

## 1. 組織観察

## 1-7 透過型電子顕微鏡を用いた組織観察

山本 剛久<sup>1)</sup> 小平 亜侑<sup>2)</sup>

## 1-7-1 はじめに

前回は<sup>(1)</sup>、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope; TEM) の構造と像を観察できる仕組みについて基本的な内容を概説しました。本稿では TEM を用いた組織観察法やその実例を二回に分けて概説します。前回も述べましたが、TEM は様々な優れた観察方法を有しています。ここで紹介する内容はそのごくごく一部でしかありません。前回<sup>(1)</sup>も紹介した参考文献等を必ず参考にしてください。

## 1-7-2 試料ホルダーへの TEM 試料の設置

## 1-7-2-1 試料ホルダーの概要と注意点

様々な仕様の試料ホルダー (以下、ホルダー) が用意されています。基本的なホルダーは、一軸 (傾斜) ホルダー (図 1 (a)) と二軸 (傾斜) ホルダー (図 1 (b)) です。図 1 (c) に示すように、一軸ホルダーはホルダー軸 (X 軸) を中心とした回転方向のみに試料を傾斜させることができ、図 1 (d) に示す二軸ホルダーでは、さらにその直角方向 (Y 軸) へも傾斜させることができます<sup>†1</sup>。試料を特定の結晶方位へ回転させる必要があるときには、二軸ホルダーを使用します。また、試料を複数設置できる図 1 (g) に示すような便利な特殊一軸ホルダーなども用意されています。基本的な取り扱いについては使用している TEM の取扱説明書を参考にしてください。ここでは、その他に配慮すべき点について説明していきます。

TEM 試料 (以下、試料) をホルダーに設置するときには、いくつかの注意点があります。まず、試料の汚染を防ぐためにホルダーを前にして話さないようにしましょう。マスクを

つけて作業するのが簡単で確実です。作業時の服装にも配慮が必要です。糸くずの飛散を防ぐためにも作業着などの着用を勧めます (毛糸のセーターなどは避けましょう)。当然ですが、真空内に挿入される部分 (図 1 (a), (b) に示した O リングから先端までの範囲) には直接触れないようにしてください。試料を設置する前に、実体顕微鏡を用いて O リングに付着した埃や試料設置箇所の汚れを取り除きます。他の利用者が用いた試料の汚れなどが、付着していることがありますので要注意です。

前回説明したように、ホルダーは数 mm 程度の空間 (対物レンズのギャップ) に挿入されていきます<sup>(1)</sup>。試料が平板状であればいいのですが、そうでない場合には思わぬ故障を招

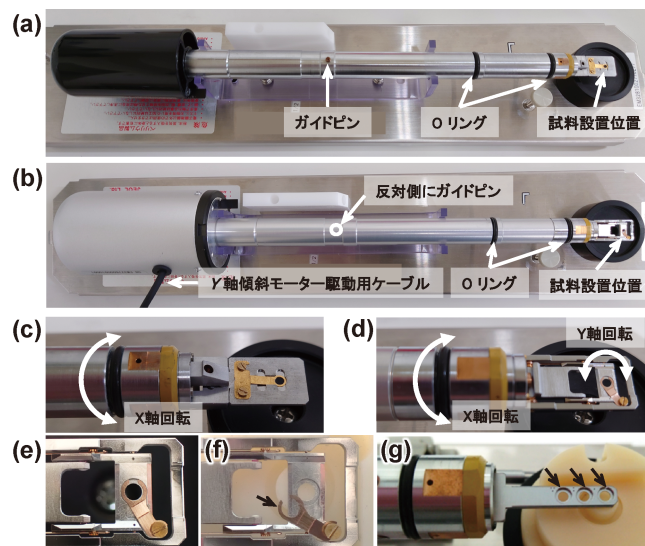


図 1 (a), (c) 一軸ホルダーの外観と試料設置部の拡大写真, (b), (d), (e), (f) 二軸ホルダーの外観と試料設置部の拡大写真. (f) は試料押さえ (図中矢印) をずらしている状態. (g) は試料を 3 個 (図中矢印位置) 設置できる一軸特殊ホルダー.

<sup>†1</sup> 図 1 (b) に示すように二軸ホルダーには Y 軸傾斜のためのモーター駆動用ケーブルが付属しています。このコードに不必要なねじりを与えてコネクターに挿入すると、試料がドリフトする原因になりますので注意してください。

\* 名古屋大学大学院工学研究科; 1) 教授 2) 技術補佐 (〒464-8603 名古屋市千種区不老町)

Keywords: transmission electron microscope, bright field image, dark field image, electron diffraction, selected area diffraction (透過型電子顕微鏡, 明視野像, 暗視野像, 電子線回折, 制限視野回折)

2022年 5 月30日受理 [doi:10.2320/materia.61.499]

いたり、傾斜角度が大きく制限されたりする原因にもなります。また、試料端部(観察に使用する薄片化された箇所)が湾曲している場合には、試料位置を適切な観察位置に移動できなくなることも生じます。金属系試料では、薄片箇所の湾曲が生じやすいため、試料の準備段階から配慮が必要となります。特に、試料調整時に打ち抜き機を使用した時には、試料外周部のバリに注意ください(図4(d)参照)。

### 1-7-2-2 ホルダーに試料を設置する時に知っていると便利なこと

観察される方の多くは特に考えることもなく試料をホルダーに設置されているかと思いますが、以下のことを考慮すると意外と役に立ちます。

**試料上下面の反転について：**仕様にもよりますが、TEMへのホルダー挿入は以下のような手順で行います。ホルダーには挿入時の回転位置を合わせるためのガイドピンがついています(図1(a))。ホルダーをTEMに挿入するときには、このガイドピンをゴニオに設置されている挿入口位置に合わせて挿入します(図2(a))。その後、予備排気を行い、図2(b)に示すように、二段階の回転操作を行いながらホルダーを挿入します。一段階目の回転を行うと、ガイドピンが内部のガイドに当たり回転が止まります。この回転位置では、ガイドピンがさらに奥に進めるような構造になっているため、ホルダーは大気圧に押されて鏡筒内へと自動的に引き込まれます。そして二段階目の回転を行い、所定の角度になると、一段階目と同様に鏡体内へ引き込まれ、ホルダー先端部が対物レンズのギャップ内へ引き込まれます(二段階目のホルダー回転時には、ガイドピンで内部のバルブを回転させます。このため一段階目よりも、ホルダー回転時に抵抗を感じま

