走査プローブ顕微鏡

天 児 和 暢・梅 田 昭 子

九州大学医学部細菌学教室
〒812 福岡市東区馬出3丁目1-1

〔受理：1996年2月9日〕

走査プローブ顕微鏡の生物学的応用の現状について、主として原子間力顕微鏡での応用研究について総説的に解説した。現在生物試料として、DNA 線維、コレラ毒素分子、バクテリオファージ、外膜タンパク分子、S-layer タンパク分子などが、溶液中、あるいは大気中で様々な試料作成法の検討をふまえて観察されつつあり、かなりの成果を上げつつある。全く新しい発想のもとに設計された顕微鏡として、電子顕微鏡と光学顕微鏡の不備を補完する役割を果たしうるか否かは、これからの応用技術の開発にかかっていると言える。

1. ま え が き

1985年電子顕微鏡の開発に関する功績により、ドイツの Ernst Ruska 博士が、ノーベル物理学賞を受賞した。最初の実用的な電子顕微鏡の開発より、約50年を経ての受賞である。受賞は彼単独ではなく、別に二人の研究者が新しい顕微鏡の開発に関して受賞している。それは、Binning と Rohler の両博士である。彼らが開発した顕微鏡は、これまでの顕微鏡とは全く異なった機構での観察装置で、走査トンネル顕微鏡と呼ばれるものであった。従来の顕微鏡は、何れも電磁波を屈折させた像を拡大する方式を用い、電磁波として光を用い、ガラスのレンズを利用したものが光学顕微鏡であり、電子線を用い、磁界を用いて屈折させたものが電子顕微鏡である。彼らの開発した装置は、ものの表面を細い針で走査し、その針の動きから表面の構造を知る装置である。表面を極微

細な領域内で試料を正確に動かせるステージを作ることが成功の鍵を握っていたことになる。これにより、顕微鏡は、レンズの系で常に問題となる各種の収差の問題から離れて、形態観察ができる可能性が生まれてきた。しかし、電子顕微鏡においても、開発から生物の観察への応用までには多くの努力と応用技術の開発が必要であったように、この顕微鏡でも生物の観察にはまだ相当の努力が必要である。この総説では、この顕微鏡の構造と生物への応用の現状について解説することとする。装置が市販されるようになってすでに10年近い時間が経過していて、生物への応用に関する総説も幾つか出ているので参考にされたい(5, 9, 11)。

2. 装置の概観

当初開発されたのは、走査トンネル顕微鏡であった。これは試料と探針の間に流れるトンネル電流を検出するため、試料に導電性があることが必要で、導電性を持たない物の観察が困難であることから、後に原子間力顕微鏡 (atomic force microscope または force microscope) が開発さ

図1. トンネル顕微鏡 (STM) と原子間力顕微鏡 (AFM)

A: トンネル顕微鏡 (STM)。B: 原子間力顕微鏡 (AFM)。トンネル顕微鏡は探針 (チップ) と試料表面に流れるトンネル電流を検出しその値がいつも一定になるようにチップの位置を固定してスキャナを動かす。原子間力顕微鏡は、試料に当たるチップの針圧が一定になるよう設定して、試料の表面を直接走査する。

れた (3)。この2つの顕微鏡は、探針を用いて観察するので走査プローブ顕微鏡と呼ばれている。トンネル顕微鏡は、微細な検針を極限まで物質の表面に近づけその間に流れるトンネル電流を検出し、その量に応じて針を動かして描画するものである。それ故、電流の流れない試料では使用できない。トンネル電流がいつも一定になるように針の位置を決めておけば、針は試料の凹凸に合わせて一定の距離のところを試料の形に添った動きをする (図1にその違いの概略を示した)。

生物の試料は、そのままでは導電性がないので、トンネル顕微鏡では観察できない、このため非導電性の試料をも観察するため、探針を直接試料表面に当ててその状況に応じた針の動きから構造を知る方法が考案された。この場合、針にかかる力がいつも一定になるように設定すれば、やはり試料の表面の形を描画するように針は動くことになる。この装置は原子間力顕微鏡と呼ばれている。何れの装置も、極めて正確に動くステージの開発が可能にした装置である。ステージはスキャ

