

研究報告書

葉山高等研究センター研究プロジェクト「物理を基盤とする生命科学」

位相差電子顕微鏡における Aharonov-Bohm 効果を応用した 無損失位相板の開発

研究課題代表者	永山 國昭
研究課題代表者	自然科学研究機構 生理学研究所
所属機関	岡崎統合バイオサイエンスセンター 戦略的方法論(ナノ形態生理)
研究期間	平成 18 年 7 月～平成 22 年 3 月

研究報告要旨

位相差電子顕微鏡に用いる、新しい原理に基づいた位相板の開発を行なった。位相差電子顕微鏡は、生物試料のような軽い元素(C、N、O)からなる試料の無染色観察に必須の技術である。従来の電子顕微鏡用の位相板は、FIB(フォーカスイオンビーム装置)などの超微細加工技術によって加工された炭素薄膜を用いていた。これは電子線が透過する際に感じる固体炭素の内部電位を利用するものである。しかし、薄膜による電子散乱があり、その散乱分は位相差像に寄与しないので S/N 比の劣化があった。新たに開発する位相板は、ナノスケールの磁性体細線が空間中に作るベクトルポテンシャルによって電子波に位相差を付加する。これは Aharonov-Bohm (AB) 効果として知られており、電子線が炭素膜のようなモノを通過しないので無損失が期待される。中心課題はナノ磁性体細線を中心に架橋した位相板作成技術の確立である。ナノ磁性体細線の作成手段として 2 つの方法を試みた: 1) 電子線ホログラフィーに使用されるパイプリズム(白金細線)を支持体として磁性薄膜をその上に作製、2) 無垢の白金細線から FIB 切削によりブレード状細線を作りそのブレード刃上に磁性薄膜作製。これら加工手法によって作製された位相板を電子光学的手法(コントラスト伝達関数(CTF))を用いて解析し、予想に近い AB 位相板性能を得た。

① 研究組織

代表者： 永山 國昭 （岡崎統合バイオサイエンスセンター 教授）

分担者： 湯川 哲之 （葉山高等研究センター 教授）

安田 浩史 （岡崎統合バイオサイエンスセンター 研究員）

大河原 浩 （生理学研究所 技官）

Radostin Danev （岡崎統合バイオサイエンスセンター 助教）

伊藤 俊之 （テラベース（株））

鈴木 正崇 （テラベース（株））

山本 和夫 （日本ファインセラミックセンター）

福永 啓一 （日本ファインセラミックセンター）

平山 司 （日本ファインセラミックセンター）

② 研究予算

平成 18 年度 ￥9,950,000

平成 19 年度 ￥8,630,000

平成 20 年度 ￥5,100,000

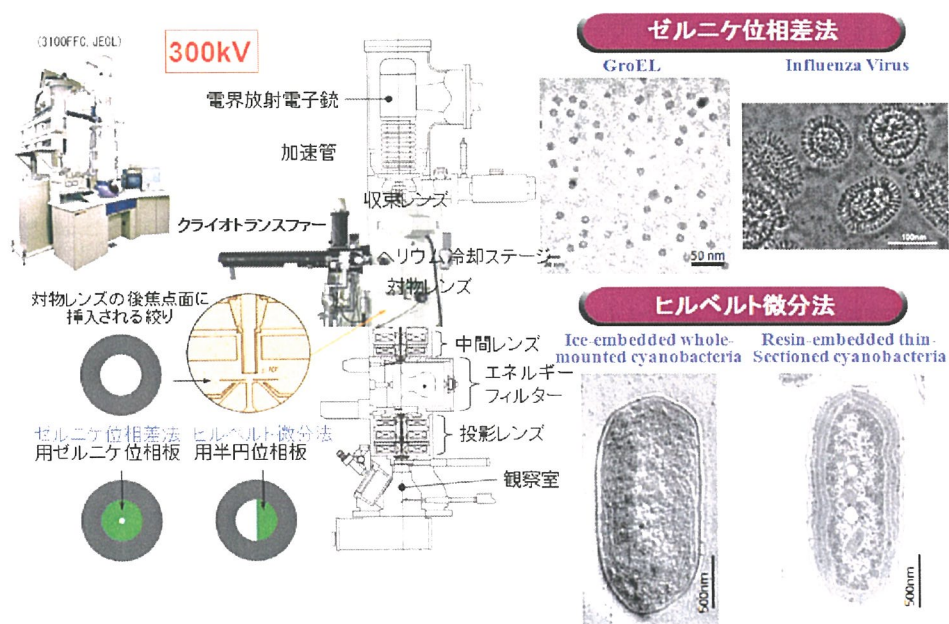
平成 21 年度 ￥4,200,000

③ 平成 18 年度以前の研究活動要約

i) 薄膜位相板（thin-film phase plate）の開発と完成

図 1 は、位相差顕微鏡における位相板の挿入位置を示す装置構成と従来法との性能比較を示したものである。30～60nm 厚の炭素薄膜位相板は、50～100 μ m の孔径を持つモリブデン製多孔絞り上に担持されている。位相板に用いられる炭素膜の加工はフォーカスイオンビーム装置（FIB）という微細加工技術を用いた。