す)<sup>12</sup>。この時に挿入される長さは一段階目よりも長いいため、ホルダーが一気に引き込まれないように力加減を工夫しながら慎重に、かつ、真っすぐに挿入していきます。ホルダーは大気圧で押されていますので、油断しているとガツンと引き込まれて故障の原因になります。コツとしては、図2(c)に示すように、片方の手(指)でホルダー軸を押さえながら挿入すると、ホルダー軸のブレも抑えられます。参考にしてください。

さて、挿入時にホルダーを回転させますので、ガイドピンの位置によっては、試料設置面が反転するホルダーも存在します。例えば、図1(a)に示した一軸ホルダーの場合には、ガイドピンが試料上面方向についています。このガイドピンを図2(a)のガイドピン挿入口の位置に合わせてホルダーを挿入する時点で、ホルダーの試料上面は、図2(a)の写真に向かって左側を向いた状態です。この状態から上述した二段階の回転操作を図2(b)に示すように行くと、ホルダーの試料上面は右回りに最終的に90°回転しますので、挿入前と挿入後では試料設置面の上下方向は変わりません(試料面上方は電子銃の方を向いています)。一方、図1(b)に示した二軸ホルダーの場合には、ガイドピンがホルダー軸の裏面についています(一軸ホルダーのガイドピンの位置に対して180°反対側です)。そのため、ホルダーの試料上面は、ゴニオメーターに挿入する時点で、右方向を向いていることとなります。その結果、挿入後には試料上面が下方向に向くこととなります<sup>13</sup>。試料の観察方向(試料に対する電子線の入射方向)が重要である場合は、試料の上下面(表と裏)を考慮して設置する必要があります。

**試料薄片部の形状を記録しておく：**実体顕微鏡の撮影機能を用いたり、スマホで撮影したりと方法はいくらかでも考えられますが、薄片化されている周辺部を含めて、試料の形状を記録しておくことで観察時に役立ちます。集束イオンビーム(Focused Ion Beam: FIB)を用いて準備した試料の場合には、TEMグリッドのどのピラーにTEM薄片が固定されているのか、ジェット研磨やArイオン研磨を用いて作製した試料の場合には、薄片化された穴の位置や、また、どのあたりが薄くなっているのかなどの全体像をメモしているとあとで困ることがありません<sup>14</sup>。分析する場合には、試料のどこの領域を分析するのかなどの情報も予め確認しておくといでしょう。このメモ書きですが、上述したように、ホルダーが挿入時に上下反転する仕様の場合には、そのメモも反転させて

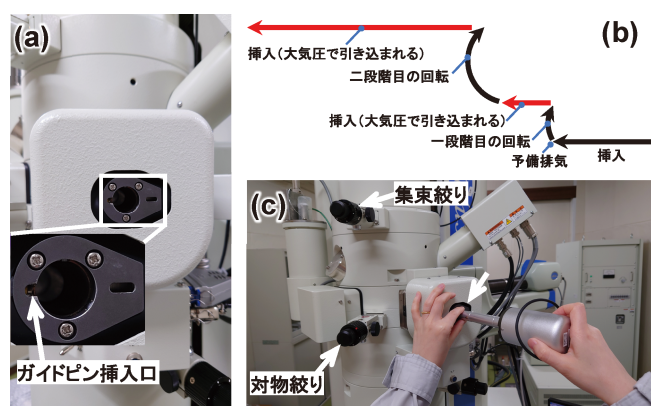


図2 (a) ホルダー挿入口の拡大写真、(b) ホルダー挿入時に行う二段階の回転方向(この二段階の回転で、ホルダーは最終的に右回り方向に90°回転します)、(c) ホルダー挿入時に軸ブレなどを防ぐための方法の一例。(b)に赤矢印で示す挿入工程では、大気圧に押されてホルダーが引き込まれますので、注意してください。(c)に示す写真では、左手の指(図中矢印)で、ホルダー軸を抑えています。強制的に引き込まれるホルダーを抑えることや挿入時に生じやすいホルダー軸のブレを抑えることができます。ぜひ参考にしてください。

<sup>12</sup> ホルダーを挿入するときには、真空漏れに十分気を付けてください。真空計を確認しながら、ホルダーに余計な力がかからないように操作してください。図2(c)を参照ください。

<sup>13</sup> カーボンメッシュなどを用いて粉末状試料などを観察、分析するときには、特に、ホルダー試料設置面の上下反転に注意してください。試料の落下などへの配慮だけではなく、EDS分析時の検出効率にも影響します。

<sup>14</sup> 薄片部が十分薄く調整できているか否かは、薄片端がリアス式海岸のようにギザギザな形状になっているかどうかで大よそ判断できます。また、セラミック材料などの絶縁体試料の場合には、薄片端に生じる干涉縞の間隔を目安にすることもできます。これらは、光学顕微鏡で十分確認できます。



おくことを忘れないようにしてください。

**ホルダーへの試料設置方向について：**TEM 観察の時には、同時に EDS を用いた組成分析を行うことが多いと思います。図 3 は、ホルダーと EDS 検出器の位置関係を示しています。EDS 検出器は、ホルダー軸に対して直角となる位置に配置されています。この位置関係を覚えておくことは、EDS 分析時に役に立ちます。TEM の操作モニター上に試料位置を表示する機能が用意されている機種では、その表示上で、ホルダーの移動方向や、EDS 検出器の位置を確認しておくといいでしょう。EDS は、1-3-1 エネルギー分散形 X 線分光法 (EDS) による元素分析の章で説明したように、試料から発生した特性 X 線を検出します。当然、検出素子に取り込まれる X 線量が多いほど検出効率は高くなります。例えば、図 4(a) に示した分析用二軸傾斜ホルダーの場合には、試料設置箇所裏面には EDS 検出器方向に向けたザグリ加工 (矢印 B) やテーパー加工 (矢印 A) が施されています (仕様はホルダーによります)。これは、試料から発生した X 線をできるだけ多く EDS 検出素子に取り込むための工夫です。このような EDS 検出器への X 線取り込みへの配慮は、試料を設置するときにも必要です。図 4(b) には FIB 加

