

Development of an Atomic Force Microscope Suitable for Observation of Biological Samples

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Ando, Toshio メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/46866

This work is licensed under a Creative Commons
Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0
International License.



生物材料の観察に適した 原子間力顕微鏡の開発

(課題番号 03455011)

平成 3 - 5 年度科学研究費補助金 (一般研究B)

研究成果報告書

平成 7 年 3 月

研究代表者 **安藤敏夫**
(金沢大学理学部助教授)

生物材料の観察に適した 原子間力顕微鏡の開発

(課題番号 03455011)

平成 3 - 5 年度科学研究費補助金 (一般研究 B)

研究成果報告書

平成 7 年 3 月

研究代表者 **安藤敏夫**
(金沢大学理学部助教授)



8000-36997-4

金沢大学図書館

目次

1	はじめに	1
2	研究発表	3
研究成果（解説）		
3	原子間力顕微鏡の原理	6
4	開発の動機と経緯	9
5	ハードウェアの機械部分	13
5.1	概要	13
5.2	AFMヘッド	15
5.3	ピエゾ駆動部	19
5.4	モーター部分	21
5.5	基盤B1	21
5.6	カンチレバーホルダー	21
5.7	ドリフト	25
5.8	除振	25
6	制御システム	27
6.1	高速信号処理システム	27
6.2	その他の機器	29
7	走査方法	30
7.1	ヒステリシス補正	30
7.2	リングングの回避	32
7.3	フィードバックのかけ方	32
7.4	プレスキャン	34
7.5	傾き補正	34
8	予備測定	35
8.1	カンチレバーのたわみの定量化	35
8.2	光てこ倍率	35
8.3	ピエゾの共振周波数測定	38
8.4	ピエゾのヒステリシス測定	38
9	ソフトウェア	46
9.1	AFMプログラムのディレクトリ構成	46

9.2	ソフトウェアの概説	46
9.2.1	PRM_FILE.AFM	46
9.2.2	EDIT_PRM.EXE	48
9.2.3	AFM_ADDA.H	48
9.2.4	AFM_FUNC.H	48
9.2.5	T_SENSOR.OUT, M_SENSOR.EXE	48
9.2.6	M_MOTOR.EXE	49
9.2.7	AFM_MENU.EXE	49
9.2.8	AFM_MENU.BAT	49
10	測定・観察	50
10.1	フォースカーブ	50
10.2	試料基板の平滑度	50
10.3	ピンポイントアプローチ	53
10.4	筋蛋白質の液中観察	53
10.4.1	アクチンフィラメントの束	53
10.4.2	HMM	53
10.4.3	液中観察での問題点	57
10.5	1分子捕捉	57

研究成果（文献）

付録

A	機械部品の設計図	66
A.1	AFM組上がり図	67
A.2	AFM基盤B1組立図	68
A.3	基盤B1の設計図	69
A.4	改良型基盤B1の設計図	70
A.5	基板B1の支脚	71
A.6	基盤B2の支持ネジ	72
A.7	基盤B4支持ネジ	73
A.8	マイクロメータ取り付け金具	74
A.9	モーター取り付けネジ	75
A.10	AFMヘッド組上がり図	76
A.11	AFMヘッド側板	77
A.12	AFMヘッド後板と天板	78
A.13	AFMヘッド底板	79
A.14	レーザーマウント	80
A.15	レーザー光軸調整器	81

A.16 ミラー部	82
A.17 センサー位置調整部組上がり図	83
A.18 センサー位置調整部品1	84
A.19 センサー位置調整部品2	85
A.20 カンチレバーホルダー固定用アーム	86
A.21 カンチレバーホルダー	87
A.22 基板B 4組上がり図	88
A.23 基盤B 4	89
A.24 基盤B 4補強梁	90
A.25 補強した基盤B 4	91
A.26 基板B 2	92
A.27 円筒ピエゾ固定リングとバネシリンダー	93
A.28 板ピエゾ固定金具	94
A.29 サンプルステージ	95
B プログラムソースファイル	97

別冊

- B.1 Menu Files
- B.2 Header Files
- B.3 Sensor Files
- B.4 Motor Files
- B.5 Scan Files
- B.6 Image Files
- B.7 Edit Files
- B.8 Common Files

1 はじめに

原子間力顕微鏡 (AFM) は試料の物性やその環境を選ばず、あらゆるタイプの試料の像をナノメートルの解像能で与えてくれる。電子顕微鏡が真空中の試料にしか適応できないことや、走査型トンネル顕微鏡が導電性の試料にしか使えないのと対照的である。AFM では液中で活性をもつ生物試料の生の像を観察できることから、AFM が生物学の広い範囲の研究に極めて有効であると期待されている。また、AFM が力を定量できる顕微鏡であることから、生物試料の形状ばかりでなく、弾性、静電ポテンシャル、親水性・疎水性などの物性のマッピングを可能にする。更には、工夫次第では、蛋白質-基質間、蛋白質-蛋白質間の相互作用力の測定も可能である。この科学研究費で我々が開発を開始した当時は、市販の AFM 装置が世に出たばかりであった。市販 AFM のターゲットは主に探針をどこにアプローチしても同じ様な像が得られる半導体や金属などの固体試料であった。基盤にランダムに疎らに局在する蛋白質などの生物試料を観察するためには、広い範囲を盲走査して試料の位置をある範囲で求め、段々と走査範囲を絞っていくしかなかった。1 画像を得るには速くて数十秒の時間がかかるので、この絞り込み操作は非常に複雑なものとなる。光学顕微鏡で試料の位置を $0.2 \mu\text{m}$ 程度の精度で予め求め、そこに探針先端をピンポイントアプローチできれば、AFM は生物試料観察に格段に使いやすいものになる。蛋白質などは直接蛍光染色したり、蛍光性ビーズを付けることで、蛍光顕微鏡下でその局在を可視化することは広く行われている。そこで、倒立型蛍光顕微鏡と AFM が一体になったシステムの開発を思い当たった。我々の装置の完成とほぼ同時期にオランダの研究室でも類似の装置が製作され、1 年程遅れてアメリカのデジタルインストルメント社が同様の製品を発表した。日本のメーカーも製品化に現在取り組んでいると聞いている。こうして、生物試料研究用の AFM 装置は倒立型蛍光顕微鏡と一体にするという我々が最初に考えたことが、現在では流行になっている。我々の開発の動機は、当時このような AFM が市販されていなかったことと、市販装置の価格は非常に高く、我々の研究予算では到底購入不可能であったことにあるが、そればかりではない。AFM は工夫次第で様々な応用が可能な方法だが、市販 AFM はブラックボックスであり、工夫するためにハード・ソフトを自由に変更することができない。それでは我々が我々の研究に固有な新しい応用を開発していくことができない。自作することによってこそ、それが可能になる。これが最も大きな動機と言っているであろう。今後は、我々の研究室の研究対象である生体運動蛋白質系の研究にこの自作装置を大いに活用して、新しい発見をしたいと思っている。実際そのような研究をすでにスタートさせた。

本開発研究を進めるにあたり、文部省科学研究費補助金による多大なご援助をいただいたことに深く感謝します。

研究組織

研究代表者： 安藤 敏夫 （金沢大学理学部助教授）

研究経費

平成3年度	270 万円
平成4年度	60 万円
平成5年度	60 万円
計	390 万円

2 研究発表

[学術雑誌・一般誌]

1. T. Ando, T. Yamamoto, N. Kobayashi & E. Munekata
Biochim. Biophys. Acta, 1102, 186-194 (1992)
2. T. Ando, N. Kobayashi & E. Munekata
Adv. Exp. Med. Biol., 332, 361-376 (1993)
3. T. Yamamoto, S. Nakayama, N. Kobayashi, E. Munekata & T. Ando
J. Mol. Biol., 241, 714-731 (1994)
4. 安藤敏夫、中野勝志
蛍光顕微鏡を組み合わせた原子間力顕微鏡の開発とその応用
in 「生物物理」 / 実験技術 (印刷中)

[著書]

1. 走査型トンネル顕微鏡 / 原子間力顕微鏡利用技術集成
TIC 出版 (1994) 安藤敏夫 他 編集
2. 安藤敏夫、中野勝志
IV-5 章 蛍光顕微鏡・原子間力顕微鏡一体型システムの開発・製作
in 「走査型トンネル顕微鏡 / 原子間力顕微鏡利用技術集成」 TIC 出版 安藤敏夫 他編集
p.380-386、(1994)

[口頭発表]

1. 安藤敏夫
原子間力顕微鏡による有機材料計測事例
石川トライアルセンターテクノフォーラム 1992年7月17日
2. 中野勝志、安藤敏夫
蛍光顕微鏡に組み込まれた原子間力顕微鏡の開発
日本生物物理学会第31回年会 1993年10月12日
3. 安藤敏夫、中野勝志
アクトミオシン系研究のための原子間力顕微鏡の製作
筋収縮・細胞運動研究会 1993年12月17日

4. 中野勝志、安藤敏夫
アクトミオシン系研究のための原子間力顕微鏡の開発
生体運動合同班会議 1994年1月5日
5. 安藤敏夫
原子間力顕微鏡によるモーター蛋白質系の研究
生理学研究所ディスカッションミーティング 1994年2月25日
6. 清水光太郎、安藤敏夫
蛍光顕微鏡に組み込まれた原子間力顕微鏡による生体試料の液中観察
日本生物物理学会第32会年会 1994年9月29日
7. 中島秀郎、国岡由紀、安藤敏夫
蛍光顕微鏡に組み込まれたAFMによる筋タンパク1分子力学特性の研究
日本生物物理学会第32会年会 1994年9月30日
8. 安藤敏夫
アクトミオシンモーターの1分子生理学
筋収縮・細胞運動研究会 1994年12月16日
9. 安藤敏夫
アクトミオシンの1分子生理学研究
生体運動合同班会議 1995年1月6日
10. 安藤敏夫
アクトミオシンの1分子計測
生理学研究所ディスカッションミーティング 1995年1月28日

研究成果

(解説)

生物材料の観察に適した原子間力顕微鏡の開発

金沢大学 理学部 物理学科
安藤 敏夫

3 原子間力顕微鏡の原理

1986年にG. Binningらによって発明された原子間力顕微鏡の原理を図1示す。カンチレバー(片持ち梁)の端にある針を試料表面に接触させる。試料ステージはXYZスキャナー(円筒ピエゾ)の上に載っている。ステージを水平方向に走査すると、試料の凹凸に応じて梁がたわむ。たわみ量を2次元マッピングすれば試料の凹凸像が得られる。また、水平方向の走査時に梁のたわみを一定にするようにスキャナーでステージを上下させ、その上下量を2次元マッピングしても同様である。この場合、針と試料との間にかかる力は一定に保たれる。たわみ量の検出には、当初走査型トンネル顕微鏡が応用された。導電性針を金コートしたカンチレバー上面に近づけ、その間に流れるトンネル電流を測定することで、たわみ量が計測された。現在では、機構が単純な光てこ方が広く採用されている。金コートされ鏡面になっているカンチレバーの先端付近に半導体レーザーの光をレンズで絞って当てる。その反射光をポジションセンサーに入射させる。たわみによるカンチレバーの先端部の変位は、梁からセンサーまでの光路長と梁の長さとの比の2倍だけ増幅されて、その増幅された変位だけセンサーでのレーザースポット位置が動く。ポジションセンサー自身の分解能は良いもので0.1 μm 程度であるので、試料の凹凸は0.1 nm程度の分解能で検出できる。試料の水平方向の空間分解能は高さ方向に比べて悪い。水平方向の走査は0.1 nm以下の精度でできるが、針先端の曲率半径が有限の大きさをもつことが原因である。特に凹凸がその曲率半径程度の試料では、この影響を直接受ける(図2参照)。凹凸の小さい試料では、針先端の微細な凹凸で最も先端にある凸部分が試料に接触するので、マクロな曲率半径は関係なくなる。現在針先端を鋭く尖らす努力が進められており、鋭いもので数ナノメートルまでにはなっている。上記の原理で明らかなように、AFMは試料及び試料環境の制限をほとんど受けない。試料は導電性である必要がなく、液中にある試料でも構わない。従って、生きた生物試料を染色せずにナノメートルオーダーの空間分解能で観察できる。更には、AFMは微弱な力を定量できる顕微鏡であるので、単に形状観察ばかりでなく、摩擦、磁気、電気、弾性といった性質までも画像化することができる。生物試料ではこのような応用はまだ進んでいないが、固体試料では実際に行われている。

図1：原子間力顕微鏡の原理

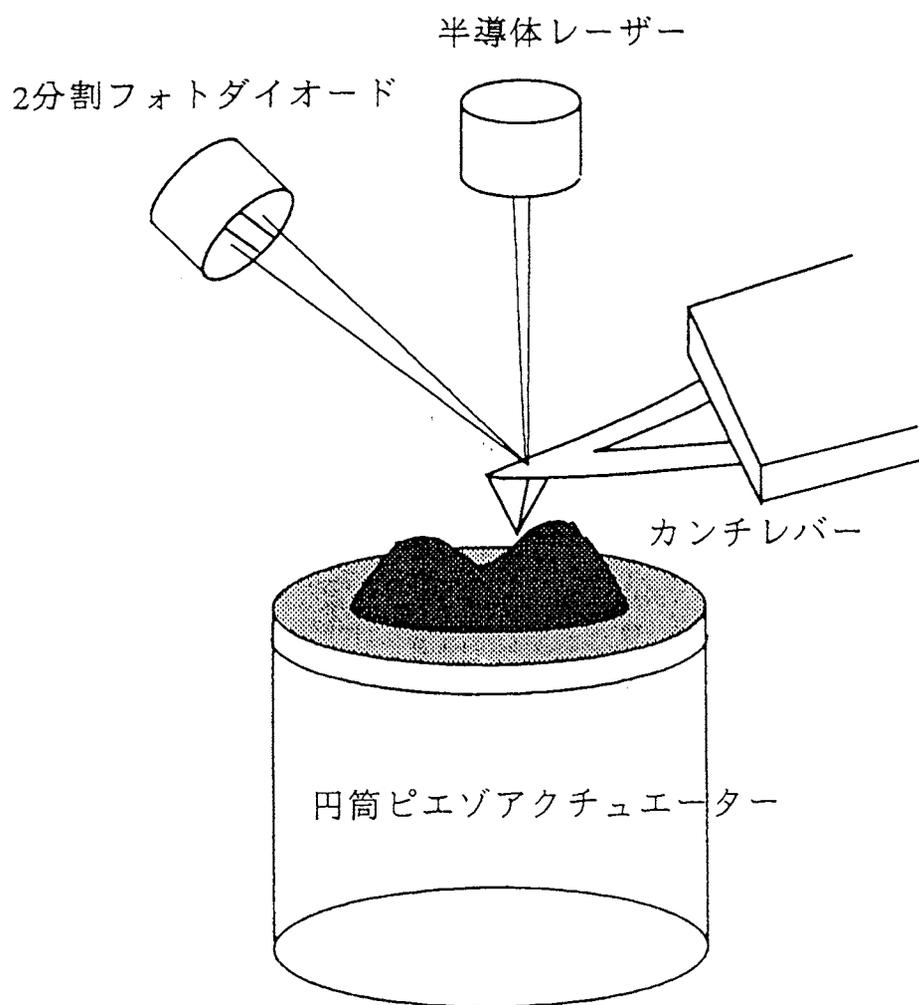
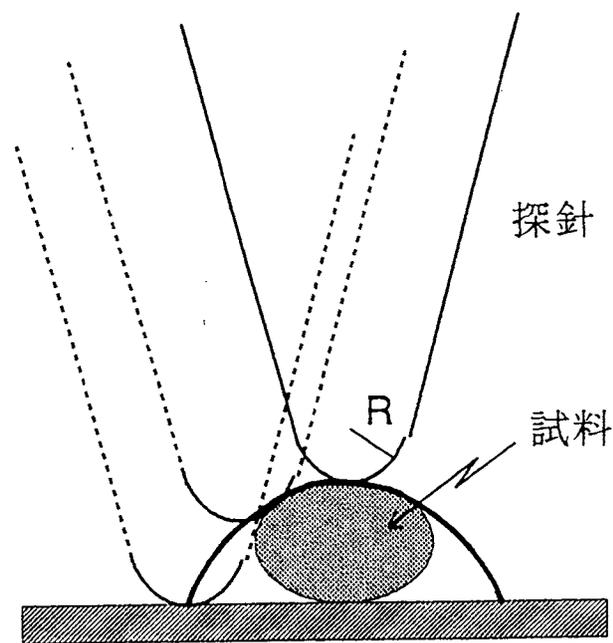


図2：探針先端半径の画像に及ぼす効果



R が大きいと
試料が太い実線のように観察されてしまう。

4 開発の動機と経緯

1989年に大阪大学基礎工学部の柳田敏雄氏を代表とする生体運動の重点領域研究が「滑り運動の分子機構」という研究課題でスタートした。7年間働いたカリフォルニア大学を辞め1986年に金沢大学に赴任した私にとって、研究室を整備することが当時の最重要課題であった。試験管1本もなく、机と椅子だけがあるところからスタートせねばならなかった。生体運動蛋白質の局所部位の電位を拡散律速の蛍光エネルギー移動現象を利用して測定するというテーマと筋収縮の分子機構のモデル構築というあまりお金のかからないテーマに絞って研究をスタートさせた。幸い柳田氏から声がかかり、私も重点研究のメンバーに加えていただいた。研究費がなかなか得られない状況にあってこのことは大変ありがたいことであったが、自分がどれだけ貢献できるだろうかという心配もあった。重点研究がスタートした翌年八ヶ岳において夏の合宿が行われた。私は電位測定結果とモデルについて話しをしたように覚えている。現在郵政省通信総合研究所関西支所に居られる大岩和弘氏が原子間力顕微鏡について解説し、氏が今装置を製作中であることを語った。また、1枚のOHPでSCIENCEに載った原子間力顕微鏡の蛋白質研究への応用のアイデアを紹介された。非常に印象的であった。それが誰のアイデアであるのか今でも知らないのだが、カンチレバー探針先端に蛋白質1分子が捕捉され、それが基盤に固定された他の蛋白質と相互作用している図であった。私には当時原子間力顕微鏡のことは全く頭になかった。氏の話の後昼休みになって多くのメンバーはテニスなどをしに出かけてしまったが、私はロッジで、どのようにしたら蛋白質1分子を探針に捕捉できるであろうかとあれこれ考えていた。合宿も終わり皆三々五々帰途にむかった。バスを待っている時、或る先生にお会いした。原子間力顕微鏡のことが話題になり、先生は他にも幾つかのタイプの走査型プローブ顕微鏡があることを教えて下さった。聴診器顕微鏡とかいって、金箔に非常に小さい穴を空け、そこに強いレーザー光を通してそのそばにある試料を観ると光の波長以下の分解能で物が見えるというものであった。聴診器を体に当てれば、音の波長以下の分解能で音の発信源が分かるのと同じだよとおっしゃっていた。金沢に戻って原子間力顕微鏡の資料を見つけて勉強した。あのOHPにあったように原子間力顕微鏡を使えばミオシン1分子が発生する力を直接計れるはずだし、今進めている電位計測も蛋白質全体にわたっていっぺんに計れてしまうに違いないと考えた。1990年にはデジタルインストルメント社を筆頭に数社から原子間力顕微鏡が市販されていた。早速カタログ、定価表を集めたが、2000万円もする高価なものであった。こんな高価な装置では到底入手できるはずがない。とって、実験を実現する夢をあきらめる気持ちにもなれなかった。大岩氏も製作を開始しているのだから自分にも作れるのではないかと考えた。自分で作るにしても結構費用がかかる。ざっと計算して600万はかかる。科研費に申請するしかなかった。ただ作るというだけでは到底採択されない。何か新しいアイデアを盛り込まなければならない。八ヶ岳で慶応大学の木下一彦氏が大岩氏にコメントしているのを思い出した。正確には覚えていないが、「めくらでスキャンして1分子を探し出すのは大変ですよ。1mm四方を1 μ mづつスキャンしたら1年もかかってしまいますよ。」というような木下氏独特の鋭いコメントだったと思う。「めくらでスキャンしたら」という言葉だけは

はっきりと覚えている。めくらでスキャンしなければ良いのだと考えた。光学顕微鏡と組み合わせれば良い。蛋白質は普通の光学顕微鏡では見えない。しかし、柳田氏がアクチンフィラメントでやっているように蛍光染色すれば見える。そうだ、蛍光顕微鏡と組み合わせようと思いついた。幸い、この成果報告書を書いているように1991年から3年間の一般研究(B)が採択された。