図2. AFM の機構

チップの動きを正確に捉えるため、カンチレバーにレーザ光を当ててその変化を読み取る。実際には、レーザ光は、真上から当たる。(本文参照)

図3. AFM 装置の外観

1; スキャナ, カンチレバーなどの検出器, 2; 情報処理のコンピュータ, 3; 映像観察 CRT, 4; プリンター。検出器は, 振動を嫌うので大型の除震台に乗っている。

ナと呼ばれ, ピエゾ電流により電流で動きを制御し正確で微細な動きに対応している。図2に原子間力顕微鏡の概念図を図3に顕微鏡の外観を示した。試料はステージ上に固定し, 表面を走査する針を当て, 針が表面を走査するようにステージを動かし, 針の上下の運動の変化を検知する。検知された情報は, 直ちにマイクロコンピュータに送られて, 処理され映像として CRT 上に映し出される。針の上下運動は微細なのでこれを拡大して検知するため, 針の先端部分にレーザ光線を当て, その反射光を検出器で検出する方法を採って, 針のわずかな動きも捕らえるようにしている。

3. 試料情報の取得

試料表面の構造は, カンチレバーと呼ばれる金属製の小さなバネ状の板の上に着けられた微小な針で表面を走査して観察する (図4)。

針は, チップと呼ばれ, 金属あるいはセラミックスでできている。この針の形状あるいは硬さは, 観察の結果に大きく影響するので重要である。図4は, チップの形状の一例である。

試料表面の構造は, 試料表面の凹凸にとまった針の上下の動きとして検出される。針のこの運動を検出するため, カンチレバーの表面の一点

図4. カンチレバーとチップの走査電子顕微鏡像

A: 2本のカンチレバー。この先端に微細なチップが着いている。B: チップ, 形状の異なる物が市販されている。形は分解能に大きく影響する。これは標準的な形。

に、レーザ光線を当て、その反射光を検出器に当てその動きでチップの動きを表現するようになっている。それ故、装置の動作前にすべき重要な作業として、レーザ光の正確な位置合わせが必要である。

得られたレーザ光の動きは、電気信号に変えられ直ちにコンピュータに記憶される。容量の大きな記憶媒体（光磁気ディスク、ハードディスクなど）であればそれらにも保存可能である。

4. 取得情報の処理

図5に T4 フェージの AFM 像を一例として示した。得られた情報は、そのままでは殆ど像らし

き物を見ることはできない（図5 A）。電子顕微鏡類似あるいは光学顕微鏡類似の視覚的になじみのある像に変換して見えるようにする。そのためコンピュータの助けが不可欠で、装置に付属しているコンピュータに電子顕微鏡における陰付け法に相当する処理をするソフトがあり、これで処理することにより左右のどちらから光を当てたような像を得ることができる（図5 B）。写真にするには、この像をカラープリンタで印刷するか、CRT 画面をそのままカメラで撮影する。カラーสライド撮影装置を持った別のコンピュータがあれば、直接電氣的に繋げて、画像を転送することもできる。さらに、像の計測、フーリエ変換像な

図5. T4 フェージの AFM 像

A : AFM で取り込んだ無処理の像、このままでは殆ど見えない。B : 同じ像を、コンピュータ処理し影を付けたようにした像。C : 3 次元的処理をした像。このような処理は、短時間で簡単に行えるのもこの顕微鏡の特徴である。

ども利用できる。図5Cは、3次元的な表現にしたファージ像である。

5. 試料の観察

1) 無機材料試料

金属、ガラス、セラミックなどの試料は、全く何の処理もなく、そのままスキャナに乗せ観察できる。図6は、シリコンウエファの表面の構造をSTMで見た像である。シリコンの結晶が規則正しく配列している像を見ることができる。

一つの試料表面は、1回の観察で500回の走査が行われる(200-500の範囲で変更可能)。

一つ像を得るための時間も変化させうるので、試料に適した速度を選ぶ必要があるが、我々が普通に使用している条件では、一つの画像を得るに必要な時間は、おおむね3-5分である。

2) 生物試料

生物試料と無機材料試料との大きな違いは、一つは、試料の軟らかさであり、他は、試料の不均一性である。同じ試料でもその場所により観察に適した場所と不適当な場所があり、場所を選ぶことは生物の観察では重要な操作とされている。これは、生物試料では見たい場所を正確に特定できなければならないということである。