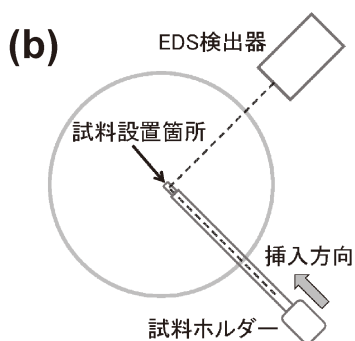
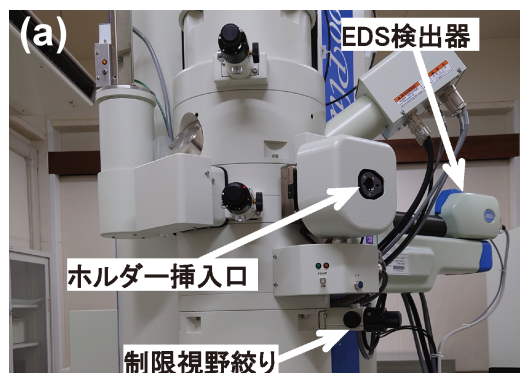


図 3 (a) ホルダー挿入口と EDS 検出器の位置関係を示す写真、(b) 電子銃側から見下ろした時のホルダーと EDS 検出器の位置関係の模式図。EDS 検出器の方向は、(b) に示すようにホルダーに対して右側 90 度方向に位置しています。この位置関係は、図 1 に示したホルダー写真において、一軸ホルダーの場合には下方向 (図 1(a))、二軸ホルダーの場合には上方向 (図 1(b)) になります (ただし、用いている機種や仕様によります)。試料設置箇所から EDS 検出器に向けた方向に、X 線を遮るような障害物などがないように配慮することが必要です。

工で仕上げた TEM 薄片を取り付けた TEM グリッドを模式的に示しています。TEM 薄片が固定されている TEM グリッドのピラー部分の厚さと TEM 薄片の厚さとを比較すると、TEM 薄片が EDS 検出器方向へ向くように TEM グリッドを設置することの必要性が理解できるかと思います。また、ジェット研磨を用いて試料を調整するときには、しばしば、薄片化された複数の穴が開きます (図 4(d))。この時には、できるだけ試料の中心位置に近い穴を、観察や分析に用いることも工夫の一つです。薄片部が湾曲している場合には、その箇所を確認し、X 線取り込みに対して障害とならないように、試料設置時に上下方向や傾斜方向を考慮してください。この時にもホルダーの上下反転に注意してください。

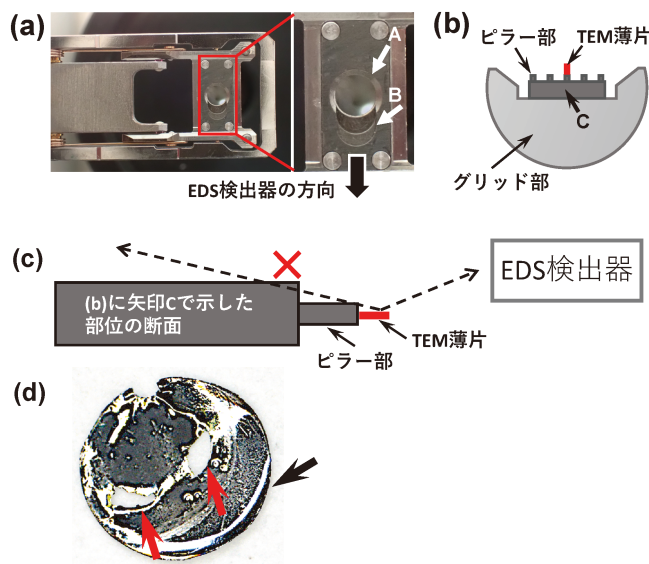


図 4 (a) 分析用二軸ホルダーの試料設置面裏側、および、その拡大写真。拡大写真において、矢印 A はテーパー加工されている箇所、矢印 B は EDS 検出器方向に処理されているザグリ加工を示しています。(b) FIB で加工した TEM 薄片を取り付けた TEM グリッドの模式図 (図中のピラー部分は、TEM 薄片を取り付けるための突起部分)、(c) EDS 検出器への X 線取り込みの模式図。(c) において、TEM 薄片から発生した X 線を効率よく EDS 検出器に取り込むためには、TEM 薄片を EDS 検出器方向となるように、ホルダーに設置することが重要であることが分かります。TEM グリッドを図(c)とは左右逆に設置してしまうと、図中バツ印を付けた方向に EDS 検出器が位置することになります。X 線の取り込み効率が低下するだけではなく、例えば、ピラー部などからの X 線も検出されてしまいます。(d) ジェット研磨によって調整した TEM 試料の一例。図中赤矢印で示すように複数の穴が開いていますが、できるだけ試料の中心位置に近い穴を、観察に用いることが適しています (もちろん、薄く仕上げられていることが優先ですが)。また、試料の外周部 (黒矢印) が湾曲している様子が分かります。これは、打ち抜き機を用いた加工時に試料の外周部が変形したことに起因しています (適切ではない例として示しています)。薄片化された穴の位置、その端部や試料自体の湾曲具合を確認して、上述したように試料から発生する X 線が遮られることなく EDS 検出器に向かうように、試料設置時には十分注意することが肝要です。

