実験中はすべてのことに気を配ることが難しくなる場合が多いため、ここではスクリプトを紹介しなかったが、図1のような GUI を作って動作させることも時に重要である(プログラムがやや肥大化することは避けられない)。また、再利用を考えると関数に加えてクラスを作成しておくのも長い目で見れば極めて有効な方法である(DM スクリプトは独自クラスもサポートしている)。以上、簡単な編集および実行方法について述べたが、最後に DM スクリプトの特徴を簡単にまとめる。

- DM は C++ で開発されており、スクリプトの文法も C++ と類似した体系が引き継がれている。
- インタプリタ型言語なので、ヘッダ部分やコンパイルが不要であり、直ちに実行できる。またルーズに記述しても概ね動作する(バグは侵入しやすい)。
- スクリプトエディタしかないため、IDE などの統合環境はなく、デバッグなどの機能も弱い。大きなプログラムを作成する際にはメソッドごとに問題がないことを手動で確認する必要がある。
- 上から順に行単位に処理を行っていくため、メソッドを下方に記述すると実行されない。
- コンパイルしないため、実行速度が 10^3 — 10^5 倍は遅い。重い演算を実施したい場合には高度な知識が必要となるが、C++ でプログラムを編成しコンパイルしてプラグインとして準備する。

3. 簡単な画像の解析

電子顕微鏡の制御だけでなく画像解析についても DM スクリプトは強力である。ドリフトを抑制しつつ像の信号ノイズ比を向上させる方法として高速走査で多数の像を同一領域から取得する手法が一般に普及しつつある⁽²⁾。DM スクリプトは DigiScan へのアクセスを支援しており、多数像を自動で取得できる。さらに、フーリエ変換に関連した演算も組み込まれており、自動取得した画像間の cross-correlation から試料ドリフトを補正し積算することで SNR の向上が見込める。2つの画像 A, B がある場合、これらの cross-correlation 像は、“image C=crosscorrelation(A, B); showImage (C);” だけで計算でき、最大値あるいはフィッティングによりドリフト量を計測できる(A, B などは画像のタイトル左上に表示されている)。この手法を DM スクリプトに実装・解析した結果を示す。図 2 (a) は α - Si_3N_4 の [001] 入射から得られた環状暗視野像(ADF-STEM)である。電子ドーズ量

が低いため、単一フレームの像質は悪い。しかし、図 2(b) に示すように、ドリフト補正後に20フレームを積算することで像質が改善される。さらに、単一フレームには15単位

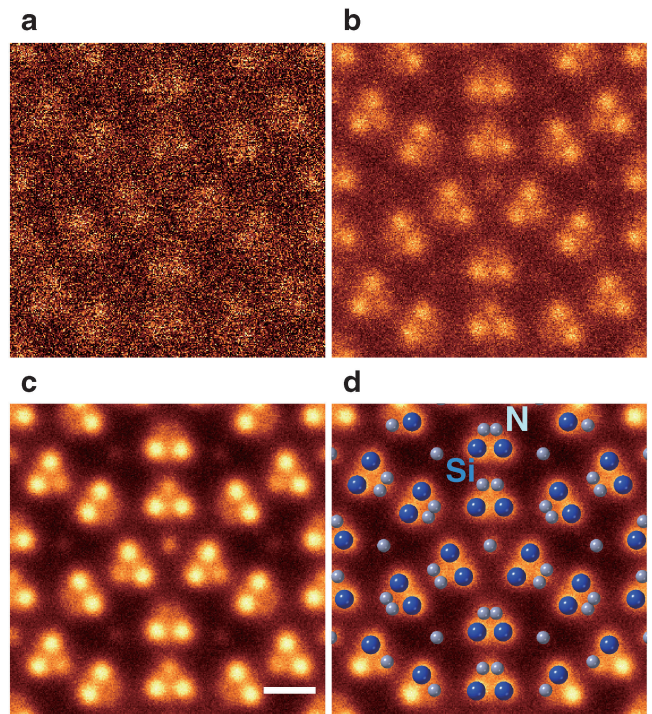


図 2 α - Si_3N_4 の [0001] 入射から得られた環状暗視野像 (ARM300CF, 収束半角: 24 mrad, 加速電圧: 300 kV). (a) 単一フレーム, (b) 20フレーム積算像, (c) 15単位胞の積算像(d) 構造モデル(青:ケイ素, 淡青:窒素). スケールは 2 Å.