図 1 300 kV 位相差電子顕微鏡の構成と位相差性能

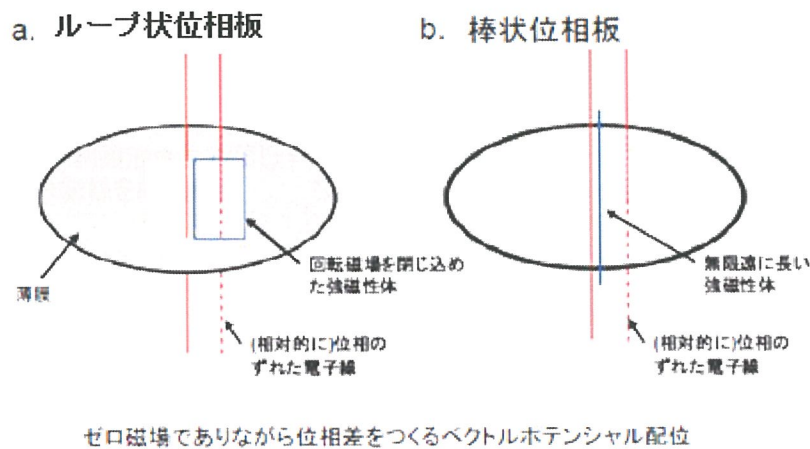


ii) 磁性体位相板 (magnetic phase plate)

概要にも述べたように、薄膜は電子線のロスを生む。そのためモノの内部電位の利用でなく電極等の作る電磁ポテンシャルによる位相差付加が無損失となり理想的と考えられてきた。電極（静電ポテンシャル）を用いるゼルニケ位相板のアイディアは、1947 年に H. Boersch により、提案されている。また、リング状微小磁性体の AB 効果（ベクトルポテンシャル）を用いるゼルニケ型の無損失位相板も 1988 年日立より特許出願されている（後に取り下げ）。静電ポテンシャルゼルニケ型位相板は、中心の微小孔部分（ $\sim 1\mu\text{m}$ ）のみに静電ポテンシャルを発生させる必要上、加工法には様々な困難がある。そのため、微小電極を用いる方法においても、微小磁性体を用いる方法においてもこれまで正しく機能する無損失位相板が作成されてこなかった。

われわれは、ゼルニケ位相板形状よりヒルベルト微分法に用いられる位相板形状が AB 効果の応用に適合していると考え（図 1 のヒルベルト位相板参照）、図 2 のような位相板（実体は板でなく磁性体細線だが）を提案した。

図 2 AB(Aharonov-Bohm)Hilbert 位相板



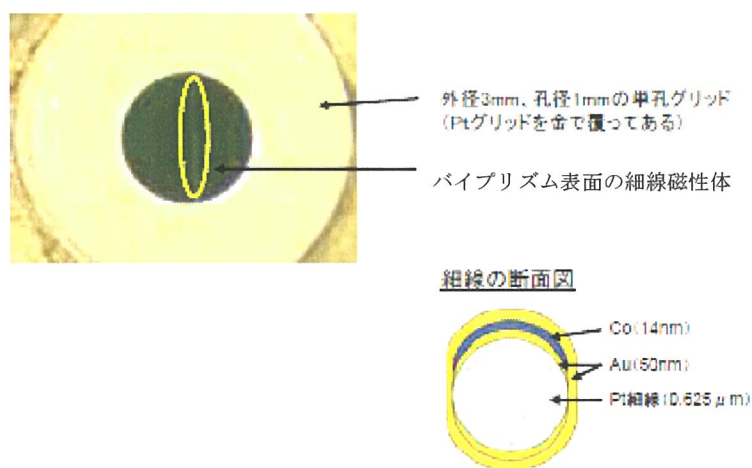
理想的形状はループ状位相板で、磁束が完全に磁性体細線内に閉じ込められていれば、ループ内外の位相差は閉じ込め磁化の大きさに比例し、さらに位相自体はループ内、ループ外でそれぞれ一様となる（図 2a）。環状磁性体細線は本プロジェクトスタート前の 2 年間半導体技術を駆使して作成を試みたが、外寸 $100\mu\text{m}$ で、線幅 $1\mu\text{m}$ の細線リングを作ることは極めて困難であり、2 年間の挑戦の結論として、断線なしの作製は不可能と判断された。

無限の棒は環の一部と考えれば棒状細線も AB 効果が期待できる（図 2b）。現実には、長い棒の中心付近、すなわち磁束の漏れのないところが AB 効果として利用される。こうして細線周りの左右半平面間に一定位相差が期待される。細線磁性体は強靱なウイスカ様支持体の上に $20\sim 50\text{nm}$ 厚の薄膜磁性体（コバルト、ニッケル、鉄）を製膜して作製されるが、このウイスカ様支持体として何を選ぶかが、棒状磁性体位相板製法の鍵となる。