### 1-7-3 観察を行うための準備

**加速電圧の印加と電子線の発生：**鏡筒内が既定の真空度であること、各絞りが引き抜かれていること、対物レンズの Focus 値が基準値(基準値に設定するスイッチが用意されています)であることなどを確認します。特に対物絞りが対物レンズのギャップ内に挿入される仕様の場合には、ホルダー挿入時に互いに干渉することが考えられますので、必ず対物絞りが引き抜かれていることを確認してください。また、操作モニターを確認して、TEM 観察モードであること、スポットサイズ(Spot Size)の値<sup>†5</sup>、などを確認します。その後、加速電圧の印加、フィラメント電流の調整を行います。ただし、この方法は機種によって大きく異なりますので取扱説明書などを参考にして設定してください<sup>†6</sup>。操作モニター上に表示されるフィラメント電流値が規定値に到達したら、電子銃から電子が放出されています。倍率を低倍(1000倍程度)に変更し、Brightness ダイアルを回転させて蛍光板上まで電子線が来ているか(明るい部分が見えるかなど。図5の蛍光板上に見える明るい領域を参照)をまず確認してください。上記の操作を行っても蛍光板上に明るい領域が現れない場合には、試料の厚い箇所が電子線を遮っている可能性がありますので、試料位置を変更しながら、試料の無い(穴が開いている)箇所を探してください。試料を移動させるときには、蛍光板がより明るくなる方向へ動かしていくと、意外と簡単に穴の位置を探せます。また、100倍程度まで倍率を下げて観察ができる Low Mag モードを使用することもできます<sup>†7</sup>。試料設置時に記録したメモはこのようなときにも役に立ちます。それでも蛍光板上に明るい領域が現れない場合には、光軸が大きく狂っていることが考えられます。近年の TEM では、電磁レンズや偏向コイルなどの設定値が記録されていて、その記録ファイルを PC 上で再度読み込むことで、光軸を初期状態に戻すことができます。慌てずにこれを試してみるとよいでしょう。

**電子銃の調整：**電子銃から発せられた電子線を正しく電磁レンズ群へ導くための調整を最初に行います(光軸調整)。光軸の調整は、必ず、一番上、すなわち、電子銃から行っていきます。前回<sup>(1)</sup>説明したようにまず電子銃で最初につくられる光源(Gun crossover)の位置と軸(傾き)を調整します。ただし、この調整を間違えると以下すべての調整が台無しになりますので、TEM 操作に慣れるまでは熟練者もしくは管理者にお願いすることが無難です。簡潔には、フィラメント電流を規定値よりも少し下げたフィラメント像が見えるようにし

ます。その後、Gun tilt を調整してフィラメント像が対称形状もしくは、最も明るくなるように調整します。その後、スポットサイズを大きくしてから、Gun shift ダイアルで電子線を蛍光板の中心位置<sup>†8</sup>へ移動させます。次に、スポットサイズを小さくして、Beam shift ダイアルで中心位置へ移動させます。

**集束絞り位置の調整と集束レンズ非点の修正：**Brightness ダイアルを用いて電子線を広げてから、集束絞りを挿入します。絞り径が小さいほど明るさは暗くなりますが、電子線の

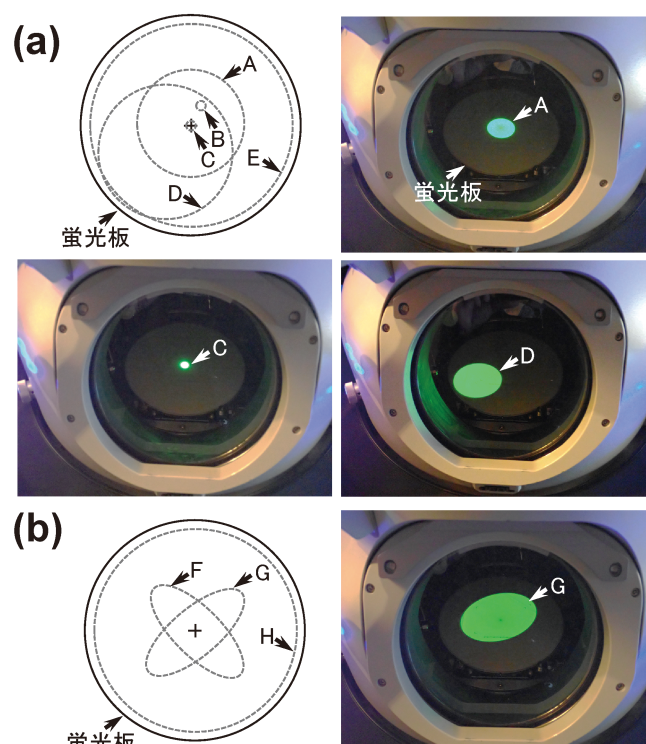


図5 (a) は集束絞りの位置調整に関する模式図と蛍光板を見下ろす方向からの写真(各写真は、模式図中に示す矢印 A, C, D の状態を示しています)。 (b) は、集束レンズの非点調整に関する模式図と蛍光板を見下ろす方向からの写真(写真は、模式図中に示す矢印 G の状態を示しています)。

**集束絞りの位置調整：**蛍光板の焼き付きを防ぐために、まず、集束絞りを挿入することを勧めます。電子線を少し収束させると、集束絞りの影が見えます(矢印 A)。この明るい領域が中心位置に来るように集束絞りの機械的な位置を調整します。次に電子線を収束させます。このときに矢印 B のように中心位置からずれている場合には、Beam shift ダイアルを用いて、中心位置に来るように調整します(矢印 C)。再び、電子線を広げると、集束絞り位置が適切でない場合には、明るい領域が中心位置からずれていきます(矢印 D)。この位置が中心位置に来るように、集束絞りの機械的な位置を調整します。

**集束レンズの非点調整：**非点が存在するときには楕円状になります(矢印 G)。この状態で、Brightness ダイアルを左右に回転させると、矢印 F や矢印 G のように形状が変化します。CL stigma ダイアルを用いて円状になるように調整します(矢印 H)。関連する写真は前回の図 6(a)にも示しています<sup>(1)</sup>。参照ください。

上記の調整終了後には、電子線を大きく広げると、蛍光板とほぼ同様の形状となります(矢印 E や H)。

<sup>†5</sup> これらの初期設定値については、経験者の意見に従ってください。

<sup>†6</sup> 近年の TEM では、操作モニター上に加速電圧印加、フィラメント電流調整を自動で操作できるボタンが用意されています。この時には、設定値が大きく狂っていないかを必ず確認してください。