試料の硬度の問題は重要で、最終的な解決策はまだ出ていない。原子間力顕微鏡では、チップが直接試料にふれて走査する。触れる力はそれほど大きくなくとも、試料はこの針との接触により力を受け、損傷し、破損し、移動する。通常同じ場所を何度も観察するので、この影響により、1回目と2回目あるいは3回目と試料の形態が変わってくるし、場合によっては、消失して視野からなくなってしまうこともある。これは、試料がチップにより掻き取られたものと考えられる。これを防がないと、正確な観察は不可能である。

試料の不均一性は、生物試料の大きな特徴である。試料のどこを見てもほぼ同じという無機材料と著しく異なる点で、見なければならない場所が特定され、そこに正確に移動しなければならない。原子間力顕微鏡にせよトンネル顕微鏡にせよ試料位置の自由な移動はあまり得意ではない。まして一つの像を得るのに数分間の時間が必要であるので、多数の視野を探しながら撮るということ

図6. セラミックの結晶のSTM像

酸化シリコンの分子が結晶状に並んでいるのが見える。このような高分解能は、しかしながら、生物の試料では得られていない。

は不可能に近い。このため光学顕微鏡を装着し試料の大体の位置決めができるようにするか、あるいは試料台(スキャナ)にズームレンズ様の機能を持たせ、最初は、低倍率で広い視野を観察し、その中から必要な部分を拡大観察するという方法が採られているが、まだ改良の余地がある。

6. 試料の固定

生物試料を観察するには、上記の試料の軟らかさの問題を解決する必要がある。これは、試料そのものに硬さを与えるとともに、試料台上に固定し移動しないような操作も必要である。これは生物試料の観察の大きな問題点であるので多くの研究者がこれで悩んでいる。方法は大きく分けて試料を化学的に固定する方法(14, 15, 17, 25)と試料を固い物で覆う方法とに分けられる(24)。

固定には電子顕微鏡で応用されていたオスミウム固定、アルデヒド固定等が使用されているのは、これらの物質がすでに電子顕微鏡の長い歴史の中で有効に利用されていることによるものと思われる。またこの顕微鏡が、従来の電子顕微鏡の利用者に限らず、むしろ全く電子顕微鏡の利用とは無関係の人々にも広く使用されている経緯から独自の固定方法の工夫もなされている。

どの程度の軟らかさで利用可能なのかをはかる一つの目安として、電子顕微鏡学で広く使われている、エポキシ樹脂の表面が観察可能であることから (1) プラスチックの硬さがあれば観察可能のようである。

一方、表面を覆って固定する方法も電子顕微鏡の蒸着の考えから出発しているが、電顕で利用されていた方法はそのままでは利用できないことが次第に明らかになってきた。まず蒸着金属が必ずしも安定して表面に付着しているとは限らないことである。又、蒸着金属粒子も大きく観察の時に粒状性が問題となる。従来の方法に変わる新しい蒸着のシステムが必要となる。その条件として、粒子の粒状性が極めて細かいこと、表面の形状を忠実に表した蒸着が必要となるが、この条件に叶う蒸着法として、1990年に田中により開発されたプラズマ重合薄膜の形成装置の応用が考えられる (23, 24)。

この装置は、直流のグロー放電を用いて、極めて薄い蒸着膜を作る方法で、金属のみならず、有機化合物の薄膜も作成可能である。実施には、この方法のために開発された装置が必要である。蒸着材料は、ガス状にして蒸着装置のベルジャの中に入れる、よく使用される蒸着源はナフタレン、ブタン、四酸化オスミウム等であるが、常温で気化する物であれば何でも利用できる。ガス状にした蒸着源を入れた後に短時間の直流のグロー放電を行いガス状の蒸着源を重合させて試料表面の薄膜として付着させる。薄膜の厚さは、放電の時間に比例し1秒程度の薄膜でも充分にこの顕微鏡での観察に耐えうる厚さになる。電子顕微鏡での蒸着と異なる点は、全面をくまなく蒸着する必要はなく、目的とする試料を固着する程度の蒸着をしてやればよいので、極薄い膜でも目的に叶うものである。蒸着源として四酸化オスミウムのガスも利用可能であるが、重合したオスミウム金属は極めて硬度が高く AFM のプロブの磨滅を促進するので注意が必要である。固定の能力は高く数回の同じ視野の観察でも試料の変形や移動は起こらない。

