実験技術

水中での走査顕微鏡観察

セイコー電子工業(株)基礎技術研究室 村松 宏

1. はじめに

生体試料をその機能状態を維持したまま観察するためには、多くの場合、生体試料を水中に保持して観察を行う必要がある。これまでに、光学顕微鏡を用いて、波長より小さな物質を観察するための可視化技術が開発されているが、より面分解能の高い観察手法として、走査型プローブ顕微鏡をあげることができる。走査型プローブ顕微鏡の代表的なものに、走査型トンネル顕微鏡 (STM) と原子間力顕微鏡 (AFM) があるが、STM では、試料に導電性を有する必要があるため、その応用例は、固定されたDNAの観察等に限定されている。このため、本稿では、より利用範囲の広いAFMの水中観察技術について紹介し、さらに、新しい観察手法である走査型近視野顕微鏡の水中観察技術について紹介する。

2. 水中でのAFM観察技術

AFMの制御方式には、試料表面にカンチレバープローブが近づいたときのカンチレバーたわみを検出するコンタクト制御AFM (C-AFM) とカンチレバープローブを振動させるダイナミック制御AFM (D-AFM) とがある。C-AFMで水中観察を行う場合には、図1に示すように、基本的には、サンプルとプローブを水中に保持する構造にすればよい。この場合、プローブのたわみを検出するためのレーザー光の光路が、水と空気の屈折率の差によって、変化することを測定の際に考慮する必要がある。

水中でのAFM観察では、空気中において問題となる試料表面の吸着水によって生じるサンプルプローブ間のキャピラリフォースが存在しないことから、サンプルプローブ間をより弱い力で制御することが可

図1 液中C-AFMの模式図。

図2 人染色体の液中C-AFM像²⁾。

能であり、プローブがサンプルに与える影響をさらに小さくすることができる。

図2は、水中のC-AFMで観察した染色体の3次元化した画像である。染色体試料は、ヒト白血球を浸透圧差で破壊することで、膜外に放出され水面に展開した染色体をシリコン基板に附着させたものである。図2において、基板に張り付いた部分について、観察領域を狭めて高分解能の観察を行うことで、染色体内部のDNA鎖 (ヌクレオソーム) を観察することもできる²⁾。

D-AFMによる観察を行う場合は、サンプルを振動させるタイプ³⁾とプローブ側を振動させるタイプ⁴⁾の2種類がある。サンプルを振動させるタイプでは、サンプルを振動させることによって、プローブがサンプルに近接したときに、サンプルの振動に同調して振動するため、このプローブの振動が一定になるようにサンプルプローブ間の距離を制御するものである。プローブを振動させるタイプでは、共振点付近で、プローブを励振して共振させ、サンプルに近接することによって生じるレバーの共振特性の変化を検出するものである。このD-AFMモードでは、サンプルにプロー

Scanning probe microscopy in water

Hiroshi MURAMATSU

Research Laboratory for Advanced Technology, Seiko Instruments

ブが周期的に接近するため、C-AFMのようにサンプル表面に横方向の力が加わることがなく、C-AFMに比べて、サンプルに損傷を与える危険性が少ない方法といえる。

これらの水中D-AFMにおいて、実際にカンチレバーの共振特性を測てみると、空气中で観察される本来の共振ピーク以外にいくつかの共振ピークが観察されることがある。これらのいずれの共振ピークに、励振周波数を設定して、カンチレバー振動の変化から、サンプル-プローブ間を制御することは、可能であるが、より安定な測定を行うためには、プローブおよびセルの構造を最適化することが重要である。

3. 水中での近視野顕微鏡観察

走査型近視野顕微鏡 (SNOM) は、従来の光学顕微鏡の分解能が、波長の1/2程度しか得られないのに対して、波長の1/20程度の分解能の光学像が得られることが期待されることから⁵⁾、今後、生体試料観察の手法として、有望な技術であると考えられる。SNOMでは、基本的に、図3に示すように、波長より小さな開口を有する光学プローブを波長より短い距離にサンプル表面へ近づけることによって、光近接場効果を得るわけであるが、このサンプル-プローブ間の距離を保

図3 走査型近視野顕微鏡の原理図。

図4 液中測定用SNOAMの模式図。

つ手段によって、SNOMを分類することができる。このZ軸距離制御法としては、主に、STM、エバネッセント光強度、シェアフォース、AFMが挙げられる。

本稿で紹介するAFM制御の走査型近視野顕微鏡 (走査型近視野原子間力顕微鏡: SNOAM) は、光ファイバプローブを折り曲げることによって、光ファイバプローブをAFMプローブとしても使用可能にしたものである⁶⁾。このSNOAMを用いて、液中観察を行う場合には、図4に示すように、試料を液中に浸漬するため、試料台部分を液がたまる構造にし、プローブ全体が液中に浸漬されるようプローブ上面にガラス板を設け、液体の表面張力によって、液が保持されるような構成にする。アルゴンイオンレーザー光が光ファイバ端面から入射され、プローブ先端の開口からサンプル表面に光が伝達し、サンプル表面で散乱した光は、サンプル下方の対物レンズで集光され、光検出器で検出される。

ここで用いられる光ファイバプローブは、エッチングによって、先端を50~100 nmに調整した後、炭酸ガスレーザーによって、加熱することによって先端の折り曲がった形状を形成するとともに、光でこのミラー面を機械研磨によって形成した。プローブは、真空蒸着によって、金属でコートし、先端部分に開口を形成した。