<sup>†7</sup> LowMag モードにすると、レンズ条件が大きく変更されます。そのため、頻繁に利用することはあまりお勧めしません。

平行度は向上します。目的に応じて適宜選択してください。初心者には明るい方が操作しやすいと思いますので、大きい絞り径を勧めます。Brightness ダイアルを用いて少し収束させると、集束絞りの影が見えます(図5矢印A)。この状態で、集束絞りの機械的な位置を調整するダイアルを用いて、その影を中心位置へ大よそ移動させます。その後、Brightness ダイアルを用いて電子線を収束させます。蛍光板に照射跡が残らないように気を付けましょう。この位置が蛍光板の中心位置となるように、Beam Shift で移動させます。図5矢印Cは中心位置へ移動させた状態を示しています。次に、電子線を少し広げると、集束絞り位置が適切でない場合には、図5矢印Dのように明るい領域が中心位置からずれます。この明るい領域が蛍光板の中心位置となるように、集束絞りの位置を中心位置に移動させます。集束絞り位置が適切に調整されると、Brightness ダイアルを回転させたときに、常に蛍光板の中心位置を基準として明るい領域が変化するようになります。電子銃の再調整、電圧中心や電流中心の調整、スポットサイズの変更などを行なわない限り、一度定めた集束絞りの位置は基本的にはこれ以降変更しません<sup>†9</sup>。集束絞りの調整後に、集束レンズの非点調整を行います。図5(b)を参照ください。

**双眼顕微鏡の調整：**双眼顕微鏡のピント位置を、自身の目に合わせます。小蛍光板を挿入して、その中心にある黒点にピントが合うように片方の目で双眼顕微鏡の前後の位置を合わせます。次にもう片方の目で黒点にピントが合うように、接眼部のダイアルを回します。この調整を忘れると、像撮影時などにピントがずれる原因となります。

**観察場所の大よその選択：**試料の高さ調整を行います。対物レンズのFocus 値がリセット(基準値)されていることを確認してから、ホルダーのZ 値(試料位置の機械的な高さ調整)を変えて大よそピントが合うように調整します。慣れてくると、この操作だけでピントをきっちりと合わせられるようになります。この時のZ 値は、制限範囲内で変化させてください。この制限値を超えると、ホルダーが対物レンズのポールピース先端と接触します<sup>(2)</sup>。試料の薄片箇所が大きく湾曲しているときには、このZ 値の制限範囲内でピントを合わせられない場合が生じます。このときには他の観察場所を選択することは当然ですが、Z 値が制限値に近くなる観察場所も避けましょう。試料の傾斜角度が制限され、思わぬ事故の原因ともなります。

大よそのピントが合ったら、まずは試料全体を見渡しましょう。基本的には試料が適切に薄く調整されている場所を探します。十分に薄く仕上げられていることはもちろん重要ですが、湾曲ができるだけ少ない箇所であることや、この条件

を満たしていて、さらに、できるだけ試料の中心位置に近い箇所を選択することも重要です<sup>†10</sup>。観察箇所が、中心位置から離れるほど、試料傾斜時に試料が大きく移動してしまうことになります。また、EDS 分析を予定しているときには、EDS 検出器側に試料薄片端が向くような箇所を選択することもコツの一つです。まずは慌てずに全体を確認することが肝要です。

**対物絞りの挿入と調整：**制限視野絞りを挿入し、Brightness ダイアルで電子線を広げてから、回折モードに変更します。回折モードへ変更する前に電子線を広げておくのは、透過・回折斑点の強度を下げて、蛍光板の焼き付きを防ぐためです。回折図形の透過斑点が中心位置からずれているときには、PL alignment ダイアル(中間レンズの偏向コイル)で中心位置へ移動させます。また非点が認められるときにはIL stigma ダイアル(中間レンズの非点補正コイル)で調整します。非点調整は、電子線照射域に試料が存在しない状態にしてから、透過斑点だけを対象として行うことを勧めます。調整の方法は、図5に示した集束レンズの非点調整と同様です(調整に用いるダイアルは異なりますが)。ただし、回折斑点の強度は非常に高いため、蛍光板を焼き付けないよう十分注意してください。集束レンズの非点調整よりもやや調整しにくいと思いますが、コツとしては、IL stigma ダイアルを回転させて透過斑点が最も小さく(点状)なるように調整します<sup>†11</sup>。

対物絞りは、透過斑点が中心位置となるように対物絞りの機械的な位置を慎重に調整してください。この絞り位置のズレは、像質等に強く影響します。絞り径は各種用意されていますが、慣れるまでは複数の回折斑点が含まれる大きめの絞り径を用いると操作しやすくなります。調整が終わったら、像観察モードに戻して、制限視野絞りを解除します。

以上の調整は、文章で記述すると非常に手間がかかる作業のように感じられるかもしれませんが、慣れてくると自然とできるようになります。各種操作方法もここに記載した通りの順序で行う必要はありません。ここまで調整すれば基本的には観察が可能です。これ以外の調整については、以下の各項目において関連する箇所で説明します。

<sup>†10</sup> FIB 試料の場合にはTEM グリッドとの関係で必ずしも中心位置には来ません。例えば、より適切なTEM グリッドを選択するか、ホルダーに設置するときできるだけ試料位置が中心位置へ来るように調整してみるとよいでしょう。ジェット研磨で作製する場合には、円板状試料の中心部に必ずしも穴が開くとは限りません。試料設置時に位置調整が可能な場合には、できるだけ中心位置となるように設置しましょう。

<sup>†11</sup> IL stigma ダイアルに限らず、ダイアル類を回すときには、指を離さないようにして回転させることがコツの一つです。大きくずらした場合には、そのまま反対方向へ逆回しをすれば元の位置に戻すことができます。この操作法を身に着けておくと、各種調整がとんでもない値にずれてしまうことも防げますし、ダイアル変化に対する応答性の確認も容易になります。各ダイアルは、回転に伴う変化量を調整できるCoarse とFine の設定ができます。指を離さずに片手で回すときに、その変化量が少ない場合にはCoarse ボタンを押してから回転させてみるといいでしょう。

<sup>†8</sup> 中心位置は、蛍光板の中心位置を指しています。以下同様です。

<sup>†9</sup> EDS 分析時やNBD の時には適切な集束絞り径を選択しなければなりません。この時には再度集束絞り位置調整を行います。この調整が適切でない場合には、分析時のスポットサイズが想定されている大きさよりも大きくなってしまいます。