④ 電子線ホログラフィー用パイプリズムの利用と性能検定（平成 18、19 年度）

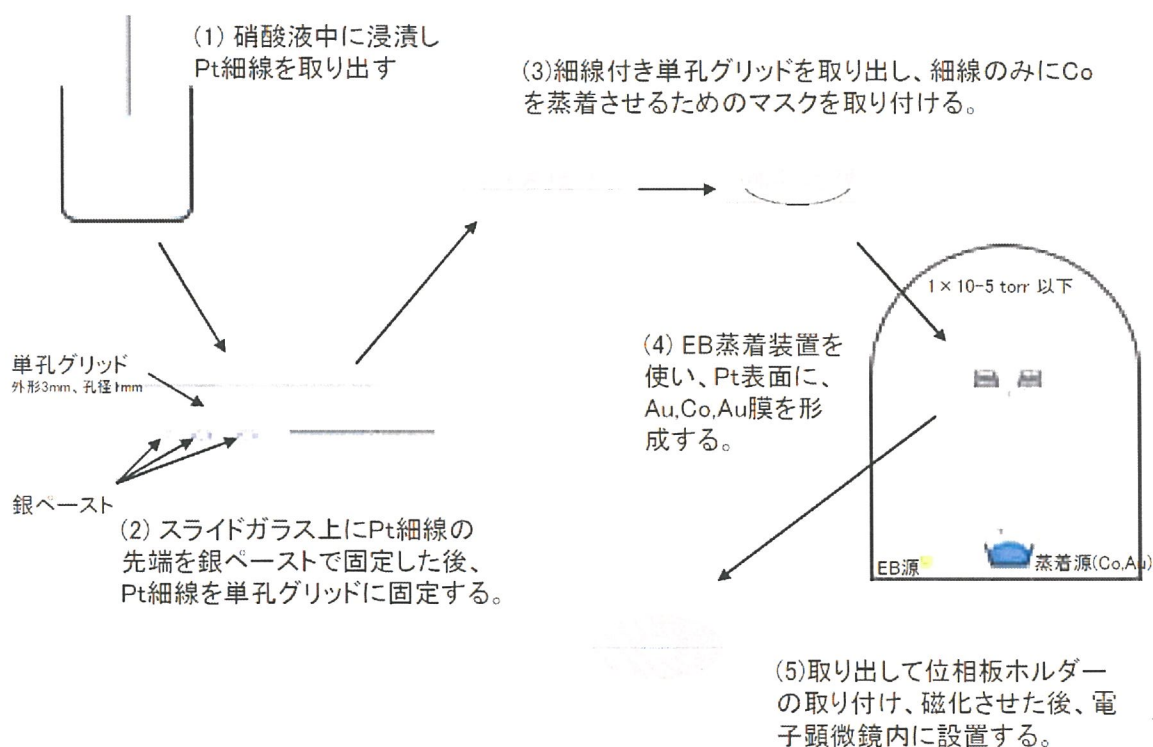
電子線ホログラフィー用パイプリズム（白金製、図 3 参照）は極めて細い直線の白金線できている。これを用いてその上に細線磁性体位相板を作製した。AB 位相板の構成図を図 3 の右下に示した。

図 3. 白金細線担持コバルト薄膜磁性体位相板



細線の加工法は、図 4 の手順に従った。

図 4. パイプリズムをベースとした AB 位相板加工法



パイプリズム本体の0.625 μ m直径の白金細線は極めて難しく、扱いが困難であり、磁性体細線の製作は難渋したが、6ヶ月の試行の末何本かの白金細線担持コバルト薄膜磁性体の作製に成功した。この細線磁性体を用いて、樹脂包埋培養細胞 (HEK293) の観察を行い通常法と比較したのが図5の結果である。

図 5. ME293 細胞樹脂包埋切片を用いたパイプリズム型 AB 位相板の性能検定

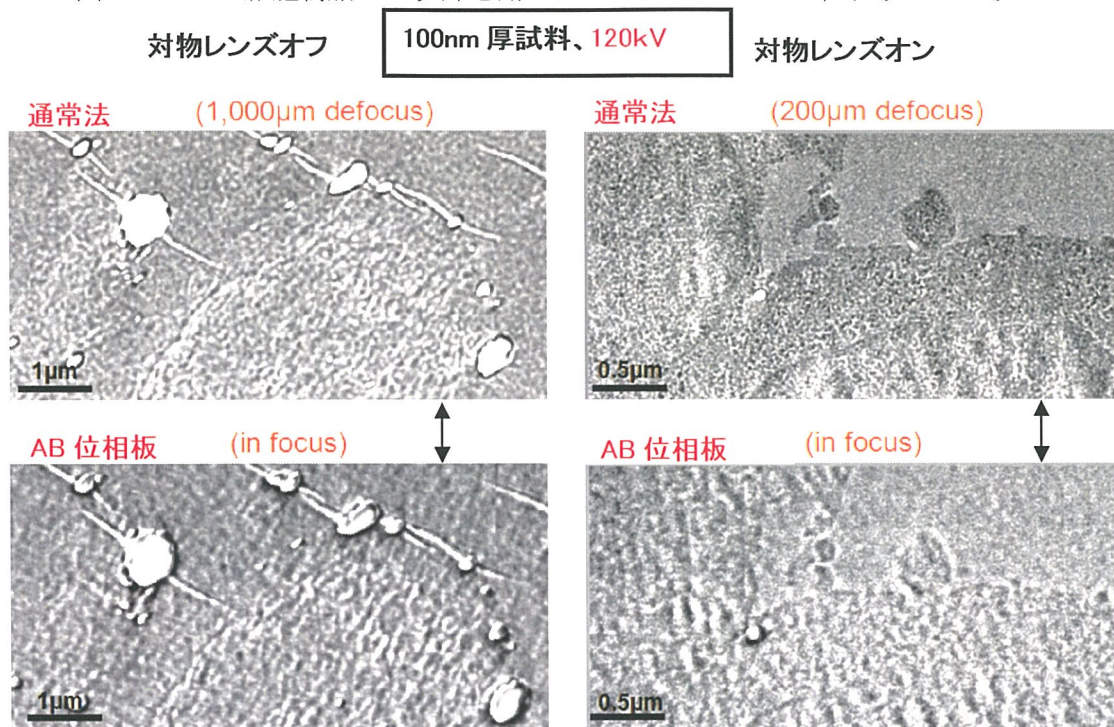
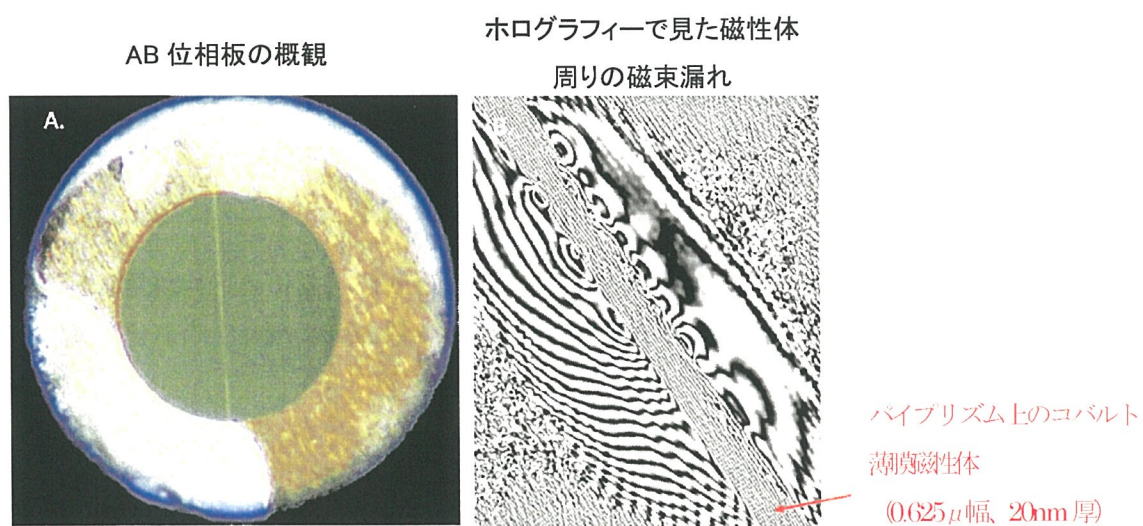