申請額より随分削られてしまって完成は不可能のように思えたが、とにかく製作にとりかかれるようになった。実際に製作を始めると予想していたように、あるいはそれ以上に資金が必要であった。幸い、池谷科学技術振興財団から全く同じテーマで150万円の助成がいただけ、完成に必要な資金を得ることができた。実は、科研費の内定が出される以前から科研費がもらえなくてもとにかく何とかして作ると覚悟を決めていたので、1991年の4月から準備を進めていた。4年の卒業研究で研究室に入ってきた中野君(現在ニコン中央研究所で原子間力顕微鏡の仕事に携わっている)にC言語の勉強を始めさせた。自分でもC言語の勉強を始めた。原子間力顕微鏡の制御システムには高速信号処理装置(DSP)が使われる。それに使われるプログラミング言語がCだからである。1年目にパソコン、DSP、倒立型蛍光顕微鏡、 piezo電源などを購入したが、C言語とDSPの勉強に集中した。円筒形piezoの中空部に対物レンズを挿入するアイデアは既にもっていたが、piezo素子は使ったことがなかったので、詳しいことが分からず苦勞した。市販の原子間力顕微鏡で使われているような円筒形piezoの入手先を探すのにひどく時間がかかった。日本の大手メーカー(東北金属)に問い合わせたが、まじめにとりあってもらえなかった。アメリカのメーカーに問い合わせたところ、そんなに太い円筒piezoではXY方向には変位しないという答えが帰ってきた。そうだとすると最初のアイデアは役に立たなければならない。以前問い合わせていたNECの営業マンからFAXで手書きの図が送られてきた。こうすれば良いのではないですかというもので、最終的に我々が採用したものであった。2年目に機械部分の設計に取り掛かった。原子間力顕微鏡の実物を見たことがなかったので、細かい設計が進まなかった。幸い、石川県工業試験所トライアルセンターという所でデジタルインストルメント社の装置を購入したという情報を得て、早速実物を見ることにした。思っていたより単純な構造であったが、金属加工に細かい工夫がされているのに気が付いた。それを参考にして最終的な設計図を描き上げた。この年は金沢大学理学部はお城から山の方に引っ越すことになっていて、夏休み前後は全く研究どころではなかった。工作室も閉店である。この年、オリンパス光学工業が実体顕微鏡と原子間力顕微鏡を組み合わせたシステムの開発で日本経済新聞賞をもらった。木下氏が言っていためくらスキャンはやはり問題であったのである。オリンパスに少し先を越されたが、蛍光顕微鏡と組み合わせることはまだどのメーカーでもやっていなかった。まだ時間的余裕があった。秋頃に設計図を工作室に渡したが、いつも混んでいて待たされる。冬になってもまだ開始してくれない。中野君はスキーの教師の免許を持っていて、この冬スキーのアルバイトに行き2ヶ月ほど留守にした。翌年の4月頃になって工作室に頼んであった金属加工品が出来上がってきた。早速組み上げながら問題のありそうな部分を点検し、工作室に急いで手直しをしてもらい、また組み上げるという作業を行なった。制御プログラムはすでにほぼ完成していたので、まず回折格子の凹凸観察から始めた。何やら凹凸が見えるがnoisyであった。あとで説明する基盤B3にインバー材を

加工していたものを使っていた。この基盤をピエゾで押してサンプルステージを走査するのだが、この基盤はステンレス球3個の上を滑る。加工したインバー材の表面はミクロンオーダーで凸凹であるのだ。試料の凹凸を観ているのかこの基盤の凸凹を観ているのか分からないのである。単純なミスであった。工作室には鏡面加工できる装置がなかったので外注先を探した。開発を始めから定期購読していた工業調査会のM&Eという雑誌が大いに役に立った。モリブデンの板を研磨して堅いダイヤモンドライクコーティングしたものを手に入れ、問題は一部解決した。まだ問題があった。XY方向に走査すると試料の凹凸に重なって高さ方向にサンプルステージが時々上下するように見える。XY方向のピエゾの押し返しに使っていた金属性のばねが怪しいらしい。金属のばねに代わるものを探した。またM&Eで柔らかいシリコンのひもを見つけた。これに代えると、きれいな回折格子の像が得られた。これを見て、これなら蛋白質も観えるに違いないと確信した。この年の生物物理学会で、中野君がアクチンフィラメントの束の蛍光像と同じパターンでAFM像が得られたことを報告した。蛍光顕微鏡と組み合わせたことで、観たい試料に針を近づけ、スキャンすると直にそのAFM像が得られた。これでめくらスキャンの問題が解決された。しかし、まだ装置の問題があった。装置は音に敏感で、男性の声に特に敏感であった。修士1年の清水君がそれを解決しようと頑張ってくれた。私がアクティブダンピング法を考え、機械の振動をフィルムピエゾで感知してその信号でピエゾにフィードバックをかけるというアイデアを試みることにした。清水君がフィルムピエゾ用のアンプを製作する一方で、マイクロフォンとスピーカーでこのアイデアを試した。1つのスピーカーからの音をマイクロフォンで拾い、その出力の位相を90度変えてからもう一つのスピーカーに入力する。2つのスピーカーからの音は相殺して確かに音は小さくなった。清水君のアンプはなかなか完成しなかった。彼は、図書館から本を探し出して自動制御の勉強を始めた。そのうち、このアイデアはこういう理屈でだめだと言い出した。確かにだめだということが明らかになったが、こうすればうまく行くはずだと私が新しいアイデアを提案した。彼はもうフィルムピエゾを使う方法はだめだと決めていた。彼は頑固である。防音の箱を作った方が効果的だと言い出した。防音用のフォームとベニヤ板で箱を完成したが、重量が大きいが効果があるのだと主張してかなり重たい箱を作ってしまった。そんなに重い箱を人の手で精密な装置に被せるなんて危険であると私は主張した。実際被せてみたが、ほとんど効果がなかった。こうした無駄な苦勞をしたあとで、最終的に機械部分の共振周波数を上げることですべて解決した。後で説明する基盤B4を支える位置をできるだけ中央にもって来るだけで十分な効果があった。残された仕事は、プログラムソフトに磨きをかけることであった。中野君の作ったプログラムはメニュー化されていなかったもので、研究室の全員が使えるというものではなかった。望洋ライブラリーというものが柴田望洋氏によって本で公開されていた。中野君の頑張りとおののおかげでメニュー化は短期間で終了した。中野君が卒業したあと、清水君がソフトウェアに更に磨きをかけた。中野君のコンスタントフォースモードの走査プログラムにバグを見つけ修正したり、より使いやすいうように改良を加えた。また、液中観察ができるように装置を一部改良した。こうして、中野君と清水君の二人のがんばりで最終的なシステムが完成した。3年半という長い時間がかかったが、市販品よりもきれいな像が得られる。八ヶ岳のロッジ

でいろいろ考えたカンチレバー探針先端にミオシン1分子を捕捉することも中島君が実現してくれた。大岩氏には感謝と氏の自分で作って試ようというチャレンジ精神に敬意を表したい。大岩氏自身が製作を途中で断念されたのは残念ではあるが。また、工作室の向氏の優れた腕前に敬意を表すると同時に無理な注文を快く聞いて頂いたことに感謝したい。木下氏、それと重点研究に加えていただいた柳田氏、それと誰だ分からないが本研究に関する実績も全く無い時点でこの科研費申請を採択してくれた審査員に深く感謝したい。科研費審査というものはよく分からないものである。本課題研究を終わらせ、いよいよあのOHPにあったような1分子力学計測を始めたいと申請したがこれは不採択になってしまった。審査方法の改善と八ヶ岳での合宿のような研究会がもっと頻繁に開かれることを希望して、この節を終える。

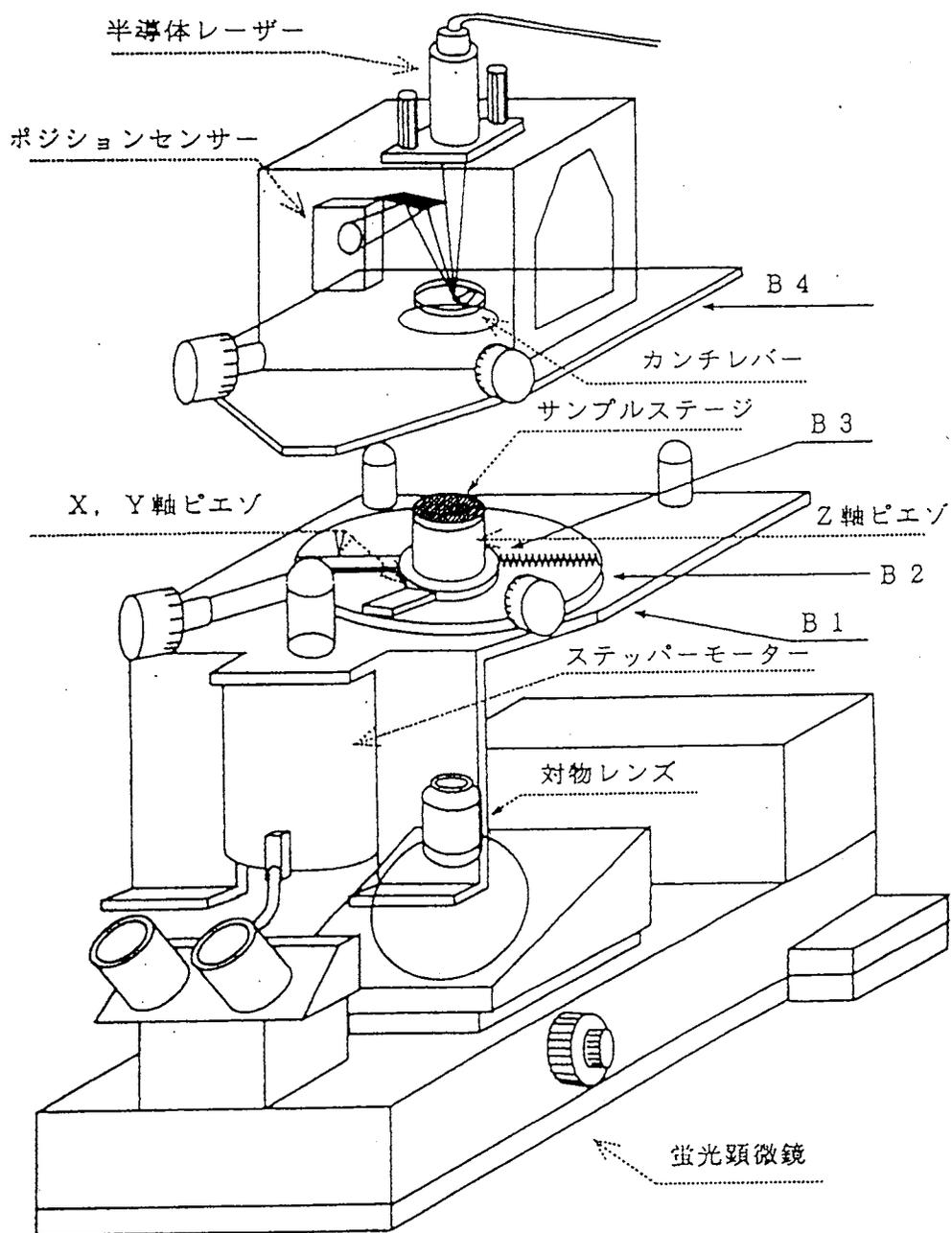
5 ハードウェアの機械部分

以下で各機械部分の説明をするが、各部品的设计図は付録の載せてある。

5.1 概要

蛍光顕微鏡とAFMを組み合わせるとき、当然ながら対物レンズは試料ステージのすぐそばになければならない。従来のAFM装置では多くの場合サンプルステージに走査用円筒形ピエゾスキャナーを直接付けて、サンプルステージを走査している。この方式のまま対物レンズをサンプルに近づけるには、円筒形ピエゾの中空部に対物レンズを挿入しなければならない。他方、大きな試料の一部を観察するために作られたスタンドアロンタイプのAFM装置では、サンプルステージは無く、カンチレバーに直接円筒ピエゾスキャナーを取り付け、カンチレバーの方を走査している。この場合には対物レンズを加えることは容易である。しかしながら、スタンドアロン方式ではカンチレバーを長い距離走査するときに、光てこ用の半導体レーザービームをカンチレバーの一定箇所常に当てるための工夫が必要である。この方式は現在デジタルインストルメント社が採用しているが、円筒形ピエゾの中に細工をしなければならず自作するのはかなり難しい。我々は円筒ピエゾの中空部に倒立型蛍光顕微鏡の対物レンズを挿入する方式を採用した。対物レンズは太いので、円筒ピエゾも太くならざるをえない。従って、XY方向にほとんど変位しない。XY走査用ピエゾ素子を別に用意した。図3に製作したAFM装置の概略図を示す。AFM部と蛍光顕微鏡の部分に大きく分けられる。蛍光顕微鏡の部分では、本来あるべきサンプルステージと明視野照明用の支柱、タングステンランプを取り除いた。AFM部は全体で5層構造になっている。AFM部全体を支えているのは基盤B1である。レンズリボルバーと鏡筒の間の隙間にステッパーモーターを収め、明視野照明の支柱用の後部の台とステッパーモーターの固定台で基板B1を保持している。図のB1から突き出ている支柱3本で基盤B4が支えられている。この支柱3本の内ステッパーモーターから突き出ているものについては後で詳しく述べる。後ろの支柱2本はネジになっていて、それを回すことで基盤B4（その上にAFMヘッドが載っている）は上下し、この上下動とステッパーモーターから突き出ている支柱でカンチレバーと試料の間の距離が決められる。図では分からないが、B1とB4の上には固定したステンレス球が3個、B2の上には固定していないステンレス球が3個ある。従って、B2はB1の上を、B3はB2の上を、AFMヘッドはB4の上を滑らかに水平移動できる。B2の水平移動とXY軸ピエゾの伸縮でサンプルステージが水平に動く。マイクロメーター4本の内、B1に固定した2本がB2を押し、B4に固定した2本がAFMヘッドを押しようになっている。後者のマイクロメーターでAFMヘッドが移動し、カンチレバーの試料に対する位置決めができる。B2とAFMヘッドには立方形の磁石がそれぞれ2個づつ埋め込まれており、この磁石とマイクロメーターの先端が引っ付いている。基盤全部とAFMヘッドの囲い部分、レーザー系マウント、ステッパーモーターの固定台、ネジなどはすべて熱膨張率の低い ($0.5 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ 程度) 合金であるスーパーインバー鋼材を加工して製作した。

図3：製作したAFM装置の概略図



5.2 AFMヘッド

AFMヘッドとAFMヘッド台（基盤B4）の概略を図4に示す。AFMヘッドはレーザー、ポジションセンサー、ミラー、磁石、カンチレバーホルダーから成る。

- 半導体レーザー

東芝 TOLD9140(S) 出力 20 mW, 波長 685 nm あるいは
東芝 TOLD9201(S) 出力 5 mW, 波長 670 nm

- コリメートレンズ

キノ・メレスグリオ 06 GLC 002, 06 GLC 005

- 1次元ポジションセンサー

浜松ホトニクス S3979 受光面長 3mm
このセンサーはセンテック社製の特注品に交換中

- 平面ミラー

キノ・メレスグリオ 01 MFG 005 12×12×1 mm

- 磁石

信越化学 レアアースマグネット 7×7×7 mm

- 引きバネ

加藤スプリング製作所 E-621 基準荷重 430 g

- 圧縮バネ

加藤スプリング製作所 C-183 基準荷重 445 g

- マイクロメーターヘッド

ミットヨ MHC2-13G ショートストローク

図5にレーザー系を示す。半導体レーザービームの断面は楕円形をしており、楕円率は3程度。2つのコリメートレンズの間にスリットを入れビームの短軸方向を絞って、分解能の高い受光面積の小さいセンサーを使うことができる。レーザーフレームは2本のレーザー角度調整ネジと、ステンレス硬球1つの3点で支えられていて、2本の引きバネによりAFMヘッド上部の板方向に引っ張られている。2本の角度調整ネジで、レーザーのスポット位置をカンチレバー先端部に合わせる事ができる。

図6にセンサーの位置調整部分を示す。センサーの位置を水平、垂直方向に調整できるようになっている。固定されたパーツA上をパーツBが水平方向に滑り、その上を更にパーツCが垂直方向に滑るようにアリ溝が切っている。センサー位置のドリフトを抑えるために、図のようにアリ溝の片方がヒンジとなるように端をえぐっている。センサー固定ネジを締めることにより、水平、垂

図4：AFMヘッドの概略

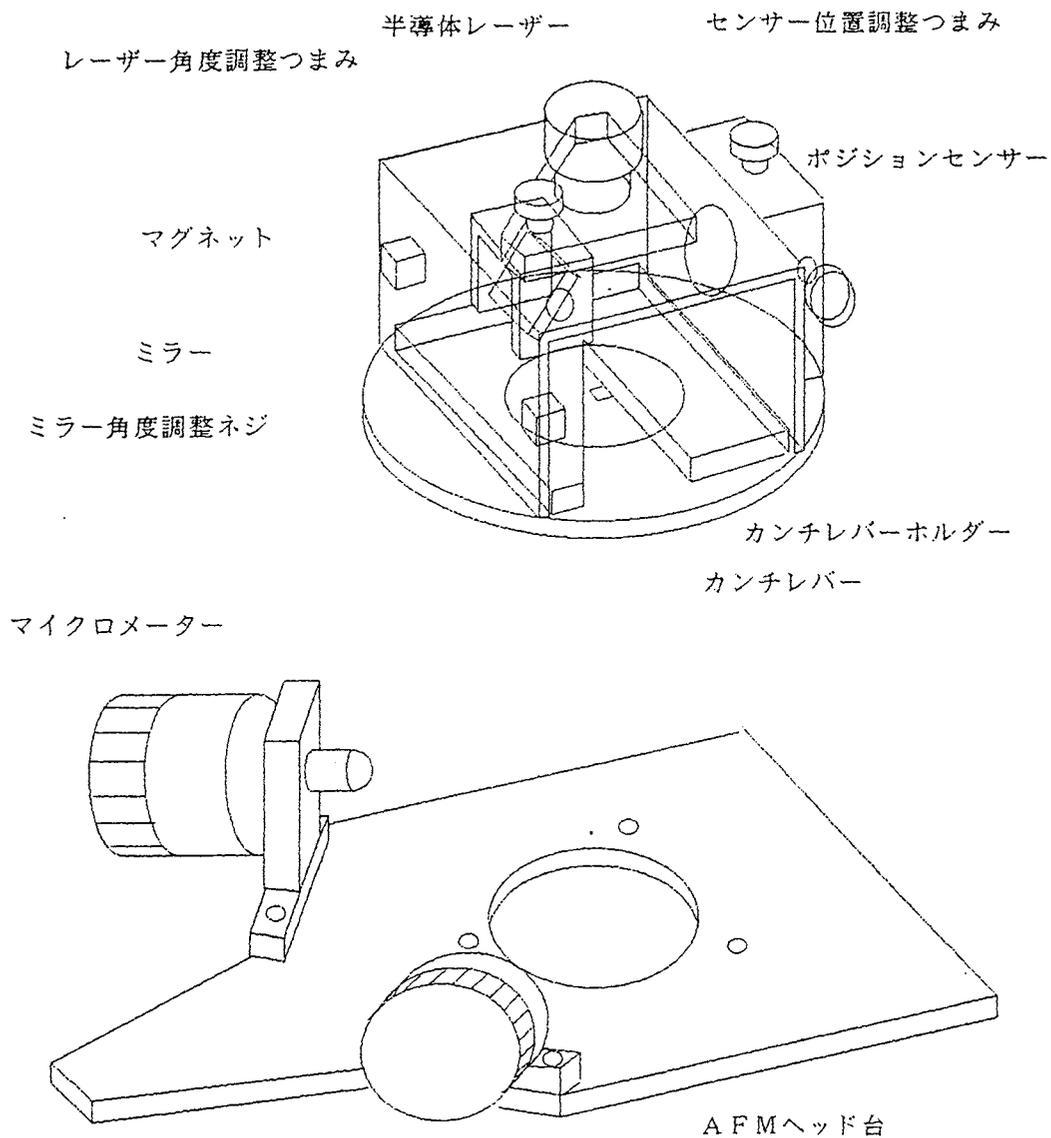
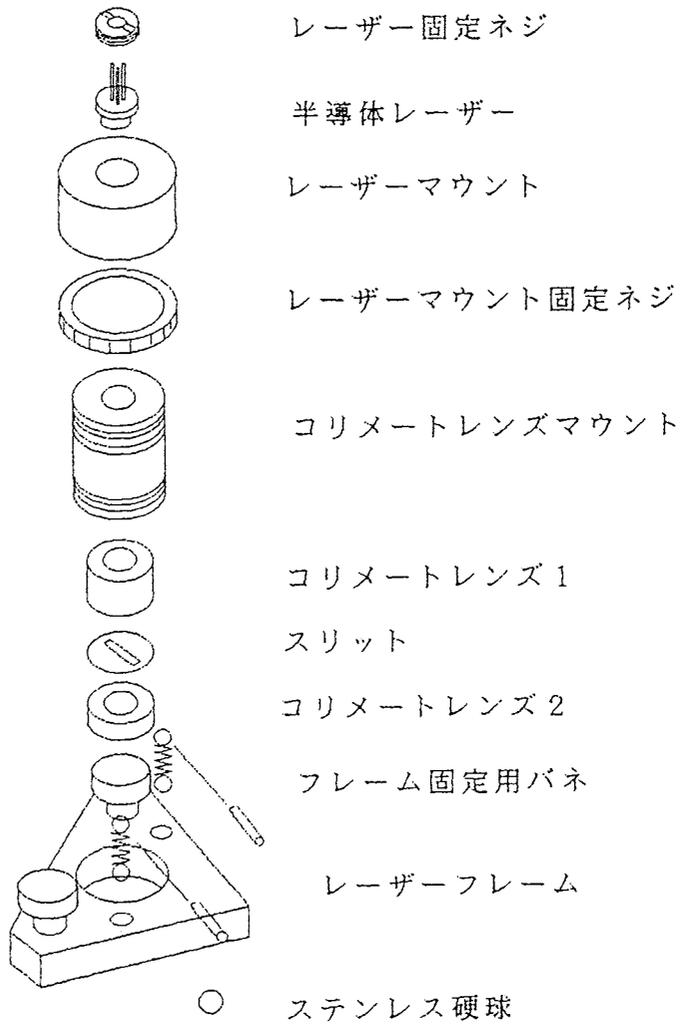
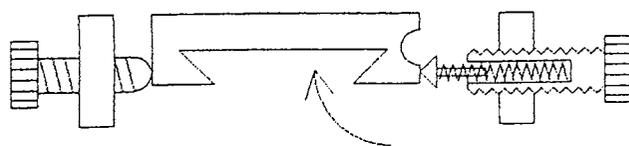
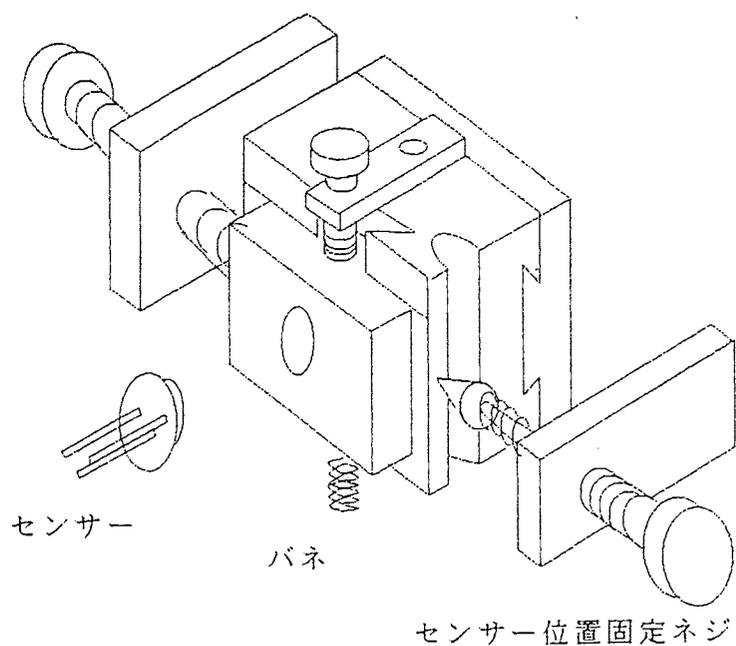