#### 1-7-4 明視野観察

前回<sup>(4)</sup>説明したように、正しくは、透過斑点のみが含まれるような対物絞り径を選択すべきですが、透過斑点に加えて複数の回折斑点が含まれていても構いません。初心者の場合には、対物絞り径が大きいほど観察が容易になります。図6に示すように、観察される像のコントラストは、対物絞り径が大きくなるほど低下します(同時に像の見え方も変化します)。像質は、コントラストが高いほど優れていますので、対物絞り径は小さいほど好ましいことになります。ただし、コントラストが高くなりすぎると細い情報が潰れてしまうこともあります。適宜、選択してください。対物絞りは、対物レンズの後焦点面位置に挿入されることになっていますが、その位置が大きくずれている機種や仕様もあります。この場合には、小さい対物絞り径を用いた低倍観察時において、観察される視野が制限されてしまうこともあります(対物絞りにケラれると表現されることもあります。図7参照)。試料を適切に移動して目的とする組織を見つけたら、そのまま撮影しても構いません。ただ、少し慣れてきたら、ここで試料を傾斜させてみてください。すると、像のコントラストや見え方が変化することに気づきます(図8)。これは、試料が傾斜することで回折条件が変化するためです。目的としている組織(場所)が、最も鮮明に観察できるように傾斜させます。例えば、試料が少し厚い箇所ではあるが、どうしてもその箇所で撮影を行わなくてはならないときにも、この方法を試してみても良いでしょう。コントラストを適切な状態に調整することができる場合もあります。

目的とする箇所にピントを合わせたら撮影です。初心者でピントを合わせることに慣れていない場合には、一度、大きくFocusをずらし、次に逆方向へ戻してみてください。この時に、Focusダイヤルから指を離さずに、片手で左右の回転を連続して交互に回すと、ダイヤル回転にともなうFocus変化を視認しやすくなります。違いが分からない場合には、Focusダイヤルの変動量を増やしておいても構いません。ただし、Focusダイヤルは対物レンズの励磁を変えるため、対

物レンズに流れる電流量を変えています。コイルに流れる電流量が変化しますので、熱的な安定性の観点からは、Focusダイヤルを大きく頻繁に変化させることはあまり好ましくはありません(数千倍程度の低倍率観察ではそれほど気にする必要はありません)。慣れてきたら、以下のようにピントを

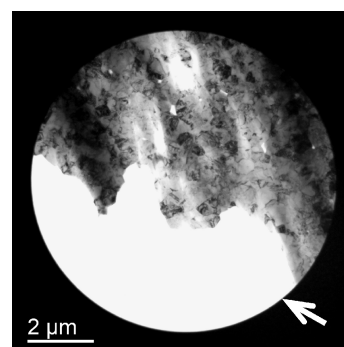


図7 図6(c)と同じ対物絞り径を用いた条件で倍率を低くすると、対物絞りの影(矢印で示した円形の影)が像中に現れることがあります。図6(c)は、30000倍で撮影し、この像は8000倍で撮影しています。影が生じる原因は、対物絞りの機械的な位置が、対物レンズの後焦点面位置からずれていることに起因します。対物絞りが、対物レンズのギャップ内に挿入される仕様の場合には、ここに示すような対物絞りの影が現れる倍率はより低倍となります。このような影が現れる倍率は、用いている機種の仕様によります。

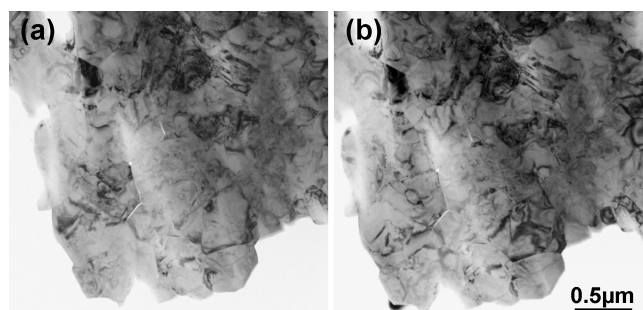


図8 数度程度、試料の傾斜を変えて撮影した明視野像の比較。僅かな傾斜でも像のコントラストは変化します。

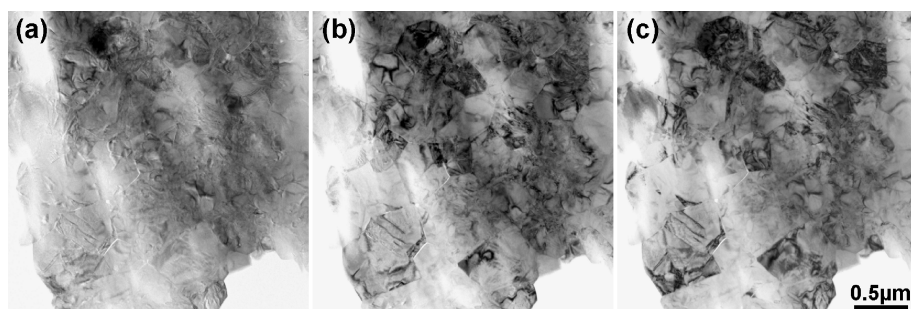


図6 対物絞り径を変化させたときの明視野像。用いた対物絞り径は(a) 120  $\mu\text{m}$ 、(b) 60  $\mu\text{m}$ 、(c) 20  $\mu\text{m}$ 。絞り径が小さくなるほど像のコントラストが高くなります。像の印象を大まかに表現すると、絞り径が大きいときには、“もやっ”とした印象となり、径が小さいときには、“きりっ”とした印象となります。また、対物絞り径を変えると、対物絞りに含まれる回折斑点の数も変化するので、単にコントラスト強度が変化するだけでなく、像の見え方自体も変化します。対物絞り径の選択や図8に示す傾斜などを工夫すると、組織の特徴などを適切に捉えることができます。

合わせる癖をつけましょう。まず、対物レンズを規定値にリセットします。この状態で、Z軸調整を用いてピントをできる限り合わせ(追込み)、最後にFocusダイヤルで合わせます。要は、規定値からの対物レンズ電流値(Focus値)の変化が最小となるようにします。