図 5 に見るように通常像と比較しても AB 位相板挿入観察においてコントラスト向上は明確に示し得なかった。そこでこの細線磁性体の磁場漏れ等を見るため日本ファインセラミックセンター (JFCC) の平山グループに協力依頼し、電子線ホログラフィーによる細線磁性体回りの位相変化を直接計測した。図 6 がその結果であり、本来磁性体に封じ込められるはずの磁束が局所的に漏れていることがわかった。こうした漏れがあると目的の位相差は得られない。

図 6. 電子線ホログラフィーを用いたパイプリズム型 AB 位相板の性能検定



⑤ FIB 加工による磁性体細線の作製（平成 19～21 年度）

細線磁性体を担持する基板としてバイプリズムの利用ではなく、10nm 直径の白金細線を切削し、日本刀（ブレード）形状の刃の上に磁性体薄膜を作製することを試みた。

ここではナノ加工法で使われるフォーカスイオンビーム装置（FIB）の適用による高精度ナノ加工技術と帯電除去のための種々の半導体クリーン技術の結合による加工法が中心テーマであった。具体的には以下の要素研究よりなっている。

要素研究

i) AB 位相板の FIB 加工

研究室現有と分子科学研究所（高精度）の FIB 装置を利用し、ナノ加工法開発を行った。H19～H20 年度で加工プロトコールは完成し、ほぼ希望通りの加工精度を持つナノ棒磁石が得られるようになった。特に 500nm より細くて長尺（100 μ m）のブレード形支持体加工が目標であった。

ii) 磁性体薄膜磁石の作製

各種磁性体（コバルト、ニッケル、パーマロイ）薄膜棒磁石を薄膜蒸着装置を用いて FIB 加工で作製された白金ブレード（たとえば 0.5nm \times 2 μ m \times 50 μ m）上に作製した。

iii) 細線棒磁石の高温制御と除帯電

初期の AB 位相板性能テストの結果、微小帯電に起因する不具合が認められた。帯電原因は 2 つある。1 つは絶縁性不純物（真空オイル、水など）。特に電子線が棒磁石にヒットしたとき、汚れが堆積する。これを除く効果的方法は、棒磁石の高温加熱である。2 つ目は使用金属由来の不純物である。後者は貴金属の塗膜で解決するはずであった。

iv) AB 位相板の性能テスト

作製された AB 位相板の性能を電子顕微鏡に現れるコントラスト伝達関数を用いた位相シフト見積もり法により検定した。また、電子線ホログラフィーによる位相検定法も用いた。

研究成果

i) 磁石デザイン

薄膜棒磁石の断面形状はコバルト材、パーマロイ材では、10～15nm 厚 \times 300～400nm 幅、ニッケル材では飽和磁化が半分なので 20～30nm 厚 \times 300～400nm 幅となる。

ii) FIB 加工法

10 μ m の白金丸棒から、長尺（アスペクト比 200 以上）で 200nm～500nm 幅のブレードを削り出す FIB 加工は、経験によるノウハウの固まりであり、全体像を記述するのは簡単でない。加工プロトコールの概略を図 7 に示した。加工法のポイントは、いかに帯電原因となる有機物を排除するかである（図 7A）。また、FIB 加工法も図 7B の他に多くのバリエーションがある。図 7C は加工途中の白金ブレードの FIB 様像である。

完成した AB 位相板の様子を FIB 撮像写真図 8 に示した。図 8B に 70 μm の長尺が、図 8C にはブレード刃端の磁石材ニッケル薄膜が見えている。

iii) AB 位相板性能テストと微小帯電問題 (H20 年度)