125 μm 径の光ファイバプローブを2~4 mmの長さにはマウントしたときのカンチレバーとしてのバネ定数の計算値は、2~20 N/m程度である。光ファイバプローブの共振特性は、シリコンカンチレバーと異なり、液中に浸漬することによってもはっきりしたピークを持つことが確認されている⁶⁾。この特性の違いは、シリコンカンチレバーが、平板に近い形状をしているのに対して、光ファイバプローブが、液体の抵抗を受けにくい円筒形をしていることに起因すると考えられる。光ファイバプローブの共振周波数は、例えば、空气中では23.0 kHzのプローブが、水中では19.5 kHzに減少するというように、約15%低下する程度である。また、水中でプローブの振幅を変化させた場合でも、共振周波数は変化せず一定値を示す。この空气中と液体中での共振周波数の変化は、液体中で振動する物体に対する液体の付加質量であることが考えられる。円柱に対する液体の付加質量は、 $m_{\text{liquid}} = \pi \rho_{\text{liquid}} r^2 l$ (ここで、 ρ_{liquid} は、流体の密度、 r と l は、円柱の半径と長さである) のように円柱と同体積の液体の質量として与えられる⁷⁾、共振周波数は、 $\omega = \sqrt{k / (m_{\text{cantilever}} + m_{\text{liquid}})}$ で与えられるので、水中の共振周波数の空気中からの減少比は、

図5 ラット繊維芽細胞の液中SNOAMによるAFM像 (a)と光学像 (b)。

$$\begin{aligned}\omega_{\text{water}} / \omega_{\text{air}} &= \sqrt{m_{\text{cantilever}} / (m_{\text{cantilever}} + m_{\text{liquid}})} \\ &= \sqrt{\rho_{\text{quartzglass}} / (\rho_{\text{quartzglass}} + \rho_{\text{water}})} \\ &= \sqrt{2.2 / (2.2 + 1)} = 0.83 \quad (\text{at } 20^\circ\text{C})\end{aligned}$$

と計算できる。この計算値は、実測値に対しておおむね一致する値であった。さらに、粘性の異なるグリセリン水溶液中での粘性の影響を調べた結果、付加質量からの計算値に比べて、実測した共振周波数の低下率が、粘性増加にともない、大きくなることから、粘性によるせん断方向の付加質量の効果も含まれていることが考えられる。

一方、共振周波数付近のQ値は、およそ空気中の1/5程度に低下する。また、バイモルフに印加した電圧とプローブの振幅は、比例関係にあり、1 nm/Vの特性のバイモルフに1 ACV印加したときのプローブの振幅は、空気中で100 nm、水中で20 nm程度である。

図5に、水中で観察したラットの繊維芽細胞（2%パラホルムアルデヒド処理）のAFM像と光像を示す。AFM像では、細胞内のストレスファイバがかすかに浮き出して見える程度であるが、光像では、ストレスファイバがコントラストよく見えることがわかる。通常、透過型の光学顕微鏡では、このストレスファイバ

は、コントラストが得られず、蛍光染色によって、観察されるが、SNOAMにおいては、明瞭なコントラストが得られることが明らかになった。なお、水溶液中での測定では、アルミコートしたプローブに耐食コートを実施するか、金コートしたプローブを用いる必要がある。

4. おわりに

今回紹介したAFM, SNOAMのうち、特に、SNOAMについては、透過光像の他に、蛍光標識した試料の観察も可能であることから、蛍光標識試料の高分解能観察に利用することもできる。さらに、この他の走査型プローブ顕微鏡としては、表面電位の分布、イオン濃度の分布、温度の分布などを観察する走査型プローブ顕微鏡の研究も進められており、今後、走査型プローブ顕微鏡が生物物理分野の研究ツールとして、いっそう普及していくものと考えられる。

なお、本稿で紹介した染色体像は、都立アイソトープ研究所で調整した試料をセイコー電子工業・科学機器事業部で観察したものである。また、SNOAM開発の一部は、科学技術庁の平成6年度の科学技術振興調整費による「生体ナノ機構の解明のための基盤技術の開発に関する研究」の一環として、セイコー電子工業・基礎技術研究室と東京工業大学・藤平研究室と共同で行われた。さらに、本稿で示したラットの繊維芽細胞は、東京大学教養学部・楠見研究室で調整されたものである。

文 献

- 1) Weisenhorn, A. L., Hansma, P. K., Albrecht, T. R. and Quate, C. F. (1989) *Appl. Phys. Lett.* **54**, 2651-2653.
- 2) Watanabe, M., Kinjo, Y. and Shigeno, M., Proc. of Int. Congr. Electron Microsc. 13 th, Paris 17-22 July 1994.
- 3) Hansma, P. K., Cleveland, J. P., Radmacher, M., Walters, D. A., Hillner, P. E., Bezanilla, M., Fritz, M., Vie, D. and Hansma, H. G. (1994) *Appl. Phys. Lett.* **64**, 1738-1740.
- 4) van Hulst, N. F., Moers, M. H. P., Noordman, O. F. J., Tack, R. G., Segerink, F. B. and Bölger, B. (1993) *Appl. Phys. Lett.* **62**, 461-463.
- 5) Heinzelmann, H. and Pohl, D. W. (1994) *Appl. Phys. A* **59**, 89.
- 6) Muramatsu, H., Chiba, N., Homma, K., Nakajima, K., Ataka, T., Ohta, S., Kusumi, A. and Fujihira, M. (1995) *Appl. Phys. Lett.* **66**, 3245-3247.
- 7) 田古里哲夫, 荒川忠一 (1989) 流体力学, pp.233-235, 東京大学出版会, 東京.