7. プロブの形状と分解能

形を観察する心臓部分は、カンチレバーの先端

に付いているチップである。この形状が分解能に影響する。その形状は、チップの種類により異なる。先端が鋭い物ほどよい分解能が得られるはずであるが、先端にゴミが付着したり、磨滅すると分解能の低下の原因となる。

8. 非接触モード

観察方法には接触型と非接触型 (noncontact mode あるいは tapping mode) がある。接触型では、チップは常に試料表面に接触しているが非接触型では、針が一定の周波数で振動しており、試料表面に針が近づくことにより針の受ける力の変化を感知する。一時的には、表面にも接触する事も起こりうるが、主に針が試料表面に近づいた時に試料表面より受ける反発力を主として検知して像を作る。接触型に比べ試料に与えるダメージは少なく、生物の観察に適しているとされている。試料を特別な固定方法で固着させる必要もないところから、生の状態の生物の観察に適しているとされている。分解能は、接触型と殆ど同じかやや劣る程度である。当然使用するカンチレバ及びそのチップの形状も異なった特別の物を使用することとなる。

9. 水中観察

この顕微鏡は、電子顕微鏡のように真空にする必要はない。大気中でも、水中でも特定のガス雰囲気中でも観察可能である。多くの生物は、溶液中、あるいは体液中にあるのが普通であるので、溶液中の生物の構造を知ることにも可能である。それには、適当な容器の中に試料を入れ観察する (4, 13, 16, 20, 22)。これは、これまでの電磁波を利用した顕微鏡にはない特徴と言える。生きた状態の細胞を培養液中で観察することも可能である。残念ながら、まだ分解能が光学顕微鏡以上には上がっていない。しかし、技術的な進歩が著しい昨今であるので、数年にしてさらに高性能な観察が可能となると思われる。

10. おわりに

走査プローブ顕微鏡は、久々に現れた、新しい構造観察装置である。全てが新しいので、その生物学への応用技術は、最初から始めなければなら

ない。従来の構造観察装置とは多くの点で異なっている。新しい発想で利用する必要があるであろう。まだ、開発途上ということで、電子顕微鏡の結果を踏まえての研究が主体であるが、多くの研究者により様々な分野に応用され始められている。また電子顕微鏡の結果を上回る結果は出ていないが、DNA (8, 10, 18, 26), ギャップジャンクション (12), コレラ毒素 (19), ompF (21), S-layer タンパク (2, 16), ミオシン, コラーゲン分子 (6, 7) などの観察結果が報告されている。さらに多くの観察が試料作成法の工夫とともに行われていけば、新たな局面が開けていくことは間違いない。電子顕微鏡が応用されたよりもはるかに早いスピードで開発は進むことが期待され、それによってこの顕微鏡の性能は、どのようなものかが確定していくであろう。