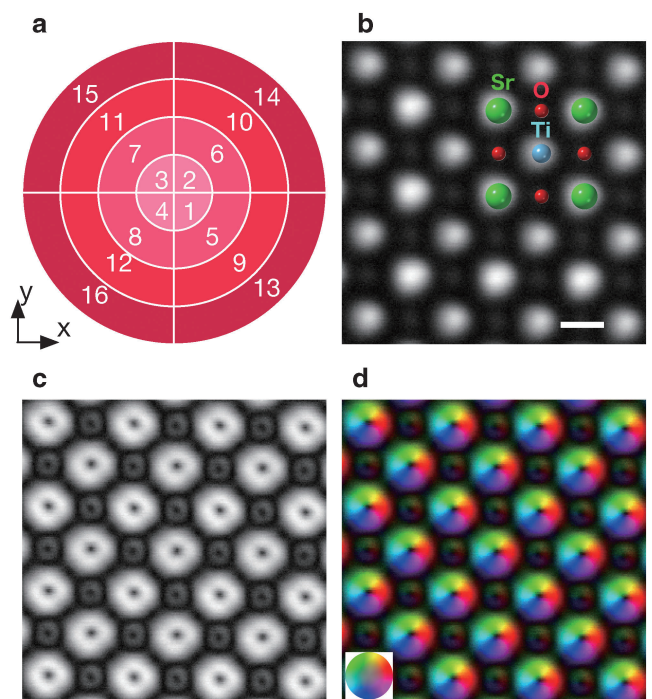


図 3 (a) 16分割型検出器の配列, SrTiO_3 [001] 入射から得られた (b) 環状暗視野像, (c) 電場強度像, (d) 電場方向像. スケールは 2 Å.

胞が含まれていたため、これらを積算した図2(c)では、ケイ素に加え、窒素原子サイトまで明瞭に観察されていることが分かる。試料ドリフトが酷い場合には、上記のような剛体変位に加え、非剛体変位を用いることでドリフトによる原子像の歪みの補正も可能である⁽⁴⁾⁽⁵⁾。

従来の環状型検出器に加え、分割型あるいはピクセル型の検出器を用いた電磁場観察や位相回復が浸透しつつある⁽⁶⁾。各位置から電子回折図形を取得する4D-STEM法では、データ量が多く、目的とする物理量の抽出には画像処理が重要な役割を果たす。ここでは、図3(a)に示す16分割型検出器から得られた像から電場強度像および電場方向像の解析例を示す⁽⁷⁾。データ・セットとして16種類の原子像が得られるが、各検出器の重心位置による重み付けにより、 x, y 方向に対する重心像が得られる。

$$I_{CoM,x}(\mathbf{R}) = \sum_j \{k_x\}_{CoM,j} I_j(\mathbf{R}). \quad (1)$$

ここで、 k_x は x 方向の検出器 j の重心、 $I_j(\mathbf{R})$ は検出器 j で取得した像である。 y 方向についても同様に行い、最終的な電場強度像は $\sqrt{I_{CoM,x}^2 + I_{CoM,y}^2}$ に比例した形式で計算できる⁽⁸⁾。DM スクリプトでは画像の各配列に対しての演算を for ループで計算する必要がなく(スクリプト上で)、ピクセル間の演算を極めて容易に記述することができる。分割型検出器の左と右(x 方向の場合)の差分が微分に相当するため、例えば第2環検出器の5, 6, 7, 8から得られた像をA, B, C, Dとすると電場強度に比例した像は次のように計算できる。

```
number kx, ky; //各自で入力してください。
image xcom = kx*((A + B) - (C + D))/(A + B + C + D);
image ycom = ky*((B + C) - (D + A))/(A + B + C + D);
image EFS = SQRT(xcom**2 + ycom**2);
showImage(EFS);
```