図5：半導体レーザー系



角度調整ネジ

図6：センサー位置調整器



センサー固定ネジを締めると、このヒンジ部分が多少内側にゆがんで、アリ溝を締め付ける。

直両方向のドリフトを同時に止められるように設計されている。

カンチレバーで反射したレーザー光を、センサーに導くためにミラーを使っている。ミラーの角度は調整できるようになっている。ミラー固定ネジを締めて、ミラーホルダーをしっかりと固定し、ドリフトを抑えている。

AFMヘッド台（基盤B 4）の上にステンレス鋼球が3個固定されており、AFMヘッドがこの3点で支持されている。AFMヘッドに固定された2個のマグネットのそれぞれに台に固定されたマイクロメーターの先端にくっつく。マイクロメーターを回して、AFMヘッドを任意の位置に水平に動かせる。AFMヘッド台は3 mm厚のインバー材で作ったが、剛性が低く外部音で共振しやすい。5 mm厚程度にすべきであった。

5.3 ピエゾ駆動部

ピエゾ駆動部の構成を図7に示す。我々のAFM装置で最も特徴的なのがこの部分である。太い円筒ピエゾを使うことにより、その中空部に倒立型蛍光顕微鏡の対物レンズを挿入できる。この対物レンズを通して、蛍光性試料とカンチレバー探針を観察できる。円筒ピエゾはZ方向にのみ伸縮し、XY方向の走査は板ピエゾで行う。板ピエゾは基盤B 3を押す。反対側からは、バネとその先端に接着したシリコンボールで基盤B 3を押し返す。基盤B 3はピエゾフレーム（基盤B 2）の上の載せた（固定していない）3個のステンレス鋼球で支えられている。基盤B 3が基盤B 2に対し水平に移動するが、このとき基盤B 3は絶対に上下してはならない。上下してしまうと、試料の凹凸を観察しているのか、基盤B 3の凹凸を観察しているのか判らなくなる。これを最小限に抑えるために、ラッピングしたモリブデンリングにダイヤモンドライクカーボンコートしたもの、もしくはサファイアリングを用いた。カーボンコートは非常に硬く、表面に傷が入りにくい。B 3の押し返しは、最初バネシリンダーのみで行っていたが、押し返し時にB 3が上下にわずかであるが変位してしまったので、このバネシリンダーの先端に非常に柔らかいシリコンボールを接着し、その弾性でB 3をスムーズに押し返す。この点はまだ改良すべきかもしれない。柔らかいもので押し返すと、共振周波数が低く、速く走査することができなくなるからである。円筒ピエゾが直接接着しているスーパーインバーリングとモリブデンリング（もしくは、サファイアリング）の間にリング状磁石を接着して、基盤B 3ができるだけ上下しないようにしている。以下に使用した部品を列挙する。

- 円筒ピエゾ

富士セラミックス 38φ × 18φ × 1t mm; ±150 Vで1.8 μmの変位

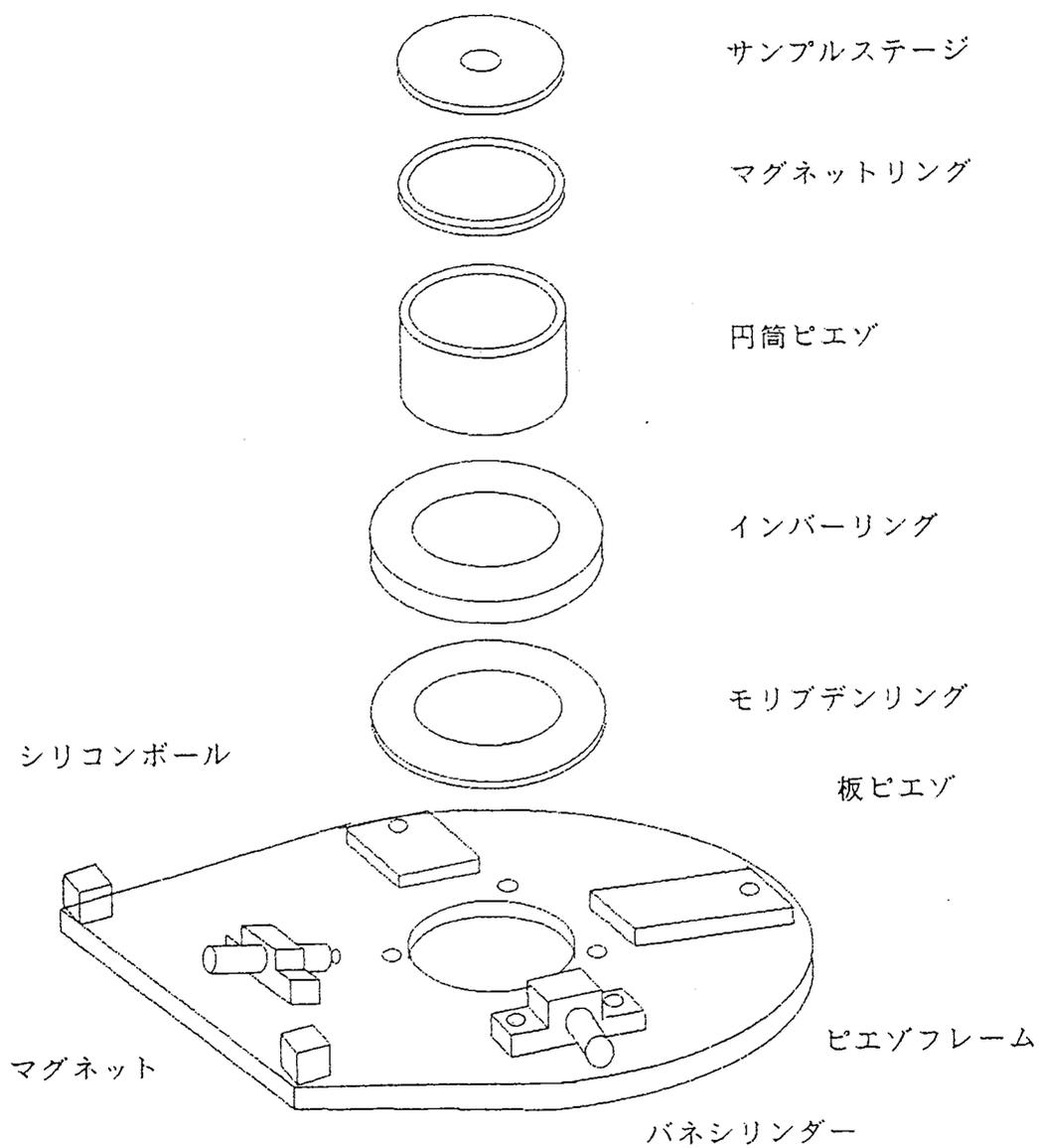
- 板ピエゾ

富士セラミックス 31φ × 10φ × 1t mm; ±200 Vで3 μmの変位

- マグネットリング1

信越化学工業 38φ × 10φ × 1t mm

図7：ピエゾ駆動部の構成



- マグネットリング2

信越化学工業 38φ × 1φ × 1t mm

- マグネット

AFMヘッドで使っているものと同じ

- モリブデンリング

金子製作所 31φ × 10φ × 0.5t mm

- サファイアリング

アース製薬 31φ × 10φ × 0.5t mm

- シリコンボール

コスモ計器

5.4 モーター部分

図8参照。基盤B 1に固定されたステッパームーターの回転軸にオスネジを取り付け、それにメスネジを回し入れる。メスネジはネジ押さえで脇から押さえられているため、モーターの回転でオスネジが回り、メスネジが上下する。メスネジの上部にはステンレス鋼球が固定されていて、その上に基盤B 1が載る。ステッパームーターには最初からハーモニックギヤが内蔵されているため、ステッパームーターの1ステップで軸は0.036度回転する。この回転でカンチレバーの部分が約1 nm動く。

- ステッパームーター

オリエンタルモーター UPD533HG1-NA

5.5 基盤B 1

蛍光顕微鏡のステージと透過照明装置と支柱をはずし、代わりに基盤B 1（付録A.2）を取り付けた。この基盤には上述のAFMヘッド台（基盤B 4）を支える2本のネジとステッパームーターで駆動されるメスネジが取り付けられている。当初の設計では、この支持3点の位置が離れていたため、その上にB 4の共振周波数が低くなってしまい、音による共振があった。そこで、支持ネジ2本を中央にできるだけ近づけるように改良した。この改良でかなりの効果があった。

5.6 カンチレバーホルダー

大気中観察用（付録A.21）と液中観察用（図9）の2種類がある。どちらの物もその底部にV溝と丸溝が切っており、AFMヘッドの底部状面に固定したステンレス鋼球にぴったりと合うようになっている。これにより、カンチレバーホルダーをAFMヘッドに適当に差し入れても自然

図8：ステッパーモーター取り付け部

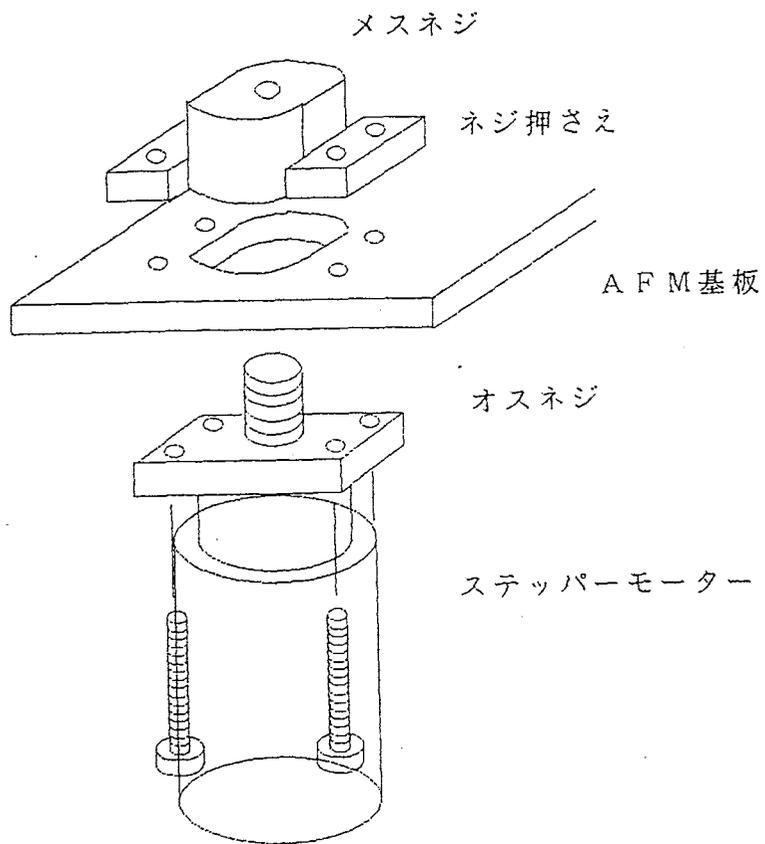


図9：液中観察用カンチレバーホルダー

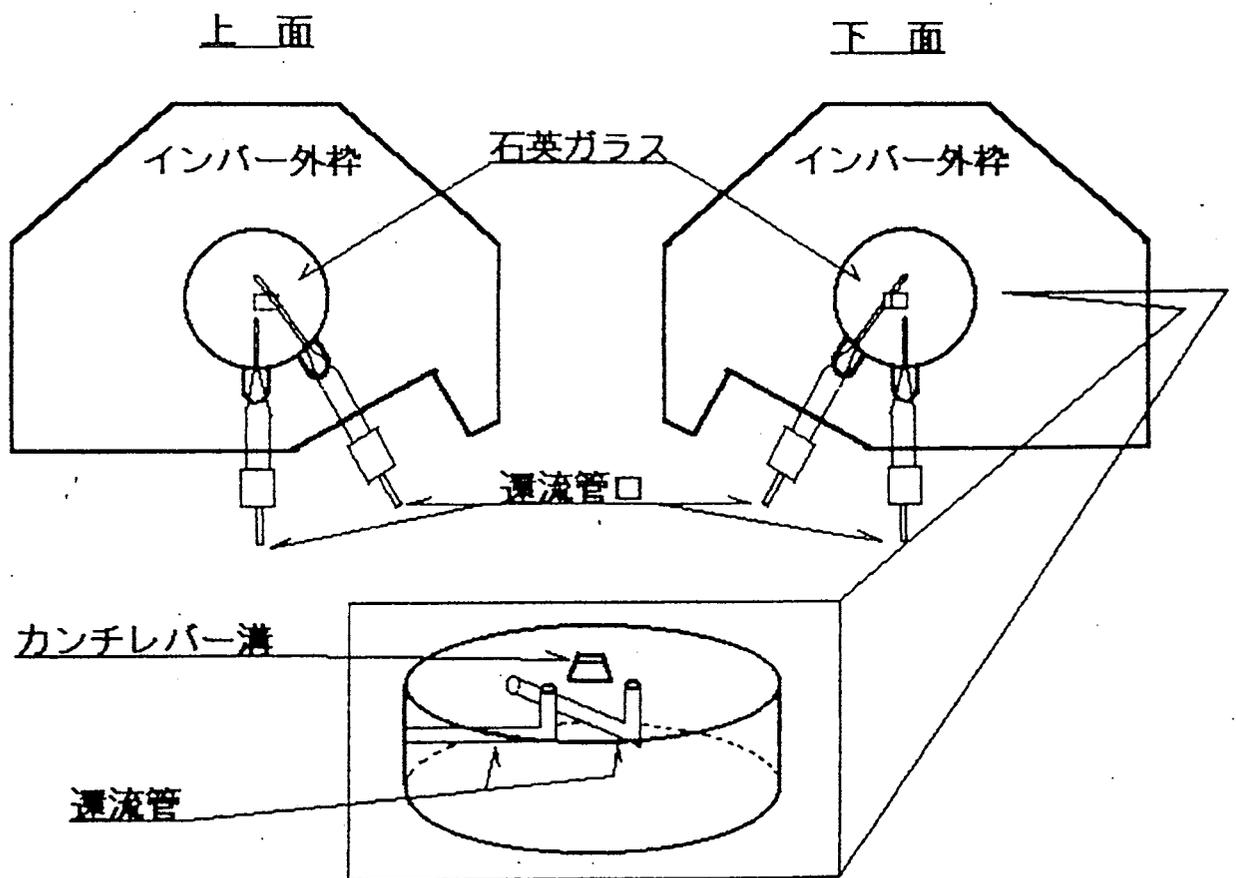
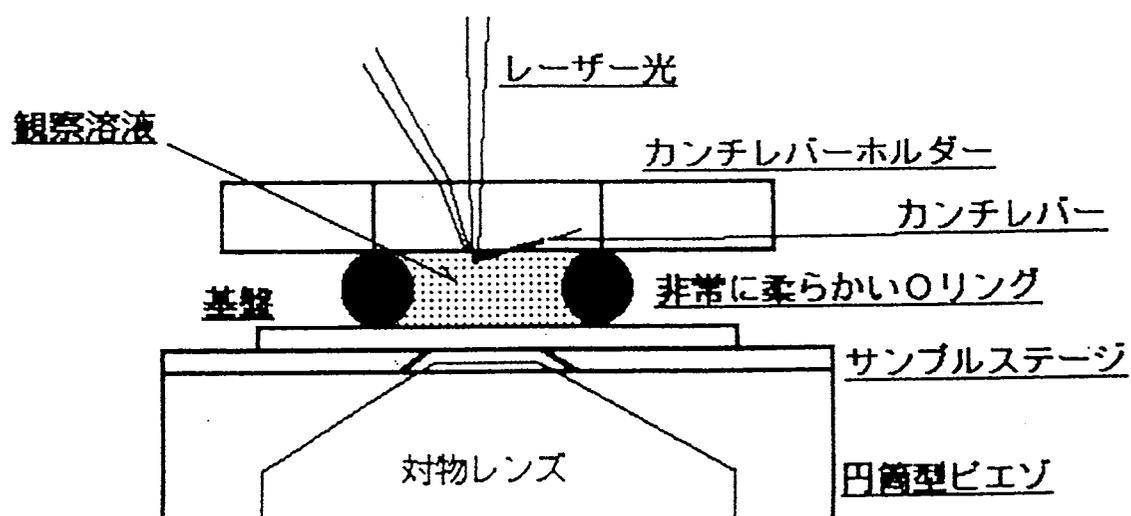


図10：液中観察系の概略

- ・ オープン系：Oリングなし
- ・ クローズ系：非常に柔らかいOリングを使用



に決まった位置に導かれる。液中観察用のものはスーパーインバー材でできた外枠と石英ガラスでできたディスクからなっている。このディスクには、カンチレバーをはめる溝と、液環流用の管2本がついている。ディスク側面の管の出口にはテフロン製のパイプが連結されていて、そのパイプにチューブが連結される。1つは外液を流し入れ、もう1つは液を排出するためのものである。この液中用カンチレバーホルダーは図10で示されるように使われる。試料が載っている基盤と石英ディスクで溶液を挟み込む。溶液の体積は100 μl 程度である。間にはOリングがあり、液が密閉される。このOリングの素材に大変苦労した。Oリングが硬いと円筒ピエゾの上下で試料が載っている基盤が変形してしまう。また、円筒ピエゾが水平に動いてもOリングが歪み、試料が載っている基盤を変形させてしまう。非常に柔らかいOリングは市販されていないので、シリコーンゲルを調製して自作している。

5.7 ドリフト

装置のドリフトはナノメートルオーダーの測定では常に問題になるが、実際にドリフトが観察されたときそれがどのような原因によるかを見出すことはほとんど困難である。従って、設計・製作の段階でドリフトを極力抑えるような工夫を予めしておくことが最良の策である。熱膨張はドリフトの主要な原因になるに、我々のAFM装置の機械部分はほとんどスーパーインバー材で製作した。しかし、蛍光顕微鏡の本体自身はアルミでできている。この点はあきらめざるを得ないが、我々の採用したオリンパス光学のIMTより強固な倒立型蛍光顕微鏡が最近オリンパス光学から市販されているし、Zeissのものもかなりしっかりとした構造になっている。液中観察用カンチレバーホルダーに使っている石英ガラスの熱膨張率はスーパーインバー材並みに小さい。基盤の3点支持に使っている鋼球はステンレス製である。ステンレスの熱膨張率はインバー材より一桁大きい。しかし球は小さいので大きな問題とはならないであろう。いずれにしても、装置全体の温度をできるだけ一定に保つ方がよい。空気の流れも問題であるかもしれない。装置全体をケースに入れてしまうのが理想的だが、蛍光顕微鏡本体が大きいため我々はしていない。我々の装置でもドリフトは問題であるが、Z軸方向のドリフトはよほど大きくない限りコンスタントフォースモードの走査ではフィードバックがドリフトに追随するので問題はあまりない。柔らかい弾性体の使用はドリフトの原因に成りやすい。XYピエゾの押し返しにシリコーンボールを使っているが、この部分も水平方向のドリフトの原因になっている可能性がある。同じ試料の観察を数回繰り返すと、観察領域がずれてくることがよくある。押し返しに使うものの材料を選ぶ必要があるかもしれない。ドリフトは時間的にゆっくりした現象であるので、1画像取得時間を短縮するのも一つの方法である。現在この方向で研究を続けている。

5.8 除振

床からの振動、空気を伝わる音は装置を振動させ、ナノメートルオーダーの観察では常に問題である。床からの振動はよっぽど大きくない限り、市販の空気バネ除振台で十分防げる。但し、台

の共振周波数を低くするため除振台そのものの質量は空気バネが許す範囲で大きいほど効果がある。また、台の上に物を載せたときのバランスも重要である。我々は鉛塊を適当な大きさに切ったものを台の上に適当に配置している。装置そのものの共振周波数は高ければ高いほど良い。蛍光顕微鏡本体は変えようがないので、AFMの部分の共振周波数をできるだけ高くするしかない。硬いものでコンパクトに作れば良い。実際にはコンパクトに作ることはそう簡単ではない。この点で我々の製作したものもまだ改良の余地がある。基盤B1、B4をもっと厚いスーパーインバー材で作るべきであったし、すべての3点支持をもっと中央に寄せるべきであった。B4の3点支持は対物レンズがそばに位置していることと、ステッパーモーターを取り付ける空間が蛍光顕微鏡の鏡筒と対物レンズリボルバーの間にしかなかったために、中央に寄せることが困難であった。それでも、できるだけ中央に寄せることで、人の声による振動はかなり軽減された。いずれにしても、基盤などの板でも無駄な部分をできるだけ削るほうが良い。我々の装置では、大きな声を出したりしない限り問題はない。隣接する部屋からのドアを閉める音など瞬間的な大きな音に対してはまだ影響が出る。しかし、短い時間なので画像全体にはほとんど影響しない。