### 1-7-5 回折図形の撮影

回折図形をどの範囲で取得するかを決めてから、その位置を中心位置へ移動させます。そして、制限視野絞りを挿入して、その範囲が含まれる絞り径を選択します(正しくは、その範囲内となる絞り径です)。絞りの位置を中心位置となるようにします。Brightnessダイヤルで調整して電子線を広げます。制限視野絞りが挿入されていますので、電子線の広がり具合は、像が暗くなることで確認できます。そして、Diff modeスイッチを押すと、回折モードに切り替わります。カメラ長を選択し、上述したように、透過斑点をPL alignmentダイヤルを用いて中心位置へと移動させてください。

前回<sup>(1)</sup>も説明したように、回折図形撮影時には電子線が平行照射であることが必要です。電子線を少し収束させます。そして、電流中心の調整に使用するObjective lens wobblerを作動させると、電流中心の調整具合にも依存しますが、図9に示すように、円状の照射領域の径が変化しながら、振動する様子が観察されます。この状態からBrightnessダイヤルを使用して、照射領域をゆっくりと広げていき、照射領域の大きさの変化が最も小さくなるように調整します(電子線の位置は振動しています)。この時の集束レンズの条件が、平行照射に近い状態です。大きさの変化がよくわからない場合には、倍率を少し下げてみてください。変化や動きが分かりやすくなります。調整が終わったら、Objective lens wobblerを解除して、この照射領域のまま(Brightnessダイヤルは動かさずに)、制限視野絞りを挿入し、Diff modeスイッチを押して回折図形を確認します。回折斑点が点状でない場合には、Diff focusダイヤルで調整してピントを合わせます(最も小さい点状にします)。初心者の場合にはBrightnessダイヤルを用いて、電子線照射領域を十分に大きく広げるだけでも構いません(ただし、前回説明したようにBrightnessダイヤルの回転方向には気を付けてください<sup>(3)</sup>)。まずは、操作に慣れることが先決です。図10には回折図形の一例を示しています。参照ください。

ところで、回折図形撮影時に最も気を付けなければならないことは、蛍光板への焼き付き事故です。フィルムではなくてCCDカメラを用いるときには、さらにCCDカメラの焼き付きにも注意してください。回折図形の透過、回折斑点の強度は非常に高いことを忘れないようにしてください。CCDカメラの場合には、瞬時に焼き付きが生じます。初心者がCCDカメラを用いた回折図形の撮影を行うときには、必ず熟練者の指導の下で行ってください。

回折図形の撮影でしばしば問題となるのは、透過斑点と回

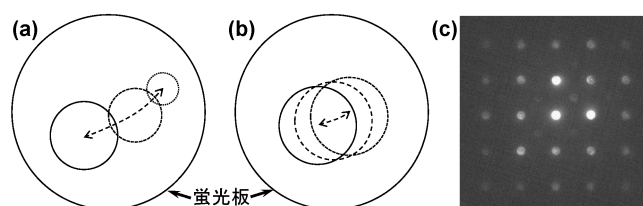


図9 集束レンズの平行照射条件設定に関する模式図。図(a)、(b)中に示した蛍光板上の円は、少し収束させた電子線の照射円を示しています(例えば、図5に示したような円状の明るい領域)。電子線を収束させて、Objective lens wobblerを作動させると、(a)に示すように、照射円の径が変化しながら矢印のように振動します(振動する方向は図に示した方向とは限りません)。この状態から、Brightnessダイヤルを回転させて電子線を広げ、(b)に示すように、その径の変化が最小となるように調整します(電子線の振動が止まる状態ではありません)。この条件を維持した状態で回折図形を観察したときに、(c)に示すように、斑点がディスク状(点状ではない)に見えるときには、Diff focusダイヤルで点状になるように調整します。TEM操作に慣れるまでは、照射領域を大きく広げて回折図形を撮影しても構いませんが、この時には、カメラ長の誤差が数%程度増加することを覚えておきましょう(透過波と回折斑点間距離の誤差が僅かに増加します)。

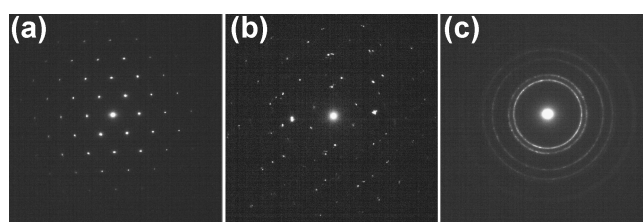


図10 制限視野回折図形の例。(a)は一つの結晶粒内に制限視野絞り径が入っているとき、(b)は複数の結晶粒が含まれているとき、(c)は非常に多くの結晶粒(微粒子)が含まれているときの回折図形を示しています。

折斑点の強度差がありすぎて、回折図形全体を適切に撮影できないことです。透過斑点をカット(遮る)するためのビームカットが設置されている場合には、これを用いて透過斑点をカットしてください。設置されていない場合には、やや厚めの場所に試料を移動させて撮影することも方法の一つです。CCDカメラでの撮影時には、電子線の強度を十分に小さくし(電子線を大きく広げる、より小さな集束絞り径を用いる、スポットサイズを小さくするなど)、CCDカメラの撮影時間(取り込み時間)を短く設定してから、例えば撮影回数を100回程度にして蓄積していく方法もあります。

### 1-7-6 像や回折図形の画質の調整

撮影した像や回折図形は、目的とする内容が伝わるように必ず画質の調整を行います。画質の調整には市販の画像処理ソフトを用いても構いませんが、ここでは、多くのTEMにインストールされていることの多いDigital micrograph(以

下 DM)を例にして説明します<sup>†12</sup>。図11(a)は例としてやや厚すぎる試料を撮影した明視野像を DM に読み込んだ状態を示しています。撮影されたままの像は、全体的に暗く、また、結晶粒内部の組織などが不明瞭です。この像の画質調整を DM ソフト上で行います。矢印 A の Display Control をクリックします。すると矢印 B に示すようにヒストグラムが表示されます。このヒストグラムの下に、ブライトネス(矢印 C)、コントラスト(矢印 D)、 $\gamma$  値(矢印 E)の調整スライダーが表示されています。図11(b)は、 $\gamma$  値を調整後、さらに、ブライトネス、コントラストを僅かに調整したときの画像を示しています。全体的に明るく見やすい画像に調整できていることが分かるかと思います(ただし、結局は十分に薄い試料を用いて観察することが重要です)。図11(b)に示す調整後の像は、ややコントラストが低すぎるような印象を受けます。再度、コントラストを少し強くした方が良いでしょう。