実際にはすべての検出器に対して行い、重み付けと偏向量を電場量に変換する定数を考慮すると電場強度像へと変換できる。図3(b)-(d)に SrTiO₃[001]入射から得られた環状暗視野像、電場強度像、電場方向像を示す。場はベクトルであり電場方向を表現するために、図3(d)の左下に示す参照カラーホイールを用いて電場方向を表示した。これらの像についても信号ノイズ比を向上させるために、16種類の像を複数フレーム取得し、ドリフト補正をすべての像に対して行い、さらに単位胞の平均化を行っている。これらの画像処理はDM スクリプトで作成できるため、実験中に像質を確認でき、実験終了後の解析で実験のやり直しなどの手間を防ぐこともできる。本手法を適用することで信号ノイズ比が改善され、グラフェンなどの散乱強度の弱い材料の原子電場観察も可能になりつつある⁽⁹⁾。

4. おわりに

本稿ではDM スクリプト(GMS 2.3)による簡単な電子顕微鏡の制御および画像解析について紹介した。DM スクリプト

に関する情報や解説はweb上で散見されるので、そちらも参考にして頂きたい⁽¹⁰⁾。GSM 2.1以降では、DMのヘルプ(F1, Scriptingのセクション)にも多くのスクリプト例が記載されており、参考にして頂きたい。顕微鏡の操作についてはDM スクリプトが優れているが、画像解析については必ずしもDM スクリプトだけで完結する必要はなく、目的に応じて例えばPython, MatLab, ImageJなども相補的に組み合わせて行っていくことが望ましい。以上、簡単ではあるが、DM スクリプトを使ってみてみたいが実践には至らなかった方々に少しでもお役に立てれば幸いである。

本稿で紹介した研究は、日本学術振興会の科研費(17H01316, 17K18974)、特別推進研究(JP17H06094)、ナノテクノロジープラットフォーム事業(12024046)およびJST 先端計測による助成のもと遂行されました。また α -Si₃N₄はR. Riedel教授(ダルムシュタット工科大学)との共同研究であり、SrTiO₃の原子電場観察は関岳人博士、G. Sánchez-Santolino博士(東京大学)、S. D. Findlay博士(モナッシュ大学)との共同研究として遂行されました。ここに感謝を申し上げます。

文 献

- (1) <http://www.gatan.com/>
- (2) R. Ishikawa, A. R. Lupini, S. D. Findlay and S. J. Pennycook: Microsc. Microanal., **20**(2014), 99.
- (3) S. Oualine: O'Reilly & Associates, Inc., (1997).
- (4) A. B. Yankovich, B. Berkels, W. Dahmen, P. Binev, S. I. Sanchez, S. A. Bradley, A. Li, I. Szlufarska and P. M. Voyles: Nat. Commun., **5**(2014), 4155.
- (5) L. Jones, H. Yang, T. J. Pennycook, M. S. J. Marshall, S. Van Aert, N. D. Browning, M. R. Castell and P. D. Nellist: Advanced Structural and Chemical Imaging, **1**(2015), 8.
- (6) N. Shibata, S. D. Findlay, Y. Kohno, H. Sawada, Y. Kondo and Y. Ikuhara: Nat. Phys., **8**(2012), 611.
- (7) N. Shibata, T. Seki, G. S. Santolino, S. D. Findlay, Y. Kohno, T. Matsumoto, R. Ishikawa and Y. Ikuhara: Nat. Commun. **8**(2017), 15631.
- (8) R. Close, Z. Chen, N. Shibata and S. D. Findlay: Ultramicroscopy, **159**(2015), 124.
- (9) R. Ishikawa, S. D. Findlay, T. Seki, G. Sánchez-Santolino, Y. Kohno, Y. Ikuhara and N. Shibata: Nat. Commun., **9**(2018), 3878.
- (10) <http://www.dmscripting.com/>

★★
 石川 亮
 2011年3月 東京大学工学系研究科博士課程終了
 2011年4月 東京大学総合研究機構 博士研究員
 2012年10月 日本学術振興会海外博士研究員(米国オークリッジ国立研究所)
 2014年4月 現職
 専門分野: 電子顕微鏡, 機能性セラミックス
 ©先端電子顕微鏡法を用いた点欠陥などの局所構造解析に従事。
 ★★★



石川 亮 田中利空 柴田直哉 幾原雄一