- 空気バネ除振台

ヘルツ工業 TDI-107LA

6 制御システム

AFMの制御はデジタル制御を採用し、DSPチップを搭載した高速信号処理装置により行う。予めピエゾのヒステリシス特性を求めておく(後述)。その特性をソフトウェアで補正しながらD/A変換信号をピエゾドライブに入力し、ピエゾドライブで増幅してXY走査用ピエゾを駆動する。また、この走査ではピエゾのリングング(後述)が現れないようにピエゾには時間的にある勾配をもつ電圧を印加する。走査中のカンチレバーのたわみはポジションセンサーにより検知され、アンプを通り信号処理装置でA/D変換される。その信号からカンチレバーのたわみ量が求められるので、コンスタントフォースモードで走査するときには、そのたわみ量を消去する電圧がZ方向用の円筒ピエゾにかかるようにD/A変換信号をピエゾドライブに入力する。コンスタントフォースモードでは、ある走査点での試料の高さはそれ以前の全走査点でのたわみ量の積分値で与えられる。信号処理装置は、ホストコンピュータであるPC9821につながれていて、ホストコンピュータで開発された信号処理プログラムは信号処理装置にダウンロードされる。ダウンロードされると、信号処理装置はホストコンピュータに関係なく与えられた動作を行う。X方向の行きの走査で得られたデータはX方向の帰りの走査時にホストコンピュータにアップロードされ、ディスプレイにそのトップビューが描かれる。ホストコンピュータはステッパモーターの制御も行う。制御システムの概略を図11に示す。

6.1 高速信号処理システム

高速信号処理装置は色々なメーカーから市販されていて、値段もずいぶん幅広い。選択のポイントとして2つ挙げられる。以下に示すようなボードが複数枚搭載できること、ソフトウェア環境(Libraryやサンプルプログラム)が整っていること。16bitのA/DやD/Aを搭載できるものは数少ない。以上の条件からmttの製品を選択した。mttからはもっと高速なタイプも出しているが、価格が高いのであきらめた。

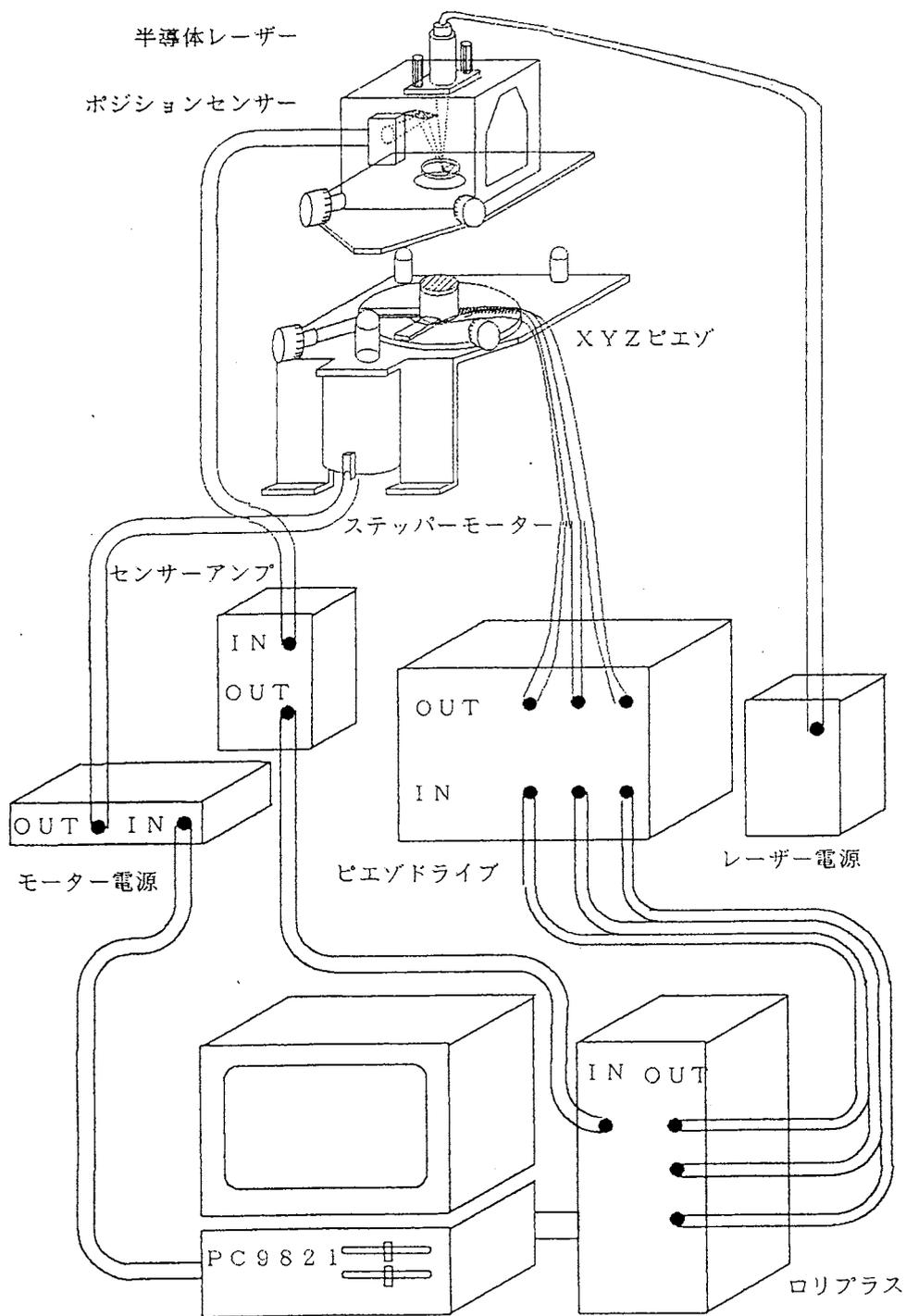
- 高速信号処理装置

(株) mtt LORY PLUS

LORY PLUSは以下のボードで構成される。

- DSP4100 32bit浮動小数点DSP ボード
AT&T社のデジタルシグナルプロセッサ(DSP32C)を搭載した高速デジタル信号処理ボードで以下の特徴をもつ。
 - ゼロオーバーヘッドループ
 - 32ビット浮動小数点演算
 - 単精度IEEE変換機能
 - ビットリバースアドレッシングモード

図11：制御システムの概略



- 4個の40bit アキュムレータが並列動作
 - 1536ワードのオンチップRAM
 - 16M Byteのメモリー空間
 - 8,16,32bitによるメモリーアドレス
 - 16bitと24bitの整数オペレーション
- DSP4216 16bitA/D ボード
±10 Vを16bit分割するので $\Delta V = 20 \text{ V} / 65536 = 0.3051 \text{ mV}$ であるが、実際にはノイズがあるため14bit程度の性能しかない。
 - DSP4020 14bitD/A ボード
 - DSP4040 クロックボード
3個の水晶発振器があり、任意の分周比(8~3999)が設定でき、豊富な周波数を設定可能。
 - DSP4050 フィルターボード
ホストコンピュータから制御できるプログラマブルローパスフィルター入力と出力で各1枚ずつ。カットオフ周波数20 kHz, 10 kHz, 500 Hz, 200 Hz, 100 Hz, 50 Hz, 20 Hz, 10 Hzから選択。

6.2 その他の機器

- ホストコンピュータ
NEC PC9821 AP
- ディスプレー
NEC PC-KM151
- レーザー電源
ILX Lightwave Corporation LDX-3412 最大出力200 mW
- 3チャンネルピエゾドライブアンプ電源
松定プレジジョンデバイセス HVME-0.2B × 3-KU 最大電圧±200 V
- センサーアンプ
浜松ホトニクス 1次元PSD信号処理回路 C3683-01
- モーター電源
オリエンタルモーター 5相ステッピングモータードライバー UDX5107N
- 高速2軸位置決めボード
ハイパーデック HP98-PPD2

7 走査方法

7.1 ヒステリシス補正

piezoの電圧印加による伸縮現象にはヒステリシスがつきまとう。これを何らかの方法で補償しないと、AFM像は歪む。補正の仕方には2通り考えられる。1つはpiezoの伸縮を実際にモニターして、伸縮を制御する方法である。オリンパス光学の装置ではこの方法を採用している。第2は、予めpiezoのヒステリシスを測定しておいて、或るアルゴリズムでソフトウェアで補正する方法である。後者の方法は予め伸縮のさせ方が分かっている場合には有効であるが、コンスタントフォースモードでのZ軸piezoの駆動は試料の凹凸に応じて行うため、伸縮の仕方を予め知っておくことはできない。伸縮を実際にモニターする方法が理想的ではあるが、システムが複雑になる。我々の測定対象は蛋白質であるので、Z軸方向の変位はせいぜい100 nm程度である。このように小さい変位ではヒステリシスは無視しても大きなエラーになることはないので、ソフトウェアによる補正を我々は採用した。

図12にヒステリシスの概念図を示す。図の横軸がpiezoにかかる電圧、縦軸がpiezoの変位である。図ではpiezoにかかる電圧の代わりに、piezoドライブ電源で増幅される前のpiezoドライブ電源に入力する電圧を用いている。増幅率はpiezoドライブ電源でマニュアルで変更できる。最大入力電圧を±10 Vとする。その間を定期的なサイクリックにかけたときのヒステリシスループをグランドループと呼ぶ。グランドループの内側に小さいヒステリシスループがあるが、これをローカルループと呼ぶ。ローカルループは始点Bと折り返し点Pにより様々な形を取るため、決まった式で近似するのは不可能である。しかし、グランドループの形は常に同じなので、このグランドループの単純な変形でローカルループが近似できると仮定する。

以下に補正のアルゴリズムを述べる。伸びるときのグランドループに2次曲線をフィットしたものを $L = f(V)$ 、縮むとみのものを $L = g(V)$ とおく。同様に、ローカルループにフィットしたものを、それぞれ f' 、 g' とおく。まずグランドループを測定し(測定法は後述) $f(V)$ と $g(V)$ を求める。 f' は以下のように求める。まず、 f の始点がローカルループの始点Bに一致するようにベクトル $\vec{M} = (M_V, M_L)$ だけ平行移動した式を f_M とする。

$$f_M(V) = f(V - M_V) + M_L \quad (1)$$

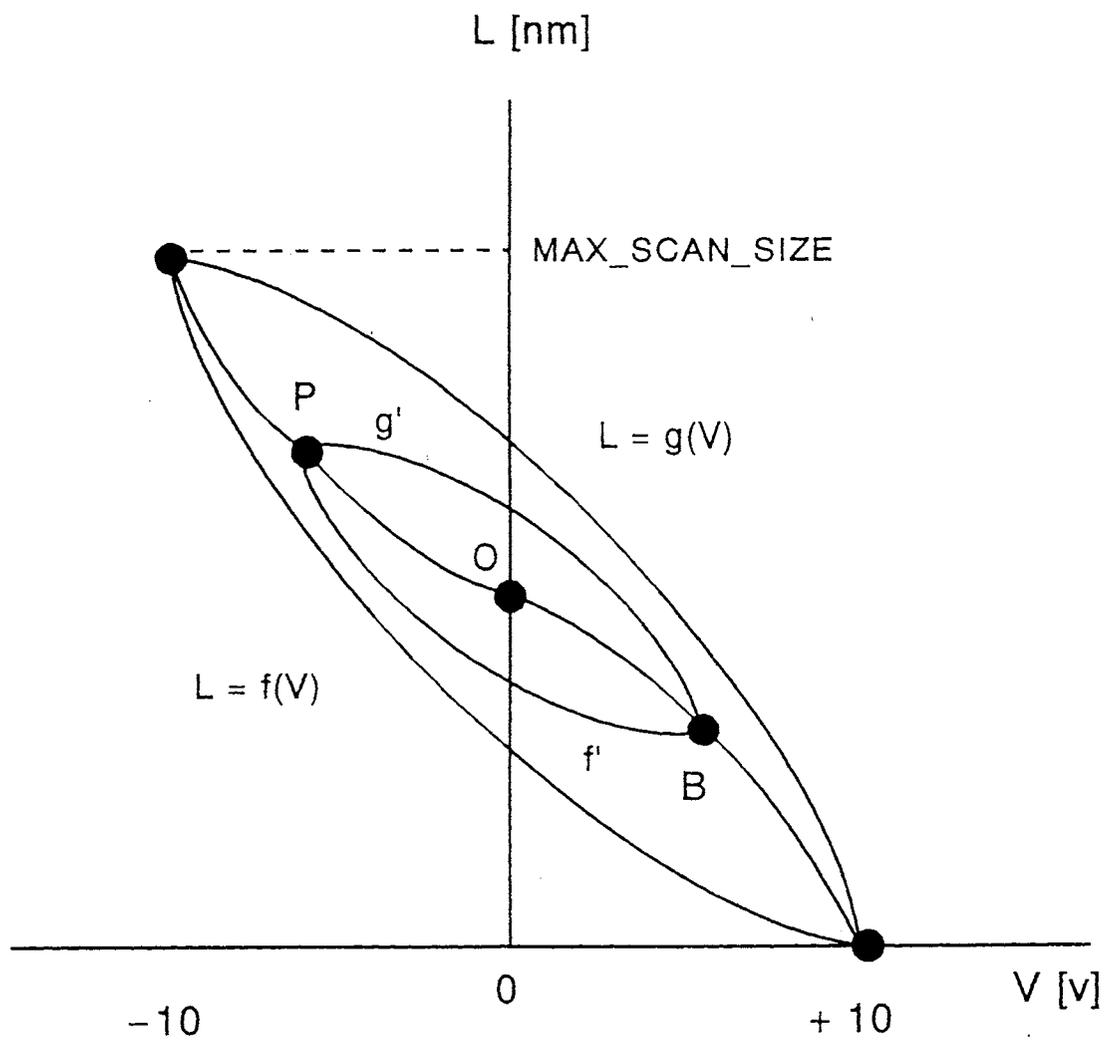
次に、この f_M が、折り返し点 $P(P_V, P_L)$ を通るように始点 $B(B_V, B_L)$ を原点として補正值 $rect$ をかけた式を f' とする。

$$f'(V) = rect\{f_M - B_L\} + B_L = rect\{f(V - M_V) + M_L - B_L\} + B_L \quad (2)$$

つまり、ローカルループの始点Bと折り返し点Pを決めれば、上式より f_{rec} が決まり、近似曲線 f' が決定される。近似曲線 f' が求めれば、ドライブしたいpiezoの長さ $f' = L$ のときの電圧 V は式2より、

$$V = f^{-1}((L - B_L)/rect - M_L + B_L) + M_V \quad (3)$$

図12：ピエゾのヒステリシス



上記の議論はB点とP点の電圧値が最初から分かっている場合にその間の曲線を求める方法を示した物である。実際にはB点とP点の電圧値はまだ求まっていない。走査を始める前にはピエゾには電圧はかかっていないので、走査開始は常に原点からということになる。それで、次にB点とP点の電圧値を求める近似法について述べる。まず、原点とグラドループ上のMAX_SCAN_SIZE点をつなぐ曲線を上記の方法で求める。この曲線上に伸ばしたい距離 P_L を与える点を取り、 P_V が決まる。曲線 g' はグラドループ $g(V)$ のMAX_SCAN_SIZE点をP点に平行移動させたものとする。この g' 上の縮ましたい距離 B_L を与える点Bをとる。これで、P点とB点の座標が求まったので、曲線 f' は上述の近似曲線を求める方法で求まる。

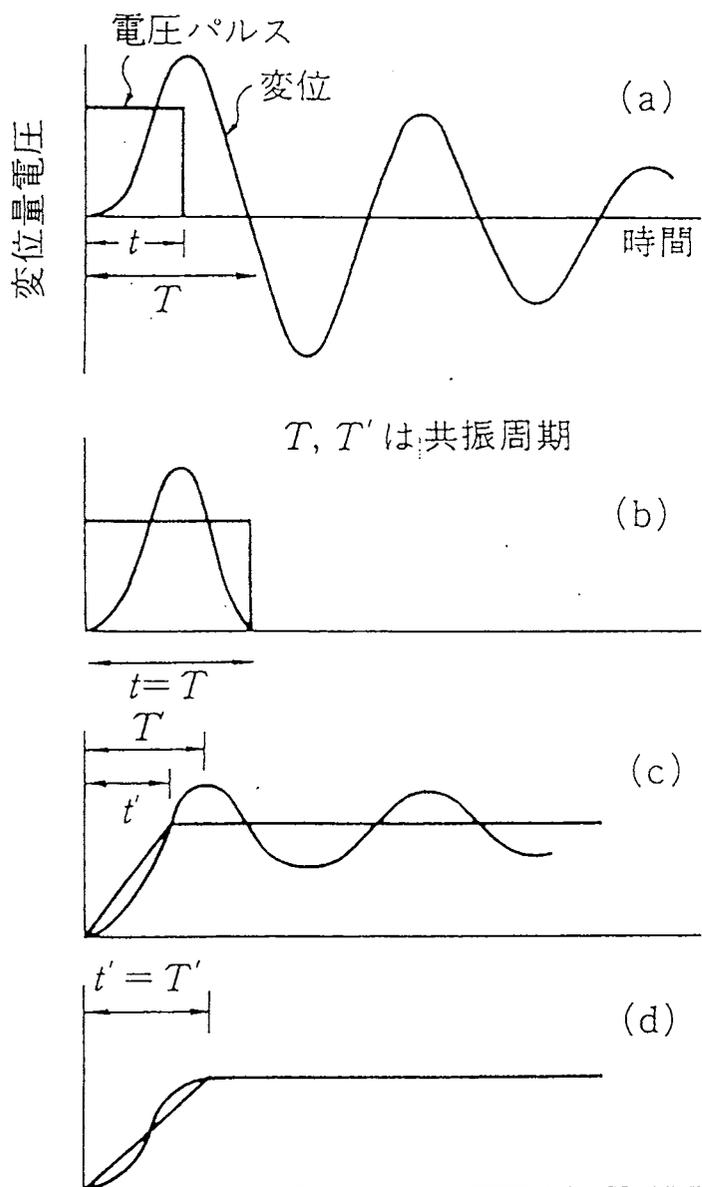
7.2 リンギングの回避

弾性体をその共振周波数以上の周波数で動かすと弾性体がその共振周波数で振動してしまう。ピエゾについても同じことで、この振動は長時間続く。この現象をリンギングという(図13-(a),(c))。これを抑えるには、電圧の立ち上がり時間をピエゾの共振周期に等しくとればよい(図13-(d))。D/A変換した信号をピエゾドライブに加えるので、電圧の立ち上がりは小さいステップ状電圧を実際には多数含むことになる。我々はこの抑制方法を採用したが、我々の使っているピエゾの共振周期は長い(後述)。従って、走査時間が長くなるという欠点をもつ。それで別の抑制法を試みる予定である。共振周期より短時間で電圧を立ち上げるときにはやや大きいステップ状電圧を多く含むことになるが、D/A変換されたステップ状電圧をピエゾの共振周波数程度以下のLowpass Filterにかけてからピエゾドライブに加えれば、リンギングは回避できるものと思われる。

7.3 フィードバックのかけ方

カンチレバーと試料との間にかかる力を一定にしながら走査するコンスタントフォースモードでは、カンチレバーのたわみ量を検出しながらZ軸ピエゾにフィードバックをかける。このフィードバックをかける方法には2通りある。一つはアナログフィードバックで、カンチレバーのたわみ量で検知された力と予め決められた力の差に対応するカンチレバーのたわみ量を走査時に常に積分器で積分し、その積分値だけZ軸ピエゾが変位するような電圧をZ軸ピエゾにかける方法である。この方法では、フィードバックが絶えずかかっていて理想的ではあるが、時としてフィードバックが発振してしまうという欠点がある。フィードバック量を決めるパラメーターの設定がなかなか難しい。我々はデジタルフィードバックを採用した。この方法では発振ということはない。例えば、 200×200 点で各点のデータを画像化するとき、各点でカンチレバーのたわみ量を検出し、予め設定されたたわみ量になるようにZ軸ピエゾを変位させる。このフィードバック後カンチレバーのたわみ量が予め設定されたたわみ量になっているかどうかはチェックしないで次の点に移動させている。絶えずチェックして予め設定されたたわみ量に或範囲内で一致しながら走査することも試みたが、得られた画像はかえって良く無かった。データ取得点以外の点ではフィードバックはかけていない。すなわち点と点の間ではフィードバックがかかっていないと

図13：ピエゾのリングング



いう欠点をもつ。しかしながら、実際に得られた蛋白質の画像を見ると問題はないように思われる。蛋白質のように小さいものでは起伏が小さく、問題はないのであろう。だが、まだデジタルフィードバックに改良の余地はある。「リングングの回避」の節で述べたように、現在のXY走査の仕方では走査に時間がかかる。従って、データ取得点以外の点でもフィードバックをかけると更に走査に時間がかかってしまう。D/A変換されたステップ状電圧にLowpass Filterをかける方法がうまく動作すれば、走査時間が短くなり、データ取得点以外の点でもフィードバックをかけられるようになるであろう。

7.4 プレスキャン

我々の走査方式では、X軸方向を往復させながらY軸方向に少しづつ動かしている。ピエゾのヒステリシス補正の仕方は既に述べた通りである。常に原点から出発してピエゾに電圧をかけるが、ヒステリシスが定常ループに入った時点から実際の走査に入った方が、ヒステリシス補正はより確かになるであろう。そこで、実際の走査に入る前に特にX軸ピエゾについては数回往復させてから実際の走査に入るようにしている。Y軸についても行っているが、Y軸方向は往復しないのであまり意味が無いかもしれない。

7.5 傾き補正

XY走査でサンプルステージをナノメーターの精度で完全に水平に移動させることはできない。必ず傾きをもつ。従って、得られる画像にはサンプルステージの傾いた画像の上に試料の画像が乗ることになる。これを補正もしくは回避する方法として2つある。傾いたステージはかなりの精度で平面と考えてよいであろう。そこで、実際の画像取得の走査を始める前にX方向に3本、Y方向に3本程度走査して、ステージ平面の傾き具合を調べ、画像取得走査時にこれを補正するようにZ軸ピエゾを変位させつつ走査する。この方法は市販の装置で採用されている。我々はこの補正法をまだ試していない。我々は画像を取得したあとにその画像からステージの傾きを調べ、傾きがなくなるように画像を処理している。あまり傾きがひどくなければ、コンスタントフォーモードの走査ではこの方法で問題はない。