図 8 に示す位相板を対物レンズ後方の後焦点面に挿入し、カーボン薄膜を撮像 (非晶質像が見える)、そのフーリエ変換像に現れる Thon ring (図 9A 参照) を解析することで位相板による電子線位相変化がわかる。Thon ring コントラスト伝達関数 (三角関数型) を表現しており (通常これを CTF (contrast transfer function) と呼ぶ)、通常像と位相差像では、この伝達関数の関数型が正弦型から余弦型に代る。図 9B~D は、この伝達関数 (Thon ring の動径方向の 1 次元強度プロット) が示されている (B~D ではキュリー則に関係した温度処理効果を観測している。)。後焦点面は周波数空間に対応し、非散乱光に対応する中心ビームは周波数原点となる。位相板性能を見る実験での中心ビームと棒磁石の相対位置が図 3A に示されている。原点から棒磁石までの低周波範囲は通常像対応の正弦型伝達関数を、棒磁石より高周波数側は余弦型伝達関数となることが知られている。このことを利用し、それぞれの周波数範囲 (in、out と区別。in : 低周波側) の Thon ring プロットが B~D に示されている。Thon ring プロットは強度を示すので、本来負の値が正に折り返されており、正弦と余弦の関数型は一見位相が 180°ずれたように見えることに注意して B~D を見ると、次のことが理解される。

a) 棒磁石から充分離れ、磁場の影響がない相対位置 1 では、通常型 Thon ring が現れ、正弦型伝達関数(sin・CTF) がすべてのケースで実現している。 b) 棒磁石が中心ビームに近づく 2, 3 では、in と out で伝達関数の振動位相板がずれている。ただし、完全な 180° のずれではない。 c) B では、通常像に対応する Thon ring 伝達関数 1 (黒破線)、2in (青破線)、3in (赤破線) が同じ位相では重ならない。 d) C でニッケルのキュリー

図 8. FIB で作製された AB 位相板の概観

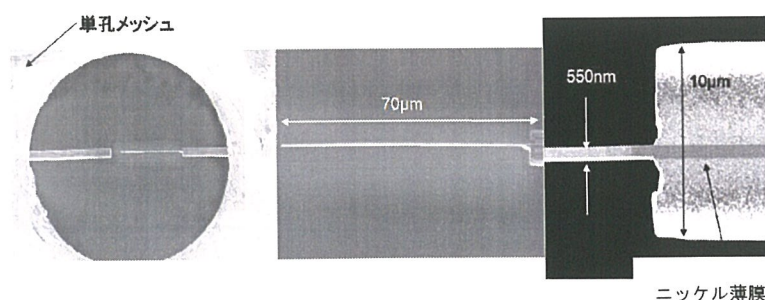
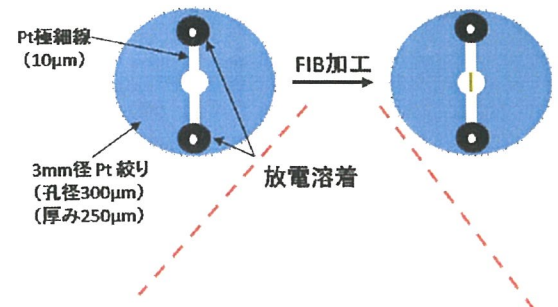
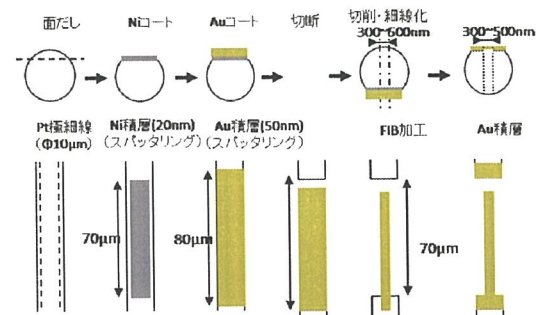


図 7. FIB による細線磁性体製法の概要

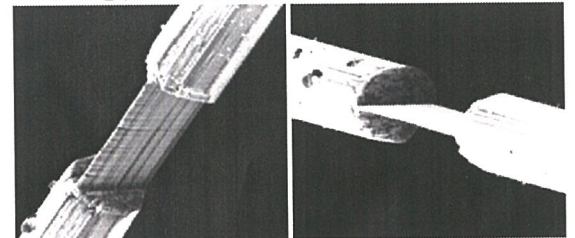
A. 有機物排除白金線架橋手順



B. FIB加工手順



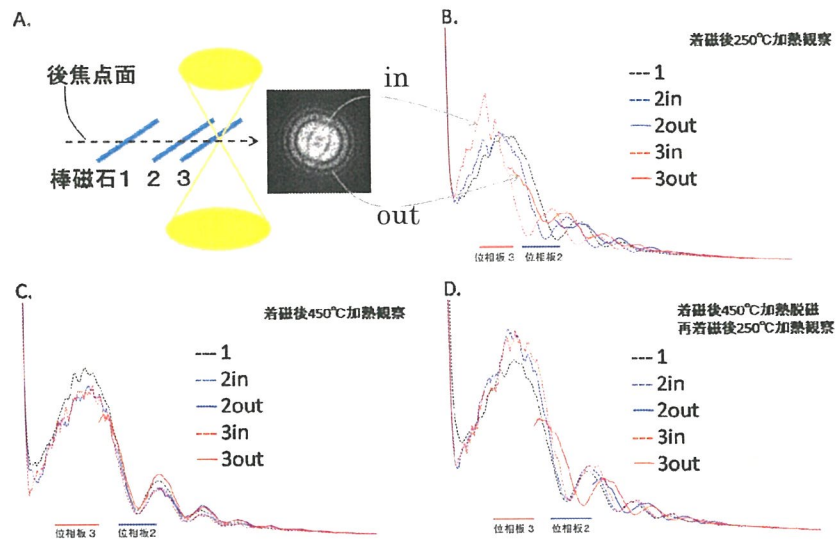
C. 加工途中の白金細線の切削ブレード



一点以上に加熱 (450°C) すると全ての Thon ring 伝達関数が通常正弦型と重なる。 e) 450°C加熱弱再着磁し、250°Cで観測すると通常像対応の 1, 2in, 3in の位相が重なった。また 2out, 3out のプロットは余弦型へのずれを示し、両者もほぼ重なった。