文 献

- 1) Amako, K., Takade, A., Umeda, A., Yoshida, M. (1993): Imaging of surface structure of epon thin sections created by a glass knife and a diamond knife by atomic force microscope. *J. Electron Microscope* **42**, 121-123.
- 2) Beveridge, T.J., Sutham, T., Jericho, M.H., Blackford, B.L. (1990): High-resolution topography of the S-layer sheath of the Archaeobacterium *Methanospirillum hungatei* provided by scanning tunneling microscopy. *J. Bacteriol.* **172**, 6589-6595.
- 3) Binning, B. (1992): Force microscopy. *Ultramicroscopy* **42-44**, 7-15.
- 4) Bonfiglio, A., Parodi, M.T., Tonini, G.P. (1995): Subcellular details of early events of differentiation induced by retinoic acid in human neuroblastoma cells by atomic force microscope. *Exp. Cell Res.* **216**, 73-79.
- 5) Engel, A. (1991): Biological application of scanning probe microscopes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 79-108.
- 6) Gale, M., Pollanen, M.S., Markeivicz, P., Goh, M.C. (1995): Sequential assembly of collagen revealed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **68**, 2124-2128.
- 7) Hallett, P., Ofer, G., Miles, M.K. (1995): Atomic force microscopy of the myocin molecule. *Biophys. J.* **68**, 1604-1606.
- 8) Hansma, H.J., Vesenska, G., Siegerist, C., Kelderman, G., Morrett, H., Sinsheimer, R.I., Elings, V., Bustamante, C., Hansma P.K. (1992): Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope. *Science* **256**, 1180-1184.
- 9) Hansma, H.G., Hoh, J. (1994): Biomolecular imaging with the atomic force microscope. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 115-139.
- 10) Hansma, H.G., Laney, D.E., Bezanilla, M., Sinsheimer, R.L. (1995): Application of atomic force microscopy of DNA. *Biophys. J.* **68**, 1672-1677.
- 11) Hoh, J.H., Hansma P.K. (1992): Atomic force microscopy for high resolution imaging in cell biology. *Trend Cell Biol.* **2**, 208-213.
- 12) Hoh, J.H., Sosinsky, G.E., Revel, J.P., Hansma, P.K. (1993): Structure of the extracellular surface of the gap junction by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **65**, 149-163.
- 13) Hui, S.W., Viswanathan, R., Zasadzinski, J.A., Israelachvili, J.N. (1995): The structure and stability of phospholipid bilayers by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **68**, 171-178.
- 14) Ill, C.R., Keivens, V.M., Hale, J.E., Nakamura, K.K., Jue, R.A., Cheng, E.D., Melcher, B.D., Smith, M.C. (1993): A COOH-terminal peptide confers regiospecific orientation and facilitates atomic force microscopy of an IgG. *Biophys. J.* **64**, 919-924.
- 15) Karrasch, S., Dolder, M., Schabert, F., Ramsden, J., Engel, A. (1993): Covalent binding of biological samples to solid supports for scanning probe microscopy in buffer solution. *Biophys. J.* **65**, 2437-2446.
- 16) Karrasch, S., Hegerl, R., Hoh, J.H., Baumeister, W., Engel, A. (1994): Atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of proteins in an aqueous environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 836-838.
- 17) Lin, J.N., Drake, B., Lea, S.A., Hansma, P.K., Andrade, J.D. (1990): Direct observation of immunoglobulin adsorption dynamics using the atomic force microscopy. *Langmuir* **6**, 509-511.
- 18) Mariani, T., Musio, A., Frediani, C., Ascoli, S.C. (1994): An atomic force microscope for cytological and histological investigation. *J. Microscopy* **176**, 121-131.
- 19) Mou, J., Yang, J., Shao, S. (1995): Atomic force microscopy of cholera toxin B-oligomers bound to bilayers of biologically relevant lipids. *J. Mol. Biol.*

- 248**, 507–512.
- 20) Radmacher, M., Fritz, M., Hansma, P.K. (1995): Imaging soft samples with the atomic force microscope: gelatin in water and propanol. *Biophys. J.* **69**, 264–270.
 - 21) Schabert, F.A., Henn, C., Engel, A. (1995): Native *Escherichia coli* OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy. *Science* **268**, 92–94.
 - 22) Schoenenbergen, C., Hoh, J.H. (1994): Slow cellular dynamics in MDCK and R5 cells monitored by time-lapse atomic force microscopy. *Biophys. J.* **67**, 929–936.
 - 23) Tanaka, A. (1993): Conductive metal coating for SEM specimen using osmium tetroxide gas in DC glow discharge. *J. Elect. Microscopy* **42**, 245.
 - 24) Umeda, A., Amako, K., Takade, A., Tanaka, A. (1995): Stabilization of biological specimens by the use of plasma polymerized film for the observation by an atomic force microscope. *J. Elect. Microscop.* **44**, 408–409.
 - 25) Vinckier, A., Heyvaert, I., D'Hoore, A., McKittrick, T., van Haesendonck, C., Engelborghs, Y., Hellemans, L. (1995): Immobilizing and imaging microtubules by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **57**, 337–343.
 - 26) Yang, J., Shao, S. (1993): Effect of probe force on the resolution of atomic force microscopy of DNA. *Ultramicroscopy* **50**, 157–170.