8 予備測定

実際に装置を組み上げただけでは、画像観察に入ることはできない。いくつかのパラメータを測定により決定しなければならない。以下にそれらの測定について述べる。

8.1 カンチレバーのたわみの定量化

カンチレバーのたわみはポジションセンサーアンプからの電圧出力で捕らえられる。このたわみ量とアンプ出力電圧との定量的関係をまず求めなければならない。我々は距離のスタンダードとして、ステッパーモーターの1ステップでカンチレバー探針位置での基盤B4の上下量を採用した。1ステップ当たりのモーターシャフトの回転角、シャフトに取り付けたオネジとメネジのピッチ、基盤B4の支点位置、カンチレバー探針位置の数値から、1ステップ当たりの探針の変位量を1.09 nmと見積もった。カンチレバーをサンプルステージにエンゲージさせた後に探針を更に下げると、その変位に応じてセンサーアンプ出力電圧が図14、15のように直線的に変化した。このグラフより、単位電圧当たりの探針の変位量が以下のように求まった。

- 長さ200 μm のカンチレバー： 213 nm/V
- 長さ100 μm のカンチレバー： 145 nm/V

8.2 光てこ倍率

鏡の一端を支点として、他端を変位させる。この鏡にレーザーを当てて、反射光のスポット位置のずれを測る。スポット位置のずれは、鏡が小さいほど、また鏡のレーザー入射点からセンサーまでの光路長が長いほど大きい（光てこ）。この光てこの倍率は以下の式で与えられる。

$$\text{光てこの倍率} = 2 \times \text{光路長} / (\text{鏡の支点からレーザー入射点までの距離}) \quad (4)$$

我々の装置では、光路長は約8 cmであるので、光てこ倍率は

長さ200 μm のカンチレバーでは 800 倍

長さ100 μm のカンチレバーでは 1600 倍

と概算できる。他方、センサーアンプのメーカーの規格では、1 Vの電圧変化はレーザースポットのずれ0.15 mmに対応する。この値と前節の実測値から光てこ倍率は

長さ200 μm のカンチレバーでは $0.15 \text{ mm} / 213 \text{ nm} = 704$ 倍

長さ100 μm のカンチレバーでは $0.15 \text{ mm} / 145 \text{ nm} = 1034$ 倍

となる。200 μm のカンチレバーでの光てこ倍率の実測値は計算上の値とほぼ一致しているが、100 μm のものでは一致が見られない。この原因は定かでないが、カンチレバー自身の問題であるかもしれない。高さ方向の情報を正確に知るためには、実際に使用するカンチレバーを用いて標準試料でセンサー出力電圧と探針の変位との比例係数を求めておくことが必要である。我々はオリ

図14：ステージ移動とセンサー出力の関係（200 μm のカンチレバー）

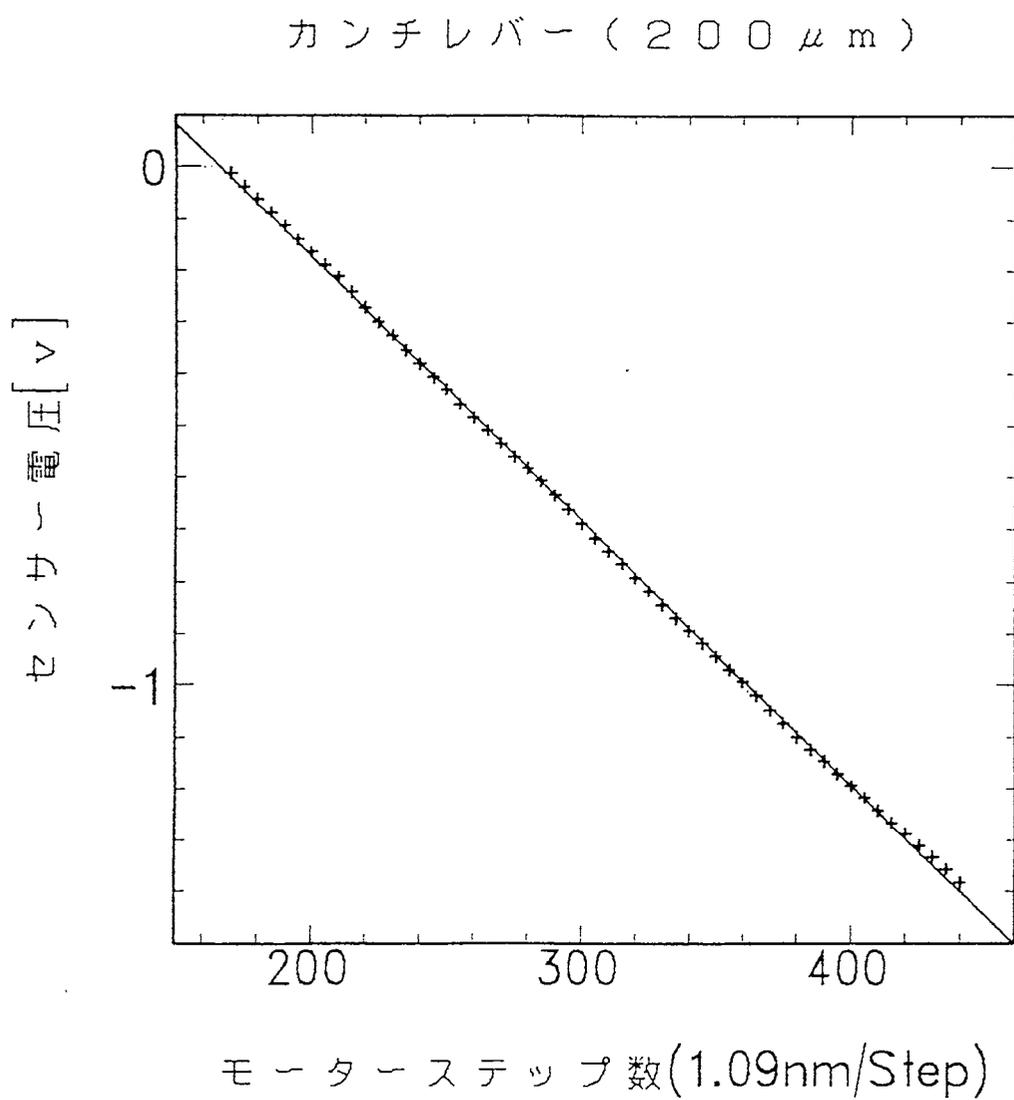
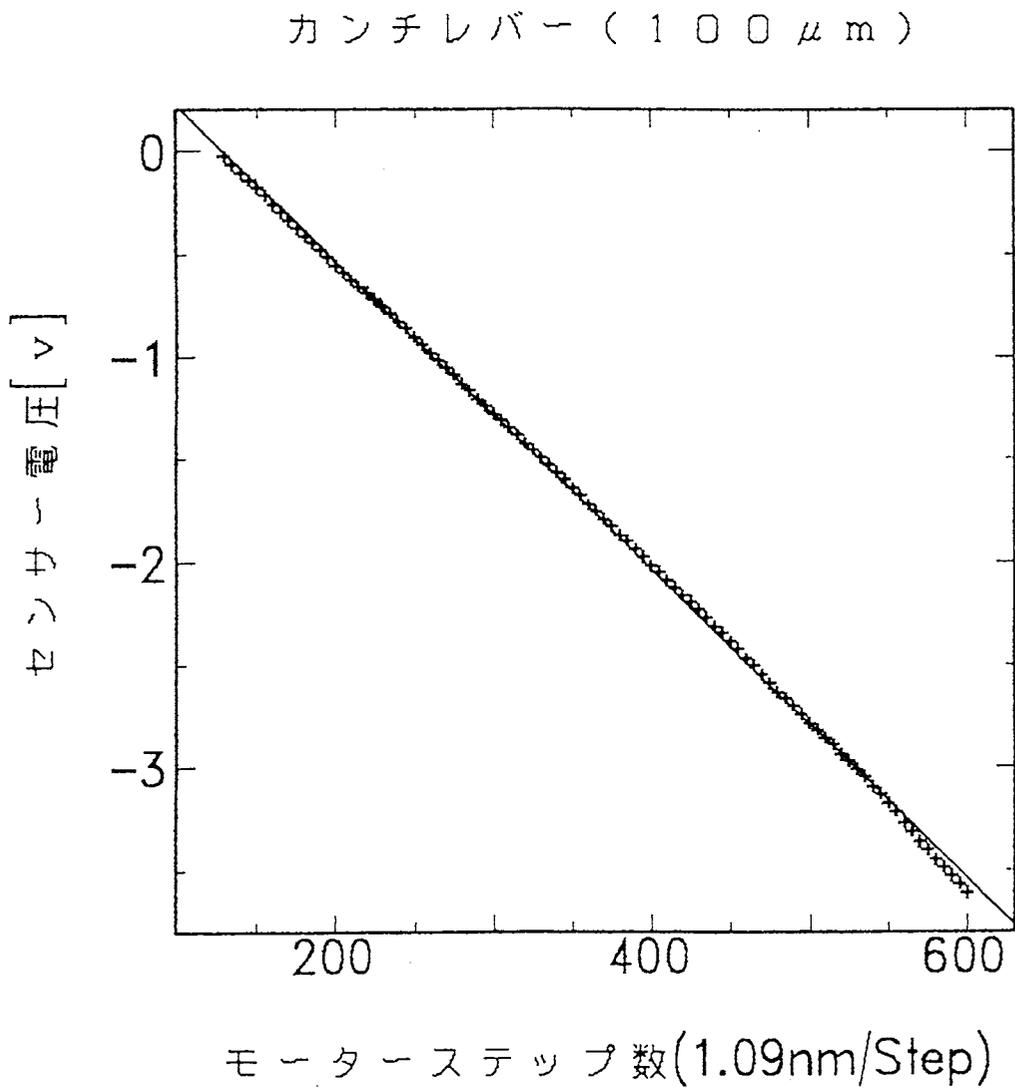


図15：ステージ移動とセンサー出力の関係（100 μm のカンチレバー）



ンパス光学の標準試料を使って最終的な比例係数を求めているが、この標準試料自身の精度も完璧とは言えない。資金に余裕があれば、VLSIスタンダード社の標準試料を使いたい。

8.3 ピエゾの共振周波数測定

ピエゾのリングングについては既に述べた。リングングを回避するために、ピエゾに加える電圧の立ち上がり時間をピエゾの共振周期に取ればよい。そこで使用するピエゾの共振周波数を求めなければならない。我々は実際には共振周波数を測定する代わりに、電圧の立ち上げ時間を色々変えてリングングを最小にする立ち上げ時間を見い出すことにした。図16に円筒ピエゾについての測定結果を一部示す。図の上の曲線は立ち上げ時間0.18 msecの応答、下は0.8 msecでの応答である。0.8 msecの立ち上げ時間ではリングングがほとんど抑えられていることが判る。こうして、円筒ピエゾと板ピエゾの共振周波数が以下のように求められた。

- 円筒ピエゾ 1250 Hz (電圧立ち上げ時間 0.8 msec)
- 板ピエゾ 4167 Hz (電圧立ち上げ時間 0.24 msec)

8.4 ピエゾのヒステリシス測定

板ピエゾの伸びは3500 nmと大きく光でことAFMに組み込んだポジションセンサーを直接利用するとセンサーの有効範囲を越えてしまう。別に治具と測定装置を組めば良いのだが、めんどろになるので別の方法を使った。1 mm中に2400本(間隔416.7 nm)の溝がある回折格子を標準試料として観察してヒステリシス曲線を求めた。測定は、±10 Vの間の三角波D/A信号をピエゾドライブ電源で20倍に増幅し、この標準試料を1次元走査して起伏データを得る(図17、18)。溝の谷の位置を縦軸、その位置でのサンプリングステップ数を横軸にとって、ヒステリシスループを得た。このヒステリシスループの行きと返りの曲線に、それぞれ2次曲線($y = ax^2 + bx$)を最小二乗法でフィットしたものが図19である。2次曲線の係数は以下のように求まった。

- 伸び $a = 7.316 \times 10^{-5}, b = 2.627 \times 10^{-2}$
- 縮み $a = -5.423 \times 10^{-5}, b = 5.217 \times 10^{-2}$

上のヒステリシスループの横軸と縦軸をそれぞれ電圧、変位に変換する。変位は回折格子の溝のピッチより求めた。こうして、ヒステリシスの2次曲線が以下のように求まる。

- 伸び:

$$f(V) = 3.048V^2 - 170.422V + 1399.395 \quad (5)$$

- 縮み:

$$g(V) = -2.2365V^2 - 170.421V + 1927.856 \quad (6)$$

図16：ピエゾ入力電圧の立ち上げ時間のリングングへの効果の観察例

ピエゾのリングング

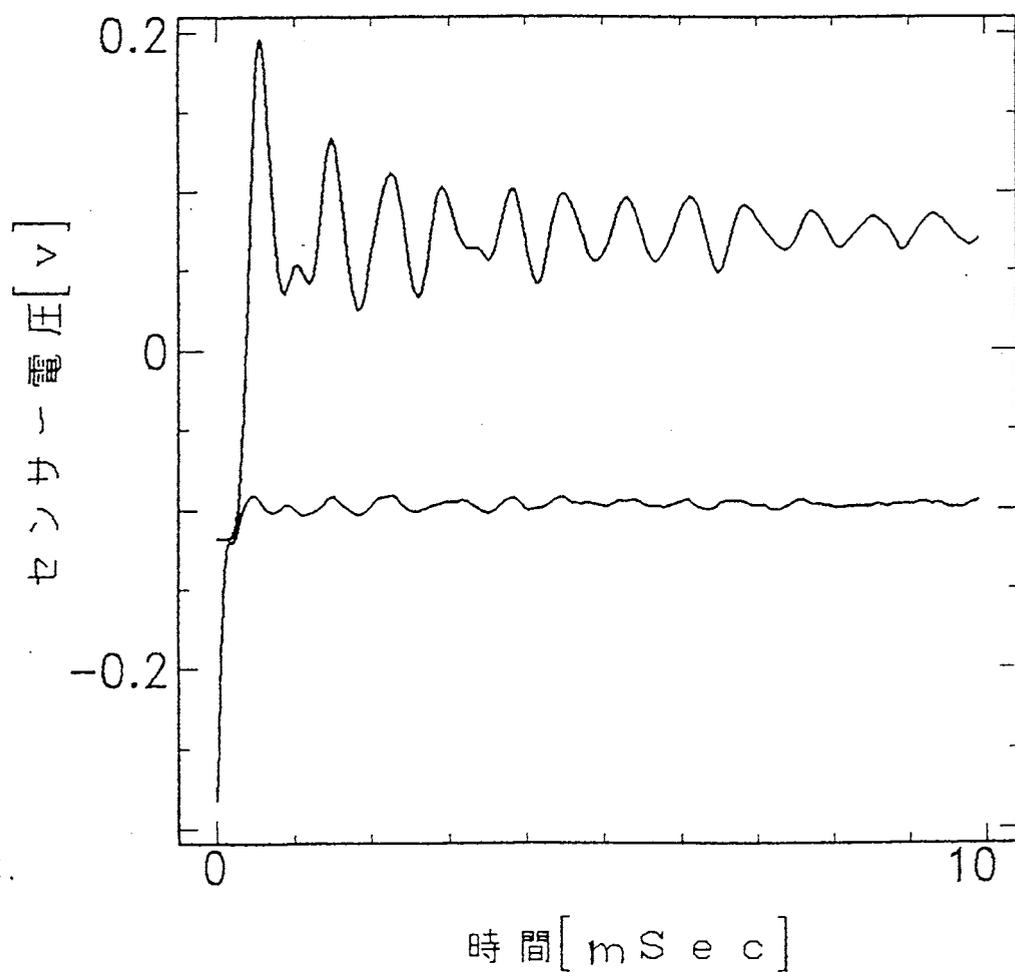


図17：ピエゾのヒステリシスの回折格子観察の及ぼす効果（行き）

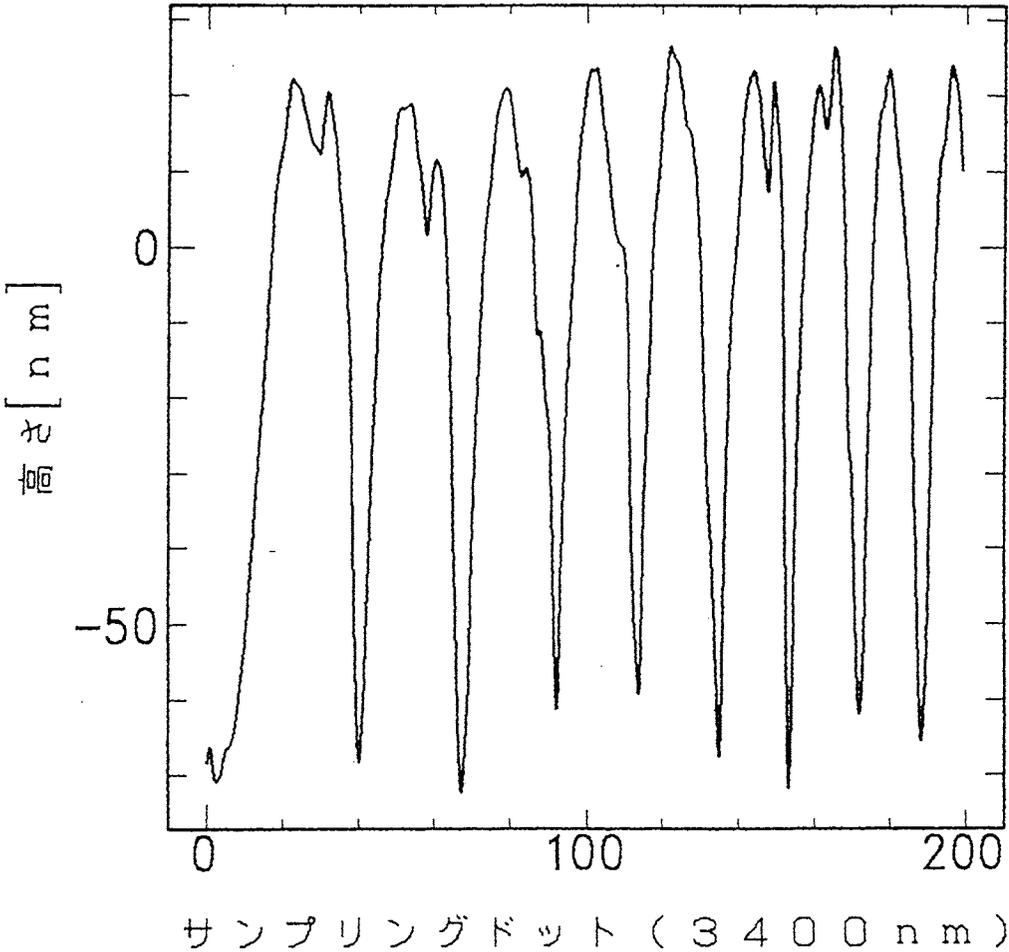


図18：ピエゾのヒステリシスの回折格子観察の及ぼす効果（返り）

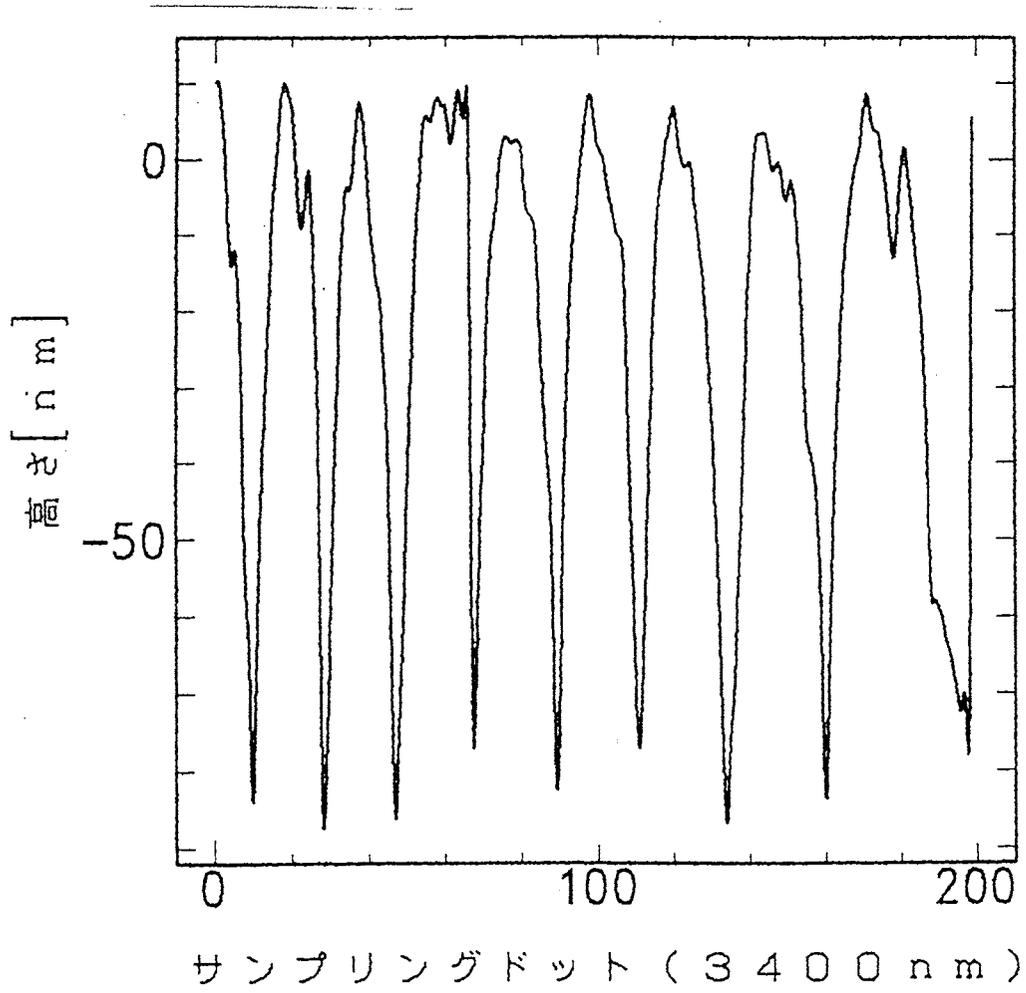


図19：板ピエゾのヒステリシスループ

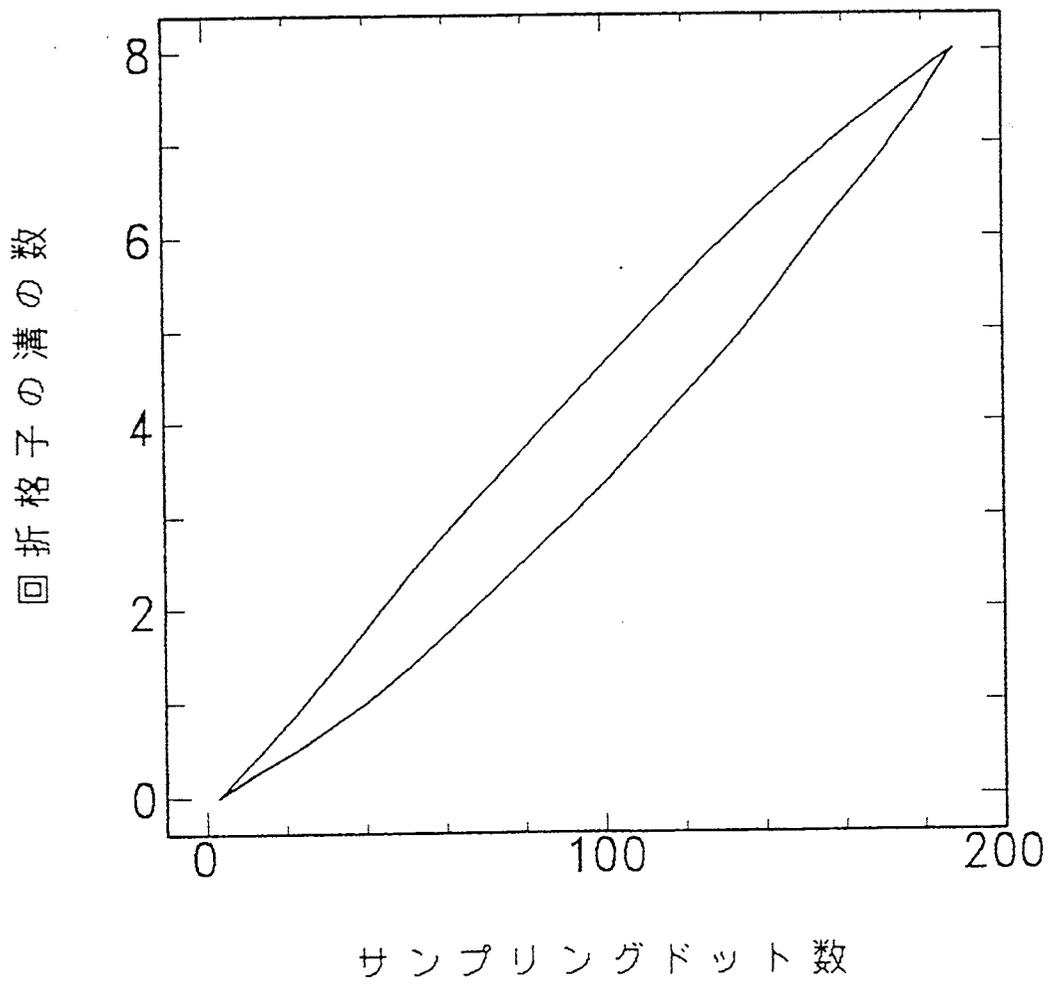
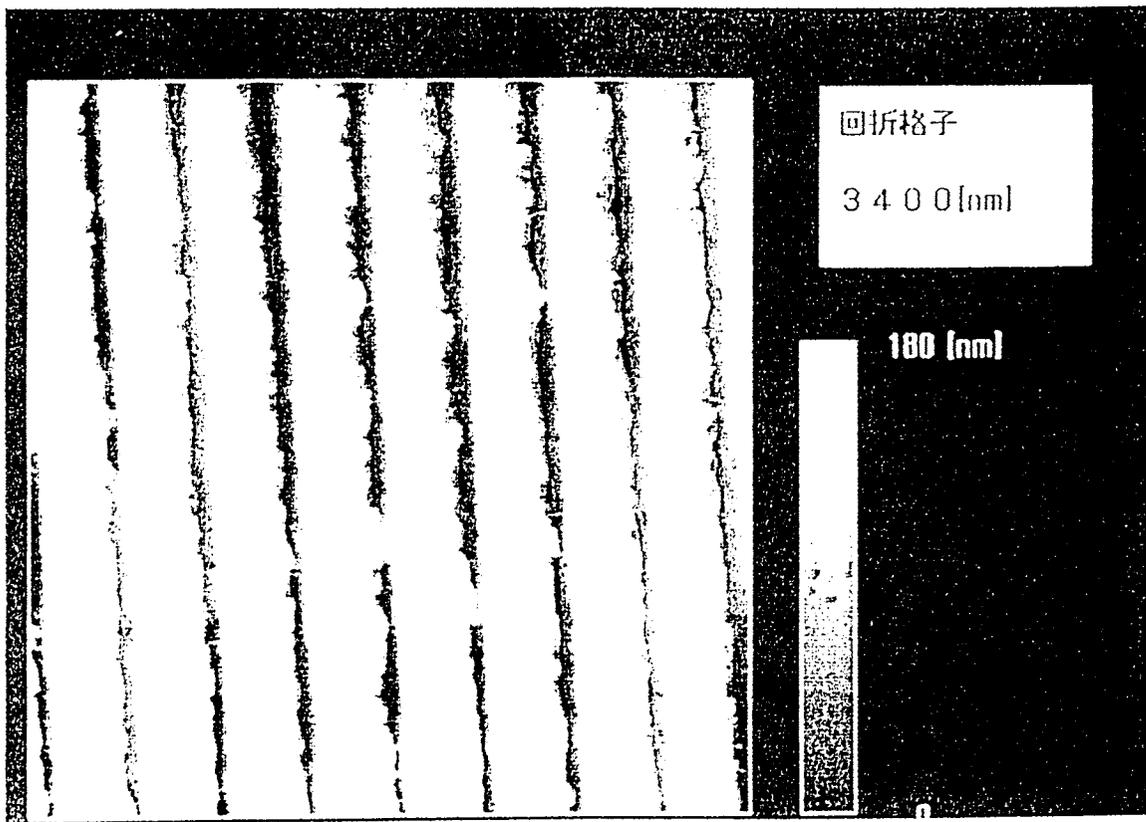


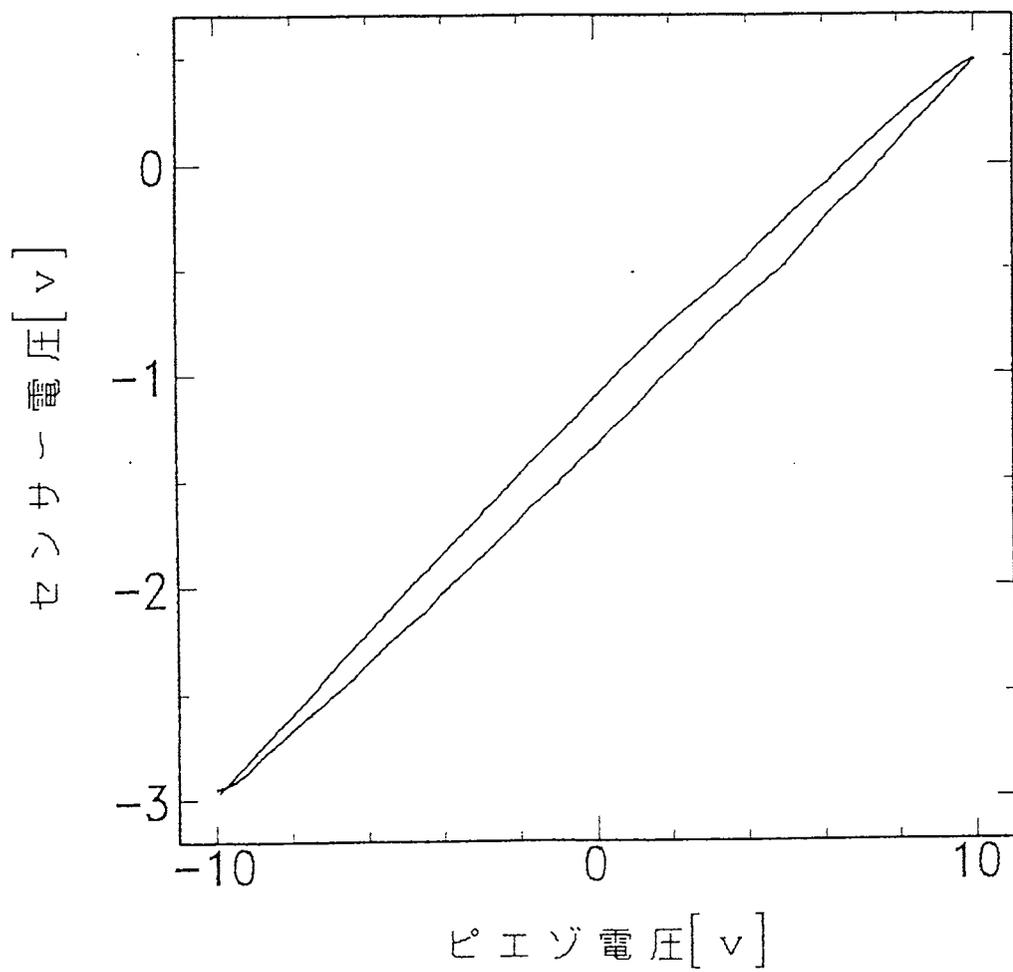
図20：ピエゾのヒステリシスを補正したときの回折格子像



この結果を利用して補正をしながらピエゾをドライブすると回折格子の溝の間隔が規則正しく観察できた (図20)。

円筒ピエゾのヒステリシスは、 ± 10 Vの間の三角波 A/D 信号を5倍に増幅してピエゾにかけたときの伸縮をカンチレバーのたわみ量を測定して直接求めた (図21)。蛋白質などの観察では凹凸は小さいので、ピエゾのヒステリシスはほとんど無視しても構わない。また、ピエゾの変位を直接測定しながらでなければ補正をかけることは不可能である。このヒステリシスデータを直線と考え単位電圧当たりの伸びを求めると、 23.8 nm/V となる。

図21：円筒ピエゾのヒステリシスループ



9 ソフトウェア

高速信号処理装置 Lory Plus を動かすには2種のプログラムが必要である。1つはホストコンピュータ上で走るホストプログラムで、M...という名前を与えた。もう一つは、DSP ボード上で走るターゲットプログラムで、T...という名前を与えた。両者はいずれもホストコンピュータのMS-DOS上で開発する。ターゲットプログラムはDSP4100上で走り、他のDSPボードをコントロールしてAFMを制御する。ホストプログラムは、ターゲットプログラムやAFM制御のための各種パラメータをDSP4100にダウンロードし、得られたデータをアップロードし、表示や処理を行う。ホストプログラムとDSP4100ボードとのコミュニケーションはmtt社製の「DSP インターフェイスライブラリー」で行う。開発環境は以下の通り。

- NEC MS-DOS Ver.5.0A
- Microsoft C/C++ Ver7.0 : ホストプログラム開発用Cコンパイラー
- AT&T WE DSP32 & DSP32C Ver1.6.1 : ターゲットプログラム開発用Cコンパイラー
- ソフトバンク 柴田望洋 C 98スーパーライブラリー : メニュー環境開発用ライブラリー

9.1 AFM プログラムのディレクトリ構成

次のページに示す。ソフトウェアは膨大な量であるので細かく解説しない。全ソースファイルリストは付録にある。

9.2 ソフトウェアの概説

主要以下に主要なものについて簡単に解説する。

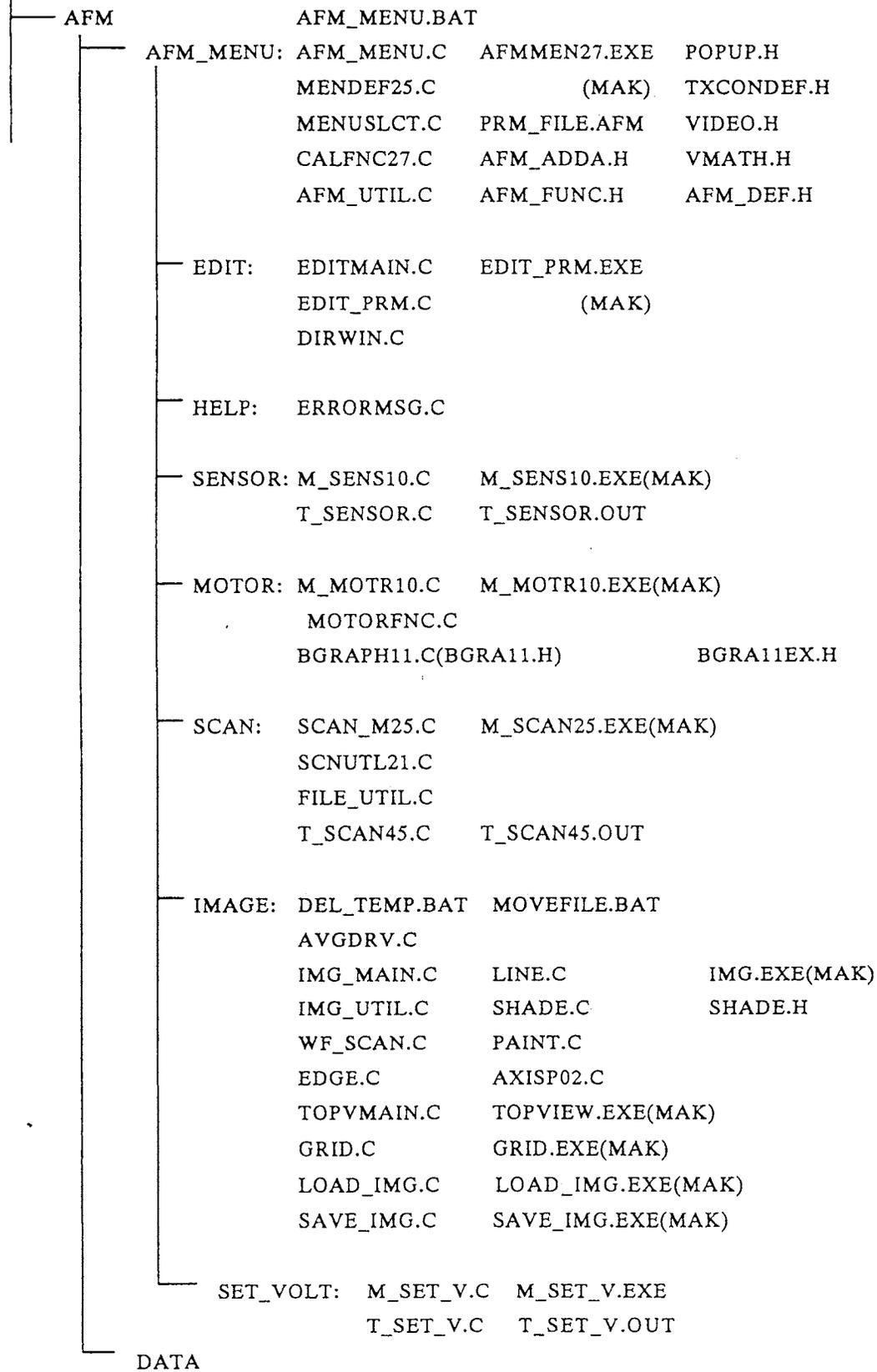
9.2.1 PRM_FILE.AFM

このファイルにはAFMを動かすためのパラメータのデフォルト値が書いてある。このファイルはAFM_MENU.EXEと同じディレクトリになければならない。このファイルはエディターでも編集できるが、厳格なフォーマットがあるのでEDIT_PRM.EXEで行う。パラメータは以下のパートに分かれている。それぞれのパートは行の隙間がなく、アステリスク*で区切られている。それぞれのパートの中では、まずパラメータの意味を示す文字が並び、その次にパラメータ値が同数並んでいる。前者は34文字、後者は22文字以下でなければならない。

- パート1. センサー
2. ステッパーモーター
 3. スキャン
 4. 画像処理

AFMプログラムのディレクトリ構成

A:¥



B:¥

BAT: AFM.BAT

9.2.2 EDIT_PRM.EXE

上記のパラメータ値を変更するプログラムである。メニューバーとポップアップウィンドウを使ったユーザーインターフェイスから起動する。このインターフェイスは望洋ライブラリーを一部変更したものを利用したが、Microsoft C/C++のライブラリーに結合して使用する。また、このウィンドウのグラフィック環境はPC9821の拡張グラフィクスドライバーを使っている。この実行ファイルは以下のモジュールからなる。

AVGDRV.C、EDIT_PRM.C、EDITMAIN.C、ERRRMSG.C、MENSULECT.C、MENU.DEF.C

9.2.3 AFM_ADDA.H

AFM制御の根幹であるAD/DA変換をする関数群をまとめたものである。ハードウェアを制御するためインラインアセンブラの形式で書いてある。このヘッダーファイルをターゲットプログラムにインクルードすることにより、AD/DA変換の関数を使えるようになる。

9.2.4 AFM_FUNC.H

汎用的に使える関数を集めてある。

9.2.5 T_SENSOR.OUT, M_SENSOR.EXE

T_SENSOR.OUTがターゲットプログラム、M_SENSOR.EXEがホストプログラムである。このプログラムは、Lory Plusの入力1、2チャンネルのAD変換値をコンピュータのディスプレイに表示する簡単なものだが、Lory Plusを使うためのエッセンスが含まれている。2つのプログラムで、同一のものを意味する変数を参照する場合、共通変数を使う。ターゲットとホストで、それぞれt_、m_という名前ではじめていて、それぞれ1対1に対応する。ホストプログラムではターゲットプログラムの共通変数をDSPインターフェイスライブラリーを使って自由に読み出し、書き込みすることにより、共通変数に共通の意味付けをしている。共通変数で特に重要なのがflag共通変数である。ターゲットプログラムで、AD変換中には、

$$t_flag = DSP_WORKING(= 0 : AFM_DEF.H参照)$$

となっているが、AD変換が終了すると、

$$t_flag = DSP_COMPLETE(= 1 : AFM_DEF.H参照)$$

が代入される。ホストプログラムでは、ターゲットプログラムのt_flag共通変数をホストプログラムのm_flag共通変数に読み込むことで、ターゲットプログラムの動きを監視する。

m_flag = DSP_COMPLETE

となれば、共通変数の *t_spot*、*t_intensity* を *m_spot*、*m_intensity* に読み込むことで AD 変換値を得る。値の取り込みが終わると、ホストプログラムで、

m_flag = DSP_WORKING

を代入し、ターゲットプログラムの *t_flag* に書き込むことで、AD 変換を再開させる。

M_SENSOR.EXE は以下のモジュールからなるため、それらをメイクファイルに登録してコンパイルする。

AVGDRV.C、EDIT_PRM.C、ERRRMSG.C、M_SENSOR.C

T_SENSOR.OUT (OUT は DSP の実行ファイル) のソースファイルは T_SENSOR.C

9.2.6 M_MOTOR.EXE

ステッパモーターを動かし、そのときの Lory Plus の入力 1 チャンネルの AD 変換値をモニターする。モーターの制御はホストプログラムで行い、AD 変換はターゲットプログラムの T_SENSOR.OUT を使う。モーターの制御は高速 2 軸位置決めボードに付属のライブラリー関数を使う。M_MOTOR.EXE は以下のモジュールからなる。

AVGDRV.C、EDIT_PRM.C、ERRRMSG.C、MOTORFNC.C、M_MOTOR.C

9.2.7 AFM_MENU.EXE

このプログラムは AFM のメニュー環境を与えるプログラムであり、先に述べてきた実行ファイルの子プロセスとして立ち上げる。以下のモジュールからなる。

AVGDRV.C、AFM_MENU.C、CAL_FUNC.C、MENU_DEF.C、MENUSLCT.C

9.2.8 AFM_MENU.BAT

上記の AFM メニュー環境を立ち上げるバッチファイルである。高速信号処理装置は、電源オン時の DA 出力電圧が不定であるため、1 から 3 チャンネルに 0 V を出力するプログラム M_SET_V.EXE と T_SET_V.OUT を最初と最後に走らせる。

10 測定・観察

既に印刷されているデータはここでは省略する。

10.1 フォースカーブ

フォースカーブとは、ステッパーモーターを動かして探針をサンプルに接触（エンゲージ）させ（図22の① ② ③ ④）、またサンプルから引き離す（⑤ ⑥ ⑦）ときのカンチレバーのたわみを縦軸に、そのときの探針の移動距離を横軸にとったものである。探針を試料表面に近づけていくと、あるところで試料表面のコンタミ層に吸着される（②）。その後なお探針を試料に近づけていくと、カンチレバーは移動量に比例して反り始める（④）。今度は探針を遠ざけていくと、カンチレバーは釣り合いの位置（⑤）を過ぎてもコンタミ層に吸着され続ける。しかし、その吸着力の限界を越えるほどカンチレバーが下に反ると探針はコンタミ層から離れる（⑦）。この図では、カバーガラス（特注プレクリーン、松浪硝子工業）に探針をエンゲージしたときのフォースカーブである。画像取得の走査を始める前に必ずこのカーブを測定し、試料あるいはカンチレバーが帯電していないか、コンタミ層の吸着が強過ぎないかをチェックする。大気中測定では、試料あるいはカンチレバーが帯電していると、図の①②が水平でなく、静電気力を受けてどちらかに曲がってしまう。静電気力が強いとききれいな像が撮れない。そのような場合には、除電器で静電気を除去する。試料表面が湿っていると、コンタミ層が厚くなり、図の③④⑤⑥の部分がリニアでなくなる。また、吸着が強いと⑥のプルオフの力が非常におおきくなり、オーバーレンジすることもある。このようなときには、試料を乾燥させたり、カンチレバーを交換すると直ることがある。液中では吸着はほとんど観察されない。従って、一般的に液中観察の方が大気中観察よりきれいな像が撮れる。カンチレバーは常に防湿庫に保存しておく。