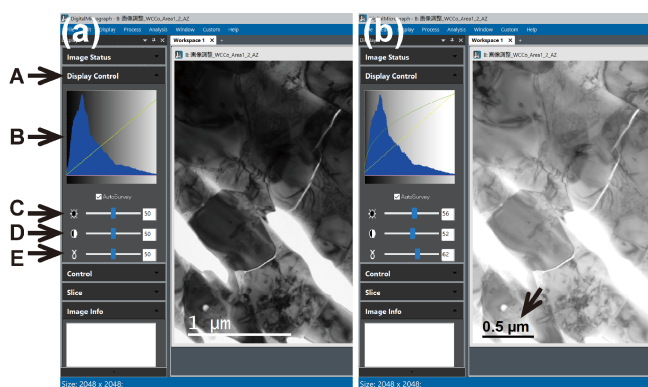


図11 Digital Micrograph の画面の一部と、その機能を使って行った画質調整の前後を示しています。(a)に示す画像に対して、C～E に示したブライトネス、コントラスト、 $\gamma$  値を調整し、さらに、スケールの表示を変更した結果を(b)に示しています。

れません。このような画質の調整は、伝えたい箇所が適切に見えるように視認しながら行えばそれで十分です。ところで、図11(b)の画像では、矢印で示すようにスケール表示も変更しています。このスケール表示の変更も簡単に行えます。図12に示すように、スケール近傍を右クリック(矢印 A)すると現れるコントロールパネル(矢印 B)で変更できます。図11(b)に示した例では、Foreground Color を黒色、Font は Arial に変更しました。さらに、矢印 A に示すスケールの四隅に現れる緑色の点をマウスでクリックしながらドラッグして少し縮めることで、スケールバーの大きさを  $1\mu\text{m}$  から  $0.5\mu\text{m}$  へと変更しました。図11(a)と(b)のスケール部分を確認してください。

また、画像を右クリックすると図13(a)のようなプルダウンメニューが現れます。例えば、この中の Image Info をクリックすると、図13(b)のようなコントロールパネルが現れます。このパネルは、Contrast(矢印 B)をクリックしたときに現れる表示です。矢印 D に示す Inverted をチェックすると、画像の白黒が反転します。この機能を利用して白黒反転

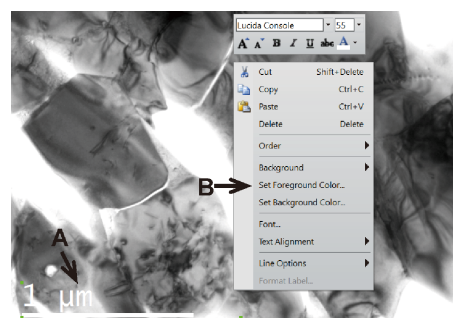


図12 図11(b)に示したスケール修正に関する方法。スケールを右クリックしたときに現れるプルダウンメニュー上で様々に変更できます。

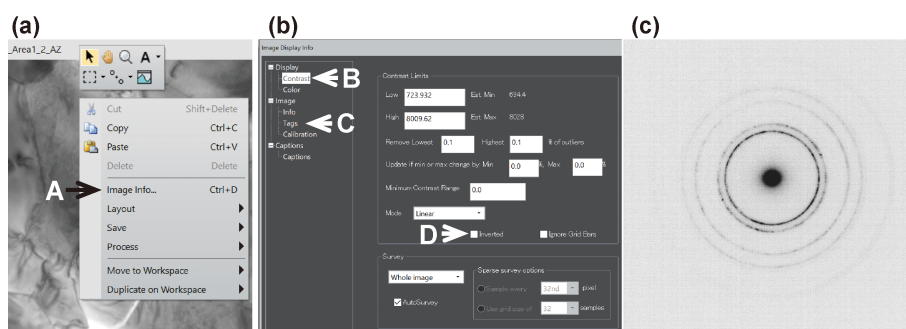


図13 (a) Digital Micrograph に読み込んだ画像を右クリックすると現れるプルダウンメニュー、(b) (a)に示したメニュー上の Image Info をクリックすると現れるメニュー、(c) は、(b)のメニューの矢印 D で示した Inverted 機能を用いて、回折図形のコントラスト(白黒)反転を行った例。

<sup>†12</sup> Digital Micrograph のフリー版(GMS, Gatan Microscopy Suite)は、Gatan 社の HP (<https://www.gatan.com/installation-instructions>)からダウンロード可能です。これ以外のフリーソフトとしては、Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>), GIMP (<https://www.gimp.org/>)などをお勧めします。



TEM の基本的な操作について概説しました。初心者の方は、必ず熟練者の指導の下で操作するようにしてください。特に、ホルダーの挿入操作、電子銃のアライメント調整、CCD カメラでの撮影などはくれぐれも事故が起こらないよう慎重に取り組みましょう。また、操作マニュアルを読みながら操作するときには、同じ状態の電子線を蛍光板や CCD カメラに長時間当て続けないよう注意しましょう。次回は、少し操作が難しくなる撮影方法や結晶方位の合わせ方などについて概説します。続きは次回61巻10号で！

- (1) 山本剛久, 小平亜侑: まてりあ, **61** (2022), 346-353.
- (2) (1)の「1-6-6-1対物レンズの構造」を参照.
- (3) (1)の「1-6-5照射系について」を参照.

以下の参考文献は, 前回<sup>(1)</sup>にも掲載しています. ぜひ参考にしてください.

★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★

1989年 東京大学大学院工学系研究科修士課程修了  
1997年 博士(工学)取得  
2011年6月 現職  
専門分野：セラミック材料学  
◎セラミック材料の焼結・組織・機能制御や、結晶粒  
界・界面の原子構造・電子状態制御・解析に関する  
研究に従事。

★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★