図 9. AB 位相板の性能テストーキュリー則と微小帯電

これらの結果は、250℃加熱でも微小帯電原因が無くならないこと (B)、キュリー一点の上で磁場効果が消失しかつ微小帯電も無くなること (C)、微小帯電除去後の AB 位相板は、期待通りの挙動を示すこと (D) を示している。こうして微小帯電除去の徹底には、高温処理または高温保持が必要であることがわかった。



④ 帯電問題の徹底追及 (H21 年度)

i) 帯電原因の探求

H20 年度の結果はその後再現性に問題のあることが判明した。有機物除去後にも残る帯電原因として、金属酸化物が浮上したのである。図 1 にキュリー一点以上の高温での AB 位相板の挙動を示す実験結果を示した。600℃では Ni 磁石は磁性を失う。にもかかわらず磁性体細線近傍で電子線は何らかの位相変化を受けている。具体的には領域 1 (近位) と領域 2 (遠位) の位相差は Thon ring より見積もった CTF の差から見てとれる。原因として細線上の帯電以外は考えられない。試みに強力な透過光電子ビームを磁性体細線に直接照射すると Thon ring が大きくゆがみ、帯電原因が電子線により誘導されることが分かった。

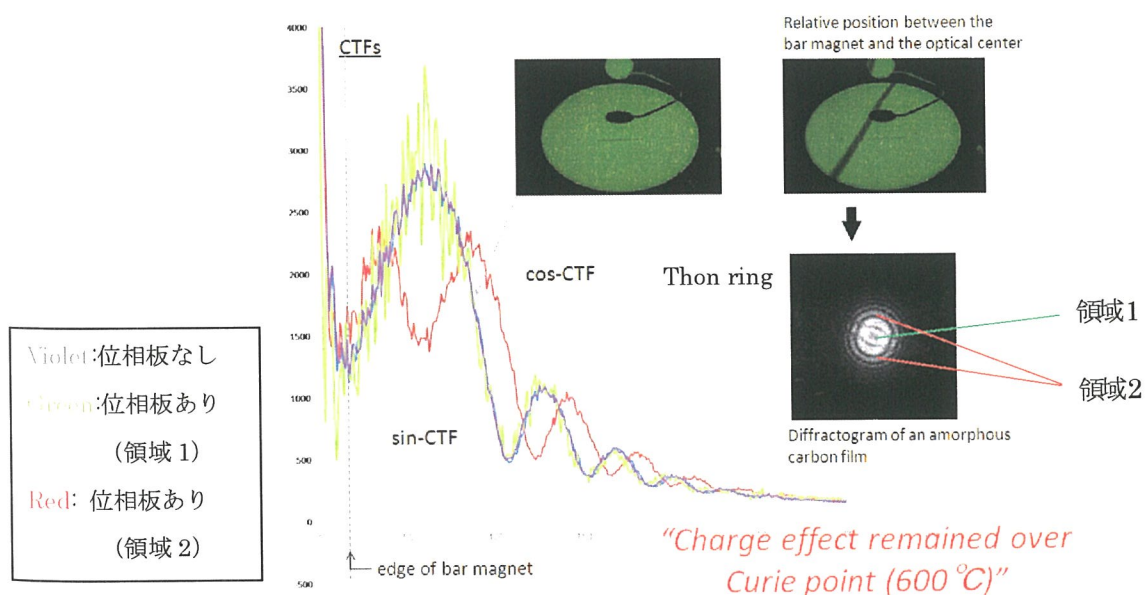
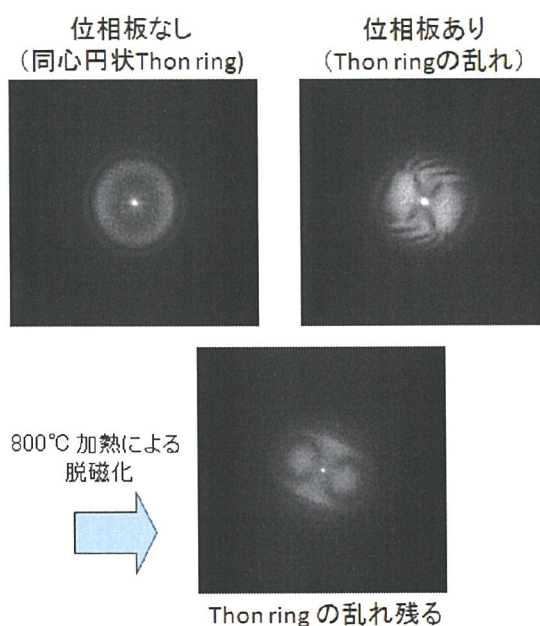


図 10. CTF で見た高温における Ni 磁石 AB 位相板の挙動

そこで帯電原因が持ち込まれる加工工程を見付けるために、磁石材をのせていない白金支持体まで戻って再検討を行なった。結果を図 11 に示す。ここではまず無垢の白金線自体が 800℃の高温処理で有機物除去を完全に行っても帯電することが分かった。この事情は高温に保ったまま帯電テストしても変わらなかった。さらにこの白金線を金蒸着した後やはり高温（500℃）状態で帯電テストを行ったが帯電を除去できなかった。

図 11. 高温状態での AB 位相板の位相変化計測（Thon ring 計測）

中心ビームを AB 位相板細線に近付けたときの電子位相変化のテスト



これらの結果は有機物以外の帯電原因の存在を示唆している。考えられるのは塩のような無機物か金属酸化物である。塩は水を用いてクリーン化で除去されているので金属酸化物が最終的に候補として残った。そこで白金、金の不純物として含まれる金属の量を推定した。その結果が表に示されている。