- 直流除電器

春日電機 KD-110

- 防湿庫

東芝 DC-47

10.2 試料基板の平滑度

蛋白質をAFMで観察するには蛋白質を適当な基板に固定しなければならない。我々の装置では対物レンズを通して蛍光像なども観察するので、基板は透明でなければならない。カバーガラスが便利であるが、通常の市販のものでは図23Aに示すように、高さ100 nm程度の山脈のような起伏が必ず観察されて、使用できない。松浪硝子に特注で脱脂洗滌したプレクリーンカバーガラスではかなり平滑で2 nm以下の凹凸があるのみである（図23B）。特注でないプレクリーンカバーガラスは通常のものよりまじだが、使える程には平滑でない。へき開したばかりのマイカ表面は原子レベルで平滑であり、電子顕微鏡観察でも使われている。また、十分に透明である。し

図22：フォースディスタンスカーブ

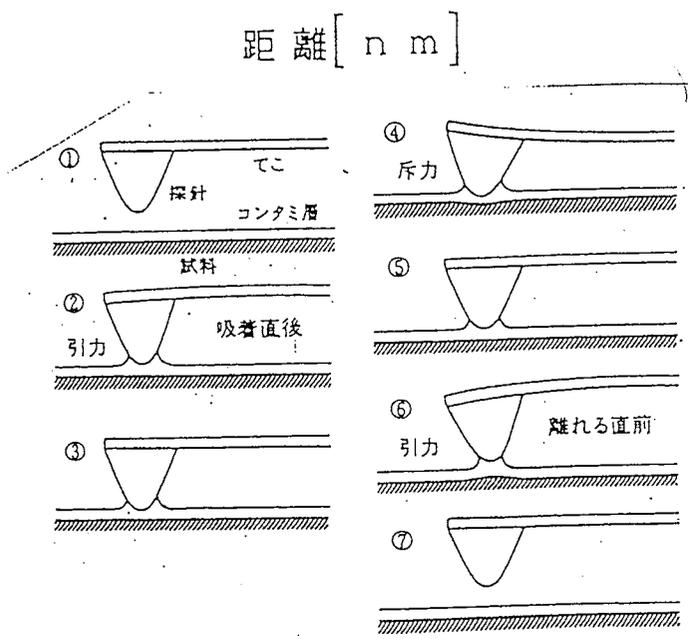
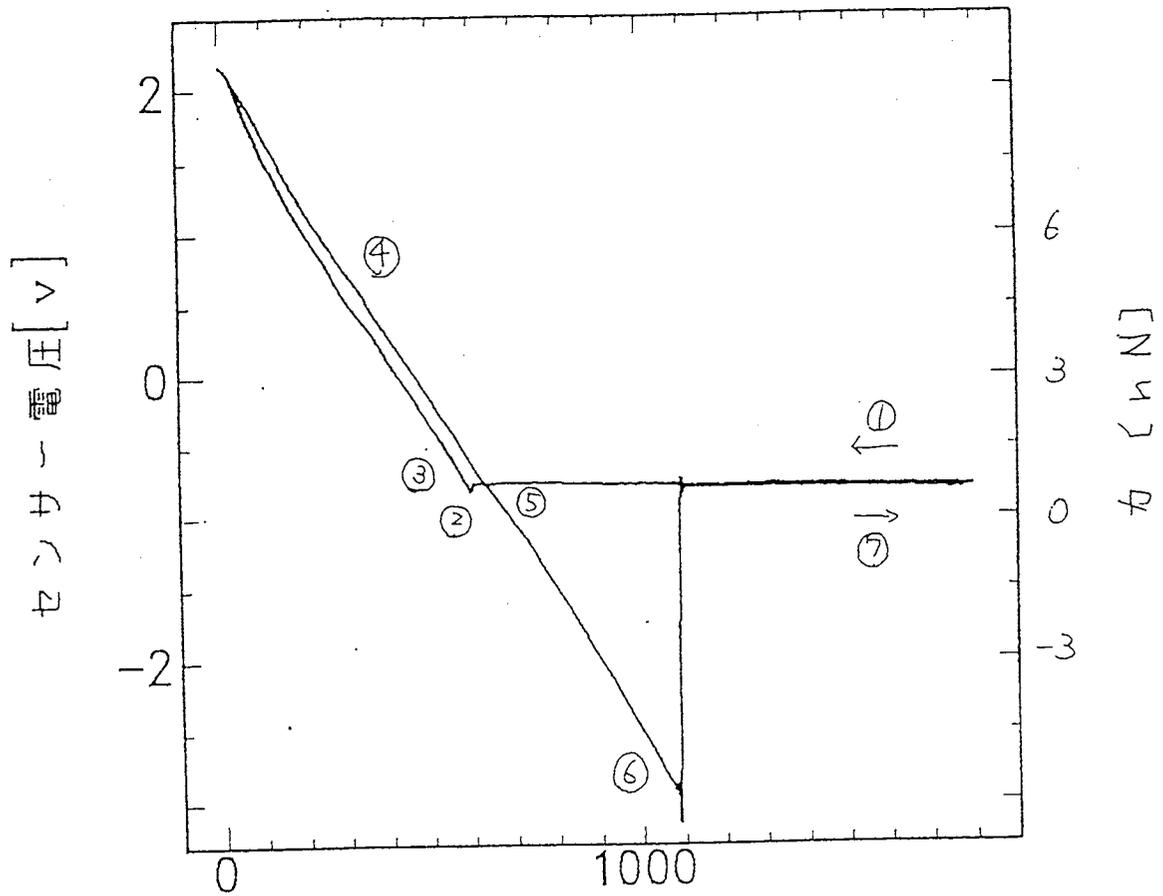
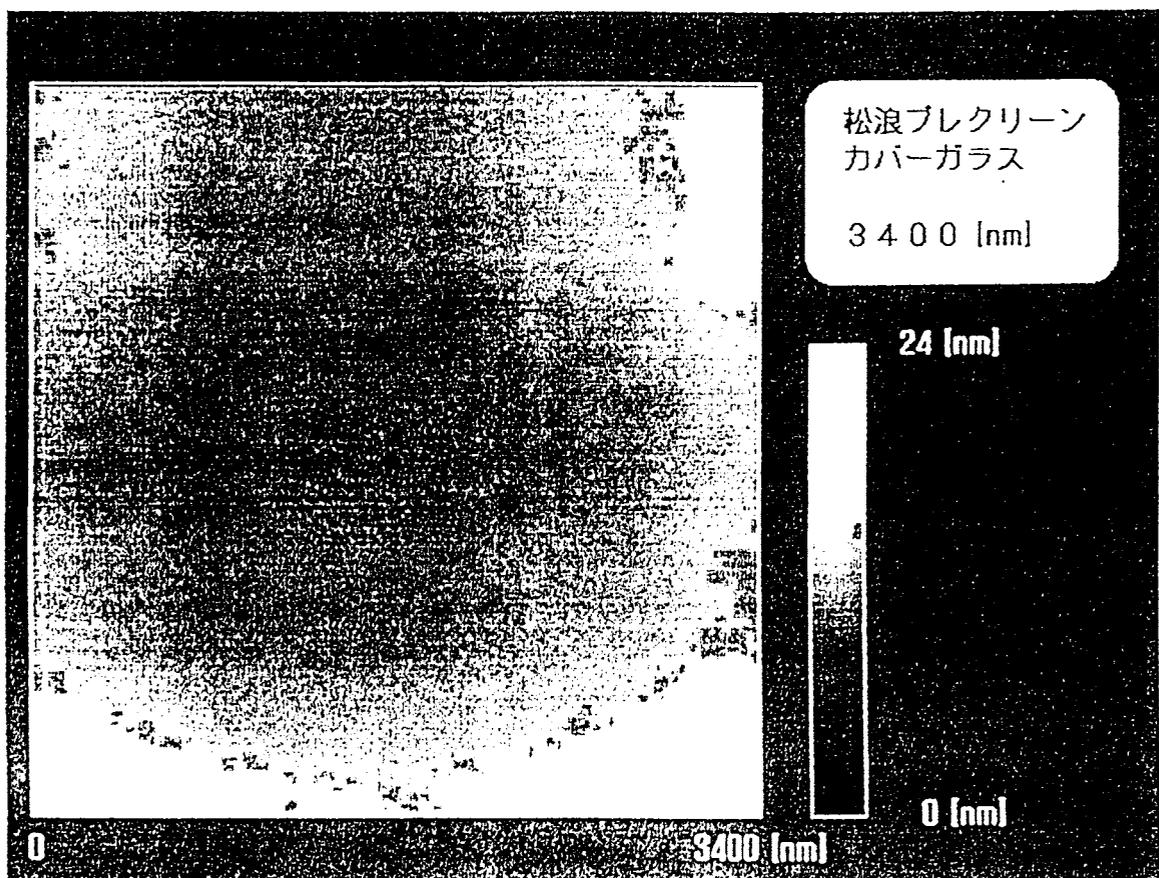
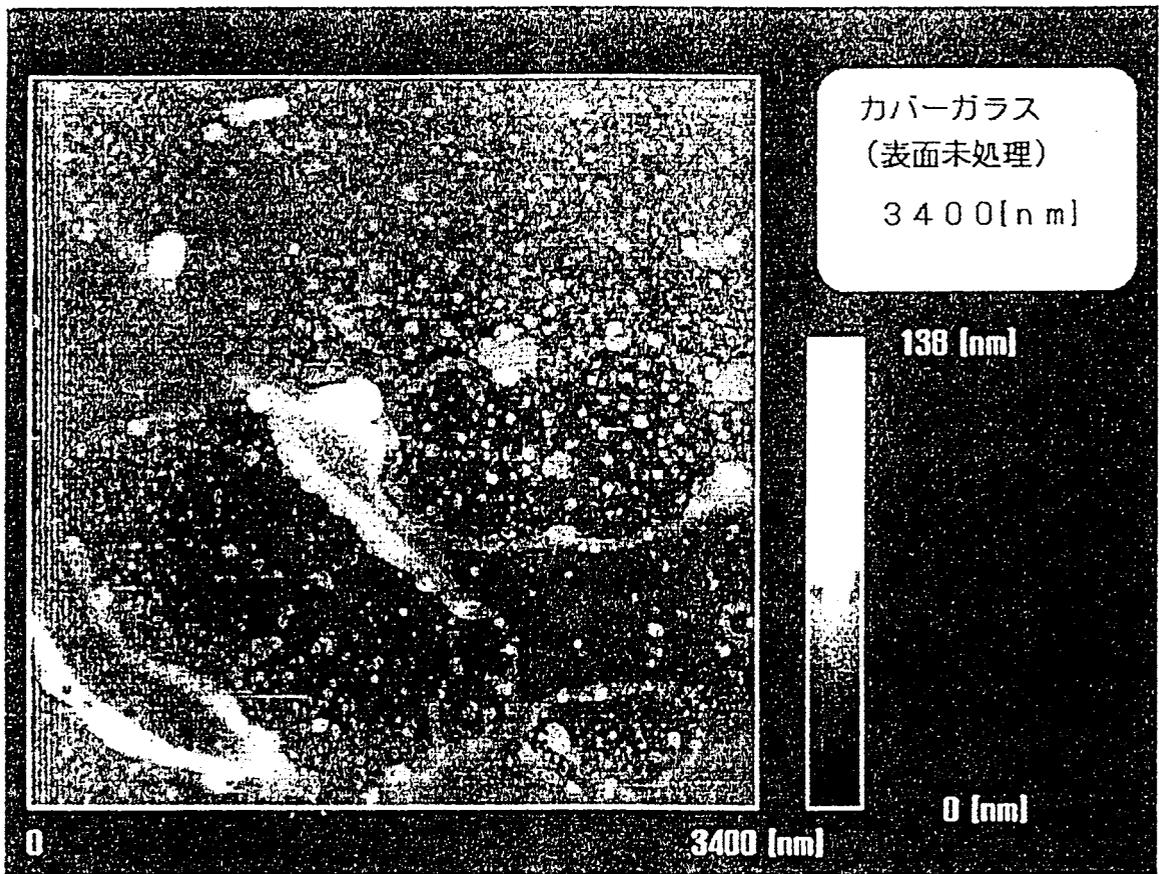


図23：カバーガラスの平滑度



かし、へき開したマイカはガラスのように平面でないので、実際に使うときにはカバーガラスに接着して用いる。マイカもカバーガラスも負に帯電しているので、正の電荷を多く持つ蛋白質（ミオシンなど）では何もしなくても自然に吸着するが、アクチンなどのように負の電荷を持つ蛋白質では吸着が弱い。このようなときには、ガラス表面をアミノシラン処理するか、ポリリジンコートする。

10.3 ピンポイントアプローチ

既に印刷された報告でも述べたように、我々の蛍光顕微鏡一体型のAFM装置では、蛍光染色された試料と探針を同時に観察できる。従って、探針を試料に光学分解能の精度でピンポイントアプローチできる。我々の経験では0.2 μm の範囲内にアプローチできる。アプローチした点の近傍1 μm の範囲を走査すれば、蛍光顕微鏡で確認して観察しようと思った蛋白質のAFM像が必ず得られる。この事実から本研究で最初に目指した目的が達成された。ピンポイントアプローチの利点はこればかりではない。観察したAFM像が本当に観察しようとしているものであるかどうかは、AFM像が別の知見で得られている像と良く一致している場合で無い限り、困難なことが多い。試料に含まれるごみや基板の傷などを観ていることもよくある。蛍光観察による試料の位置あるいは形状とAFM像を照らし合わせることができるので、得られるAFM像が観察すべき試料のものであるかどうかは容易に確認できる。更に、後述するように探針先端に蛋白質1分子を捕捉するとき、捕捉すべき蛋白質のすぐそばに探針を近づけることができるので、捕捉は容易である。捕捉する場合にはどうしても走査速度を下げなければならないので、もしめくらで走査しなければならない場合には捕捉に膨大な時間がかかって到底できるものではない。

10.4 筋蛋白質の液中観察

10.4.1 アクチンフィラメントの束

アクチンフィラメントは既に述べたようにカバーガラスやマイカ表面に容易に吸着しない。そこでこれらの表面をポリリジンコートしたが、その濃度が高過ぎたためかアクチンフィラメントの束が形成された。アクチンフィラメントはローダミンファロイジンで蛍光染色されている。その蛍光像を図24-Aに、その四角で囲った領域のAFM像を図24-Bに示す。右したにある束は完全には吸着していなかったため、その吸着していない部分はAFM像では全く見えていない。図24-Cは更に拡大したAFM像である。束に周期的な構造が観察される。この周期は約40 nmで、アクチンフィラメントの二重らせんのハーフピッチ（約38 nm）に一致する。

10.4.2 HMM

図25にHMM分子をマイカ表面に吸着させたときのAFM像を示す。2つのペアになった粒が多く観察され、間違いなくHMM分子の双頭構造からくるものである。更に拡大したAFM像を

図24：アクチンフィラメントの束の蛍光像とAFM像

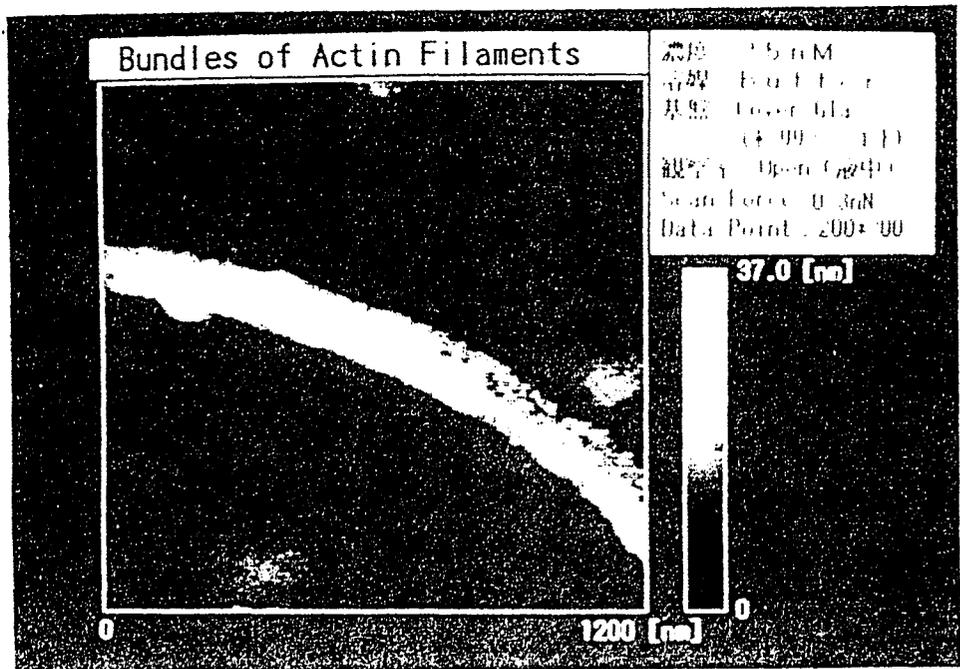
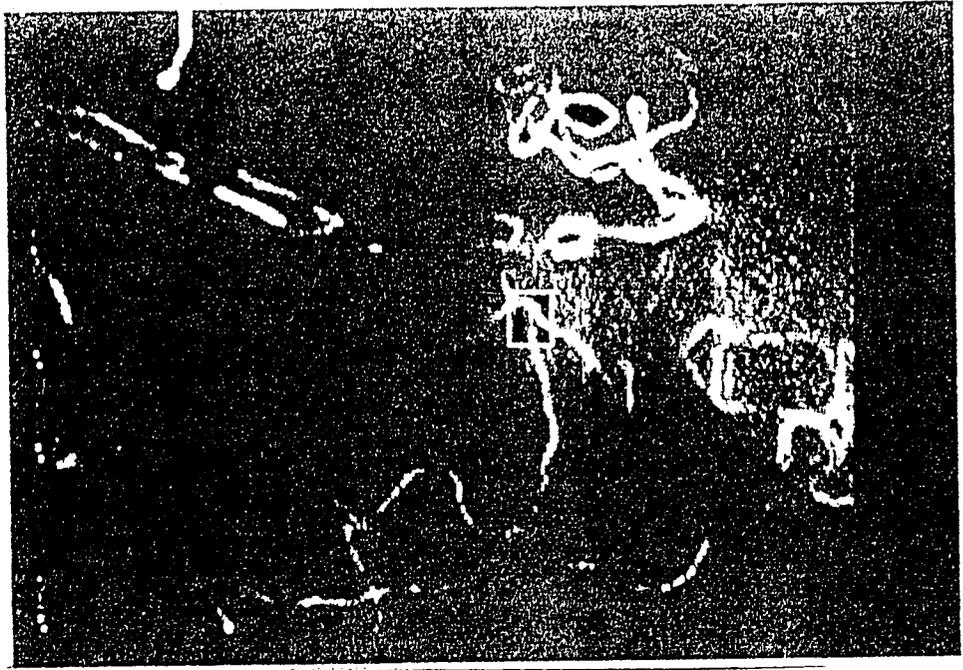