表. 貴金属中不純物の真空度等価値

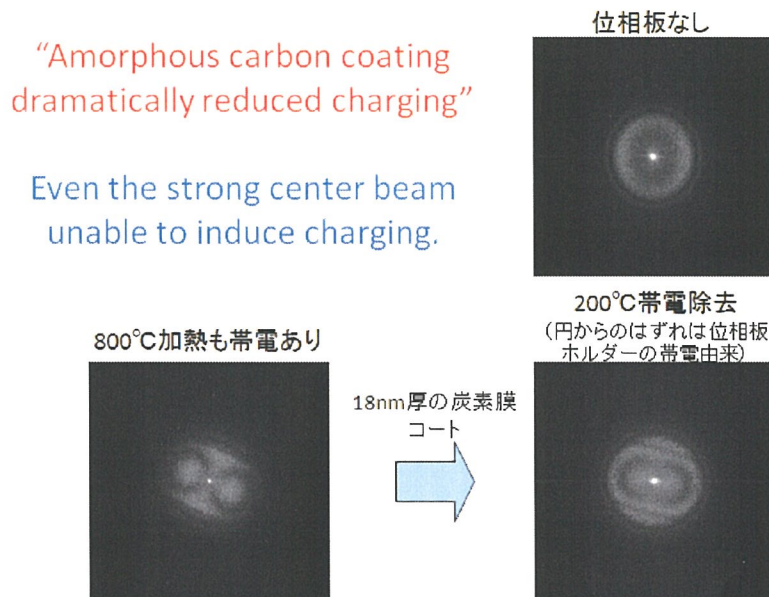
通常純白金 (99.9% Pt)	…	100 Pa (10^{-3} atm)
通常純金 (99.99% Au)	…	10 Pa (10^{-4} atm)
高純度純金 (99.999% Au)	…	1 Pa (10^{-5} atm)
電頭中の真空度	…	10^{-5} Pa \sim 10^{-7} Pa

不純物量を数密度として真空度で換算すると表のように市販白金で 100Pa、市販金で 10Pa、最高純度金で 1Pa であった。これは極めて悪い真空度に対応し電頭中の到達真空度の 5～6 桁悪い数字である。すなわち不純物の内 10%でも金属であればその量は数密度的に莫大で高温処理で金属酸化物に変容したとしても不思議はない。金属酸化物は典型的絶縁体であり、電子線照射で強く帯電する。この発見は帯電のシールドとして貴金属が使えないことを意味している。従来の電頭では帯電除去として貴金属コートが最良手段と考えられてきた（貴金属のみ酸化しないため）。しかしそれは程度問題で位

相変化に敏感な焦点面に置かれた位相板用材料としては、不純物のため不適格なのである。この従来の常識を覆す発見は無帯電化のためのシールド材として何が最適かにつき再考を求めた。

炭素膜を用いる薄膜位相版では加工法の最終工程で炭素薄膜コートにより帯電物を無帯電化シールドする。従って炭素膜が最適材として浮かび上がった。そこで炭素蒸着した $10\mu\text{m}$ の無垢の白金細線を用いて帯電テストを行った。その結果が図 12 である。

図 12. 白金細線の炭素膜コートによる無帯電化テスト (Thon ring 計測)



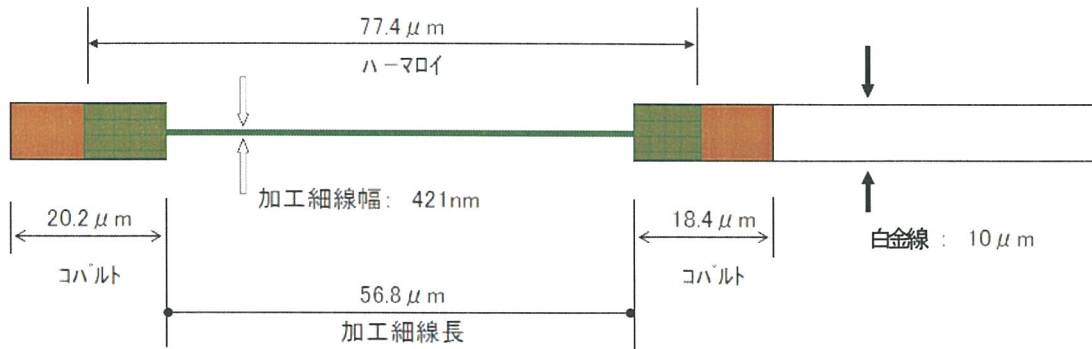
結果は炭素コートにより無帯電化できることがわかった。現状では、あらゆる物質の中で炭素のみが位相板無帯電化に使用可能な唯一のものである。

ii) 新規デザイン AB 位相板の作製

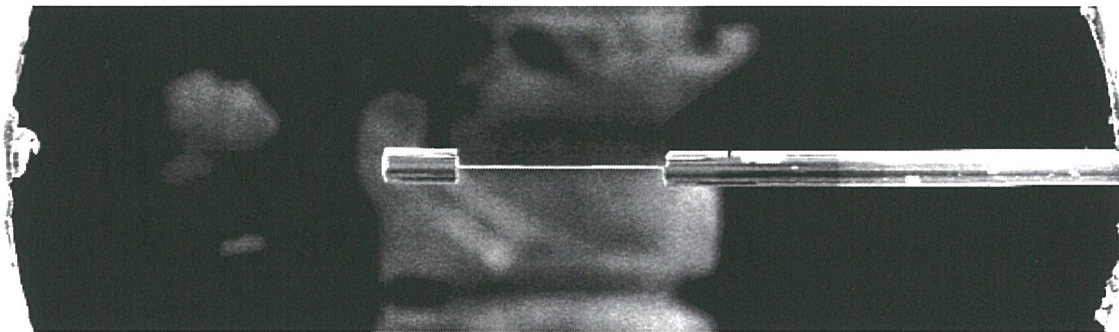
上記結論を受けかつ磁束漏れのない新規 AB 位相板デザインを行い、炭素膜コートした飽和条件パーマロイ磁性体細線を用いた実験結果が図 13 に示されている。新規デザイン条件は 2 つである。i) 磁束漏れを防ぐため飽和磁性体利用、ii) 帯電防止のための炭素膜コート。新規デザイン (図 13A) では磁性体として外部磁場で容易に飽和するパーマロイを用いた。外部磁場源としては AB 位相板細線の両端にコバルト磁石を図 13A のように置き強磁場化で着磁した。以前観測したコバルト、ニッケル磁石利用の AB 位相版では明確な磁束漏れがあったのでこれらの磁石は簡単には飽和しないと考えられる。そこで飽和容易なパーマロイを利用し外部磁場源としてのみ非飽和条件のコバルトを使った。出来上がりの新規デザイン AB 位相板の概観を図 13B にした (FIB 観察)。

図 13. 新規デザイン AB 位相板

A. AB 位相板デザインと加工寸法



B. FIB 観察による新規デザイン AB 位相板

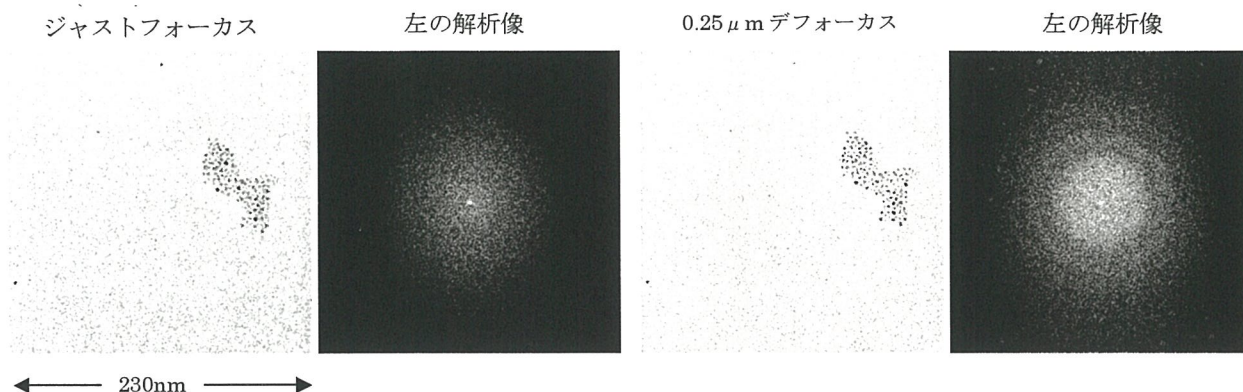


iii) 新規 AB 位相板を用いた実験

最終成果として上記新規デザインの AB 位相板を用いた実験結果を示す。これは現在到達している最良の結果である。図 14 に図 13B に示す新規 AB 位相板の中央近傍に収束電子線ビームを設定した時の 3nm 金コロイドの位相板像を通常像と比較して示した。

図 14. 3nm 金コロイドを試料とした新規 AB 位相板の性能テスト (×50,000)

A. 位相板が無い状態



B. 新規 AB 位相板によるヒルベルト微分像

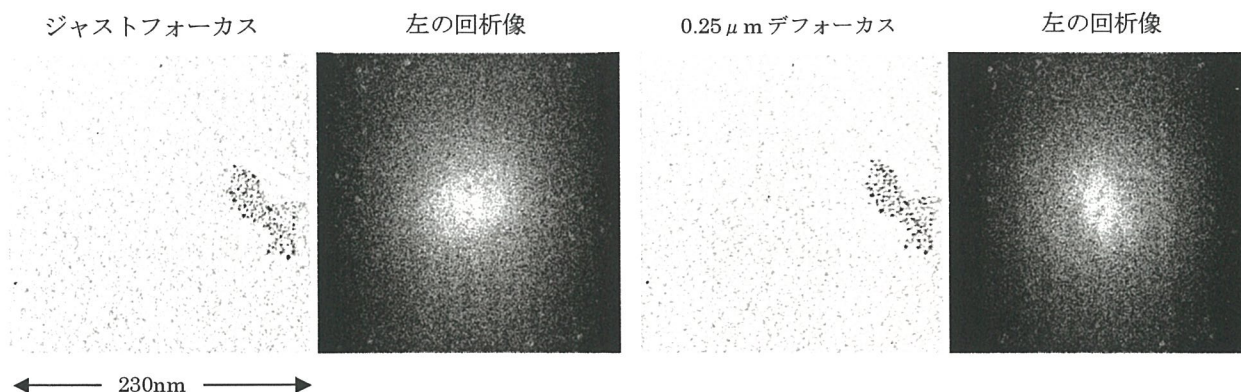


図 5A、B を比較すると新規 AB 位相板挿入時の金コロイド像は明らかにヒルベルト微分的様相を呈しており、かつコントラストは図 5A に示す通常像より高い。これはジャストフォーカス、デフォーカス両条件で同じであった。

しかし回析像に現れる CTF 性能で見ると新規 AB 位相板の Thon ring (CTF 対応) は同心円からやや外れており (傾いた平行線は図 1 に述べた電子線ビームと AB 位相板細線の距離を反映)、まだ磁束漏れがあると考えられる。しかし帯電問題は完全に解消された (特許化予定)。残された課題は、磁束漏れ防止すなわちパーマロイ磁性体の完全飽和条件 (外部磁場強度と細線表面の平滑化制御) 加工法の探索である。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)

なし