図25：HMM分子のAFM像（低倍）

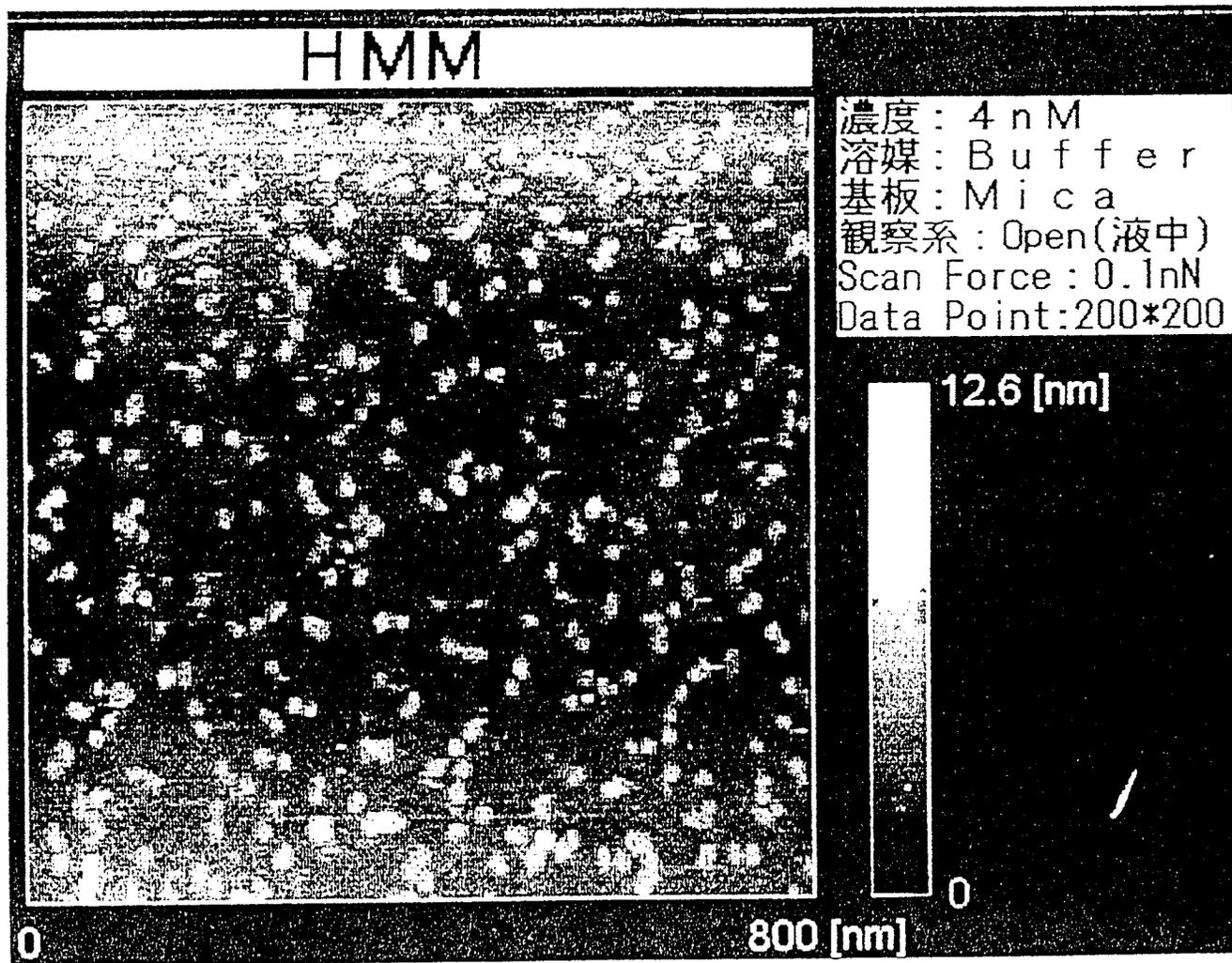


図26：HMM分子のAFM像（高倍）

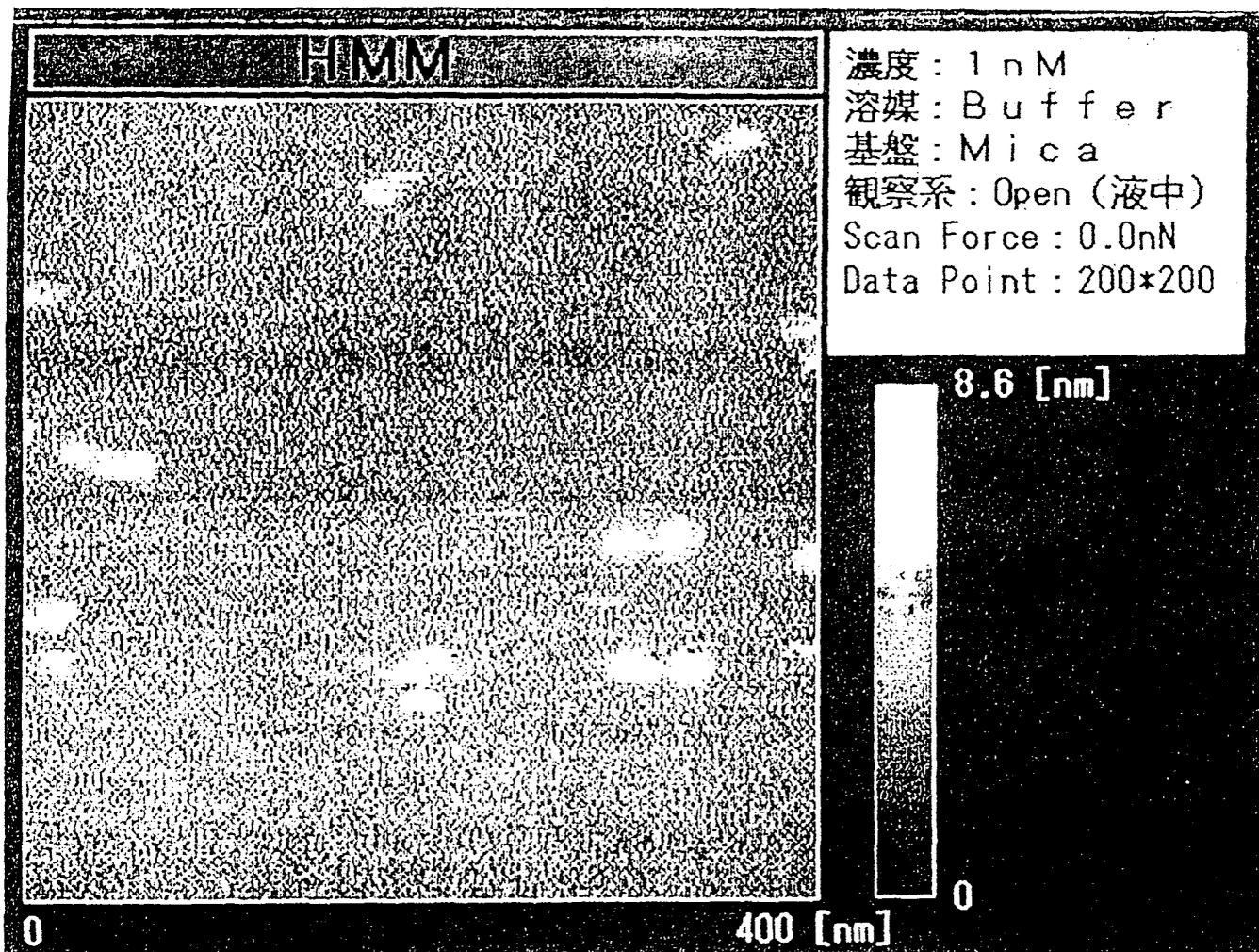


図26に示す。双頭構造がより明らかである。頭一つの大きさは約15 nmに見えている。しかしながら、S2の部分は全く見えていない。これには2つの原因が考えられる。我々のポジションセンサーアンプは現在改良中であるが、この観察で使用したものはノイズが2 nmに相当する程度ある。S2の太さは約2 nmであるので、ノイズに隠れて見えていないのかもしれない。もしくは、HMMのマイカへの吸着はHMM頭部で起こっており、S2部分は全くマイカに吸着していないのかもしれない。

10.4.3 液中観察での問題点

上記のAFM像は比較的きれいに撮れたものを示した。しかしながら、きれいに撮れない場合もかなりある。きれいに撮れるときには、繰り返し像をとってもきれいな像が得られる。いくつかの問題点が考えられ、現在検討・改良中である。第1の問題は、機械的ドリフトである。電気的なドリフトはほとんど無視できる。ドリフトは実験の度に小さいこともあれば大きいこともある。機械的ドリフトの原因を探ることはなかなか困難であるが、原因になりそうな点を考える。まず、サンプルステージのスーパーインバー中空円盤の上にカバーガラスを接着するが、その接着の不安定性がある。溶液の蒸発も問題かもしれない。シリコーンゲルのO-リングは自作しているため安定に同じものが作れない。密閉が不十分で液が少しずつ蒸発しているかもしれない。液中で泡ができそれがカンチレバーに付くと大きな力が働くことがある。小さな泡は実体顕微鏡で見つけることは難しい。ドリフトについてはこれらの原因になりそうな点を注意して実験をすることが重要であるが、走査を一桁高速化できれば問題は解消されると思われる。ドリフト以外の問題として探針先端へのごみや蛋白質の吸着がある。溶液中では蛋白質がすべて基板に吸着しているわけではない。基板に蛋白質を吸着させたあと、浮遊している蛋白質を洗い流しているが、吸着が不十分だと一端吸着した蛋白質が探針に吸着してしまうことがある。液中観察ではカンチレバーを度々新しいものに替えなければならない。

10.5 1分子捕捉

「開発の動機と経緯」で述べたように、大岩氏が紹介した探針先端への蛋白質1分子の捕捉のアイデアを我々は実現した。この実現にはいくつかの要素技術の開発が必要であった。捕捉の方法の基本はビオチンとアビジンとの強い親和性の利用にある。探針先端をビオチン化し、捕捉すべき蛋白質にアビジンを結合させる。蛋白質としてHMMを用いた。HMMはアクチンと相互作用して力を発生するので、HMM 1分子を探針へ捕捉して1分子の出す力を計測するのが目的である。そこでHMMの運動活性を損なわない化学修飾法を開発した。HMM分子のS2部に選択特異的にビオチンを導入することができた。次に、このビオチン化HMMの局在を蛍光顕微鏡で確認するために、アビジンコートされた蛍光性ビーズをS2のビオチンに結合させることを試みた。市販のいくつかの蛍光性ポリスチレンビーズを試したが、どれもHMMに非特異的に結合してしまった。そこで逆相エマルジョンを利用してポリアクリルアミドビーズを合成、アミノ基を

導入、そのアミノ基に蛍光性分子とビオチンを結合、その蛍光性ビーズをストレプトアビジンでコート、という手順で蛋白質に吸着しない蛍光性ビーズを調整した。探針先端のビオチン化は、まず先端をアミノシランコートし、そこにアミノ基反応性ビオチンを結合させるという方法で行った。先端部のみに少数個のビオチンを導入するためには、バッチ処理はできない。AFM装置にカンチレバーを付け、カンチレバーのたわみをモニターして探針先端を極く薄いアミノシランの層に接触させ、接触後すぐにカンチレバーを引き上げた。水洗・乾燥後、同様にして探針先端をアミノ基反応性ビオチンに接触させ、しばらく放置後カンチレバーを引き上げ、水洗・乾燥を行った。アビジンコート蛍光性アクリルアミドを液中でプレクリーンカバーガラスに吸着させた。図27にその蛍光像を示す。4個のビーズと中央にカンチレバーのレバーと探針先端が認められる。蛍光励起照明でも本来無蛍光のカンチレバーを観察することができる。この理由ははっきりしない。右下にある2つのビーズの内の左のビーズに探針をアプローチした(図28)。このアプローチ点の周り1 μm 四方を非常にゆっくりと走査した。この走査でのカンチレバーのたわみを画像化すると、画像のほぼ中央付近にひっかいたようなパターンが観察された(図29)。この走査の後、カンチレバーを引き上げると2個あったビーズの左のビーズが無くなっていた(図30)。対物レンズの焦点を引き上げたカンチレバー探針先端に合わせると、その先端が明るく輝いていた(図31)。すなわち、探針先端にビーズが一つ捕捉されたわけである。こうして1分子捕捉が上述の方法で実現できることが示された。この方法を使ったHMM 1分子の力計測は現在進行中である。

図27：蛍光性ビーズの蛍光像とカンチレバーの像

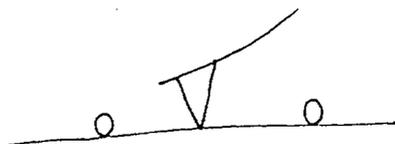
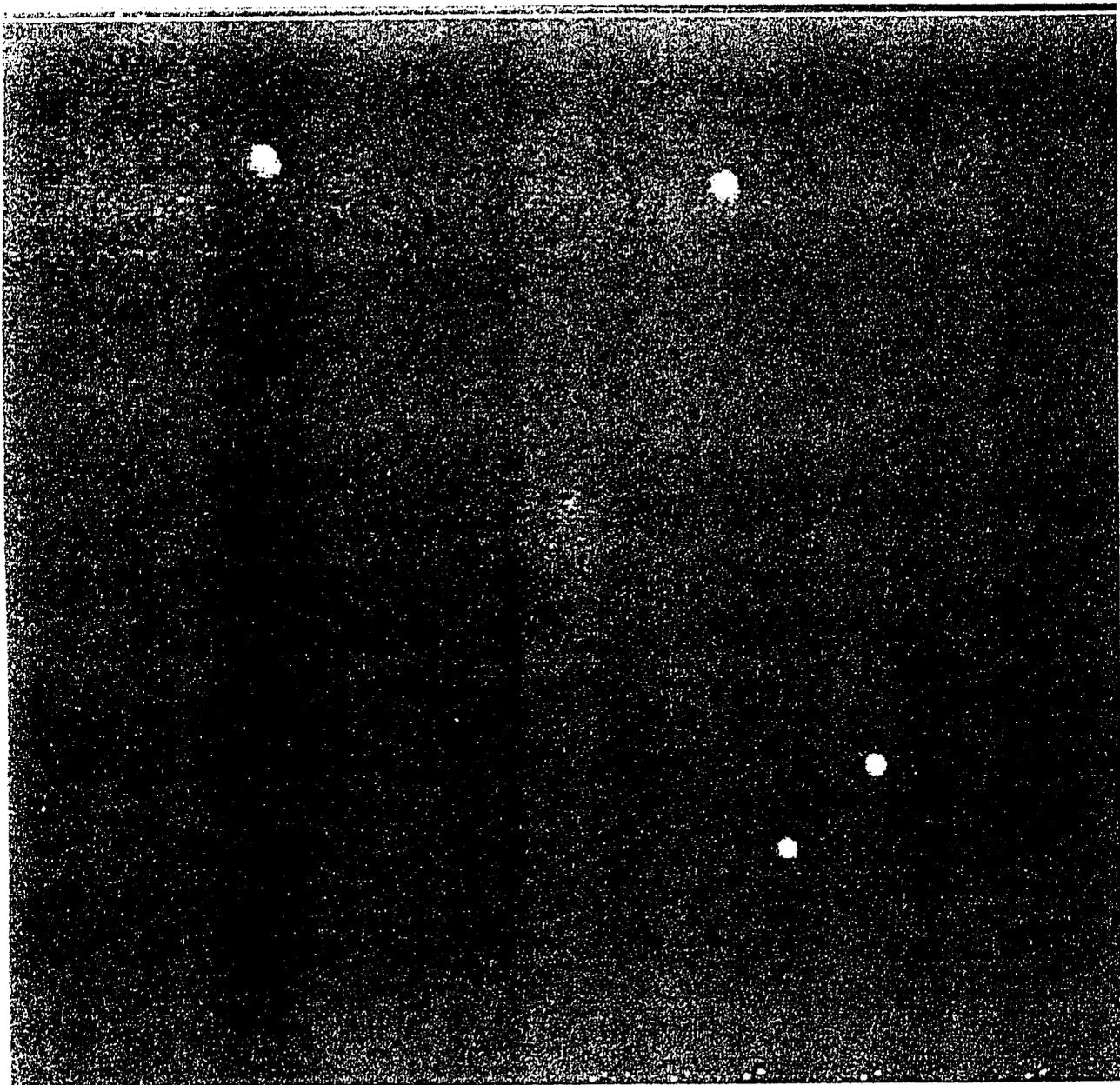


図28：探針を1つの蛍光性ビーズにアプローチしたときの像

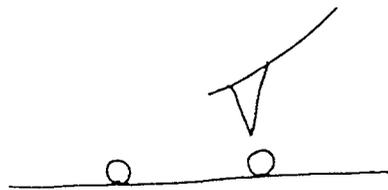
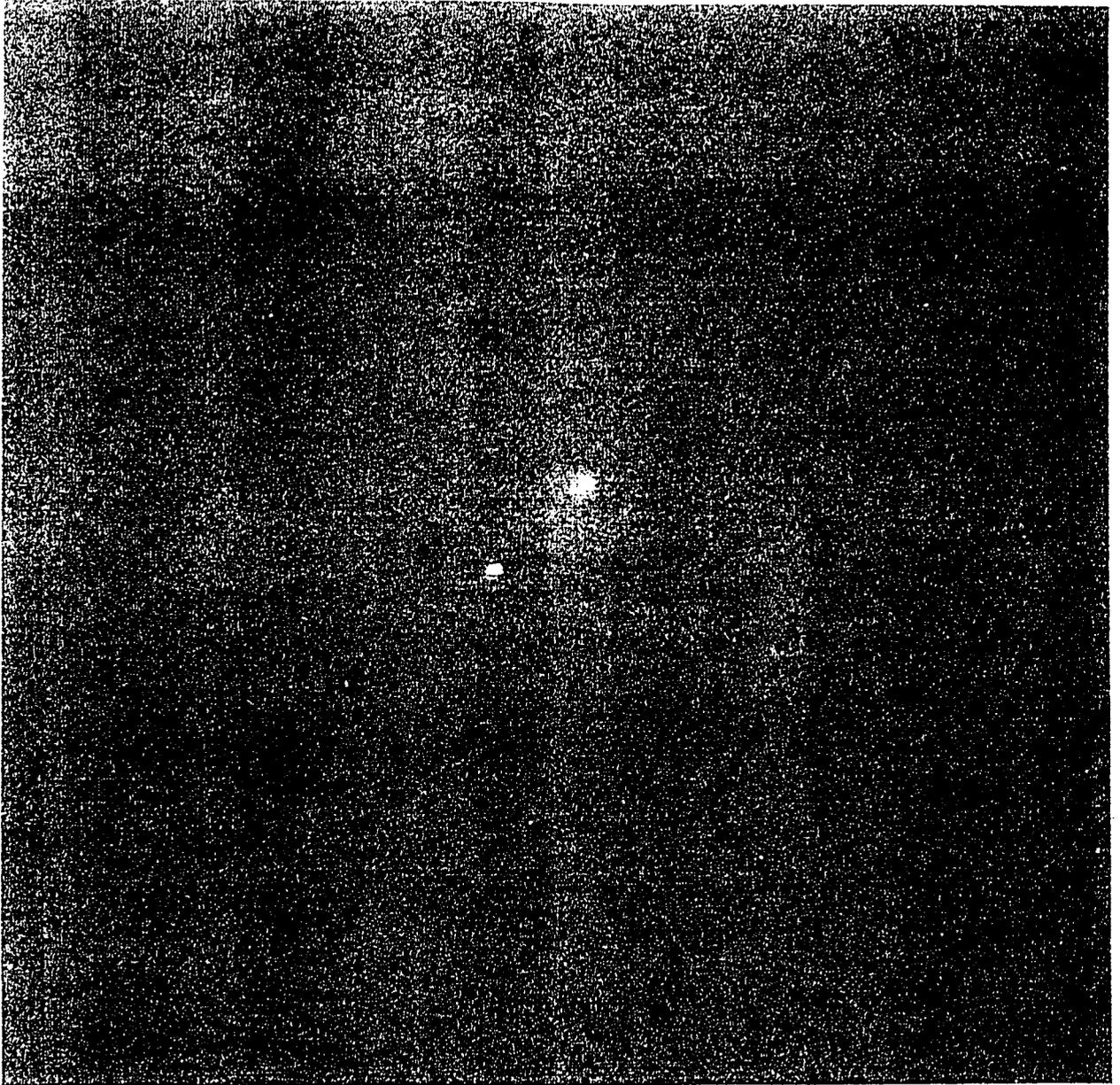


図29：ビーズの周りをゆっくり走査したときの像

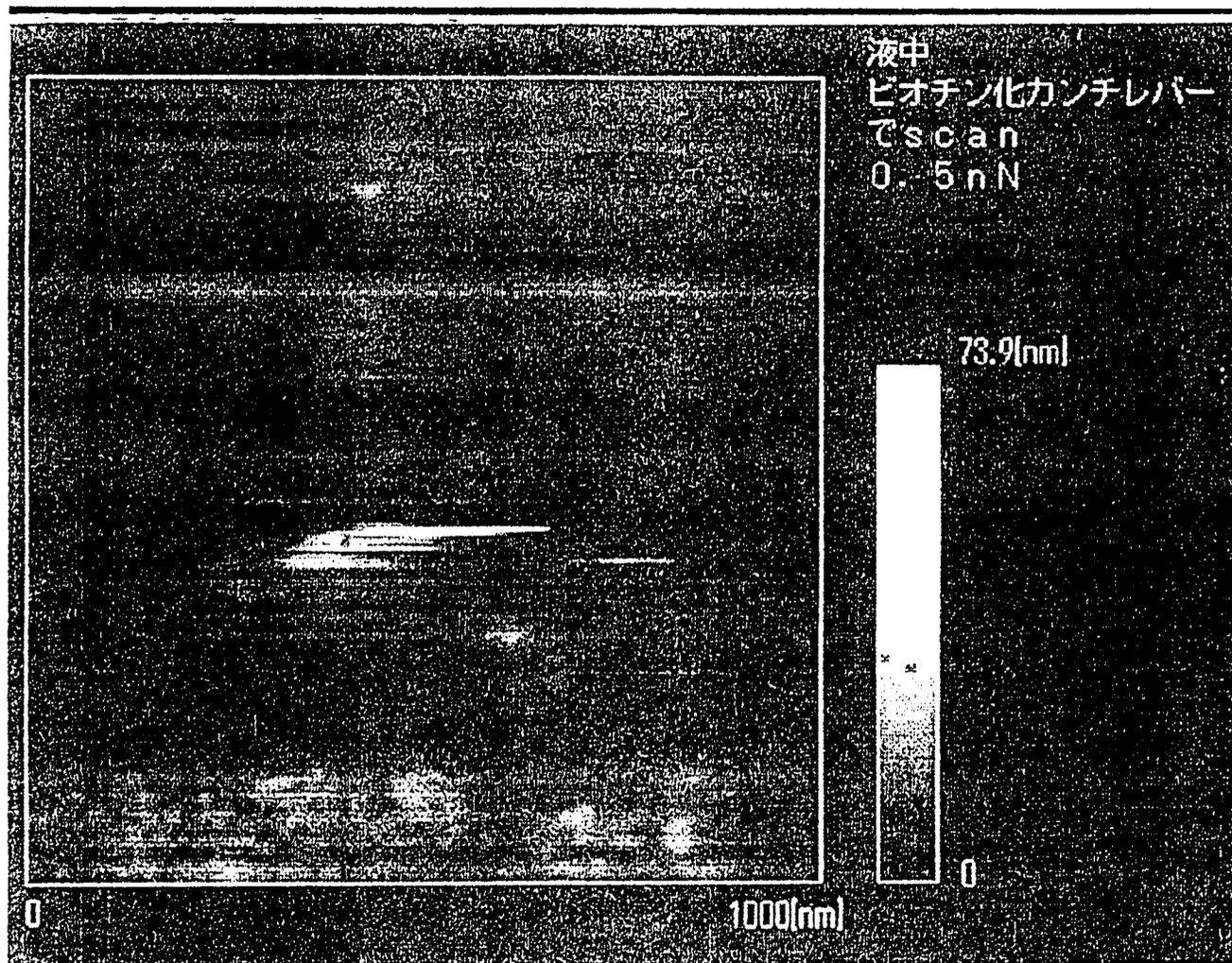


図30:カンチレバーを引き上げたあとのガラス表面にあるビーズの蛍光像

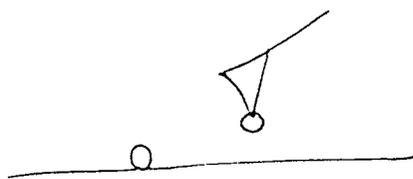
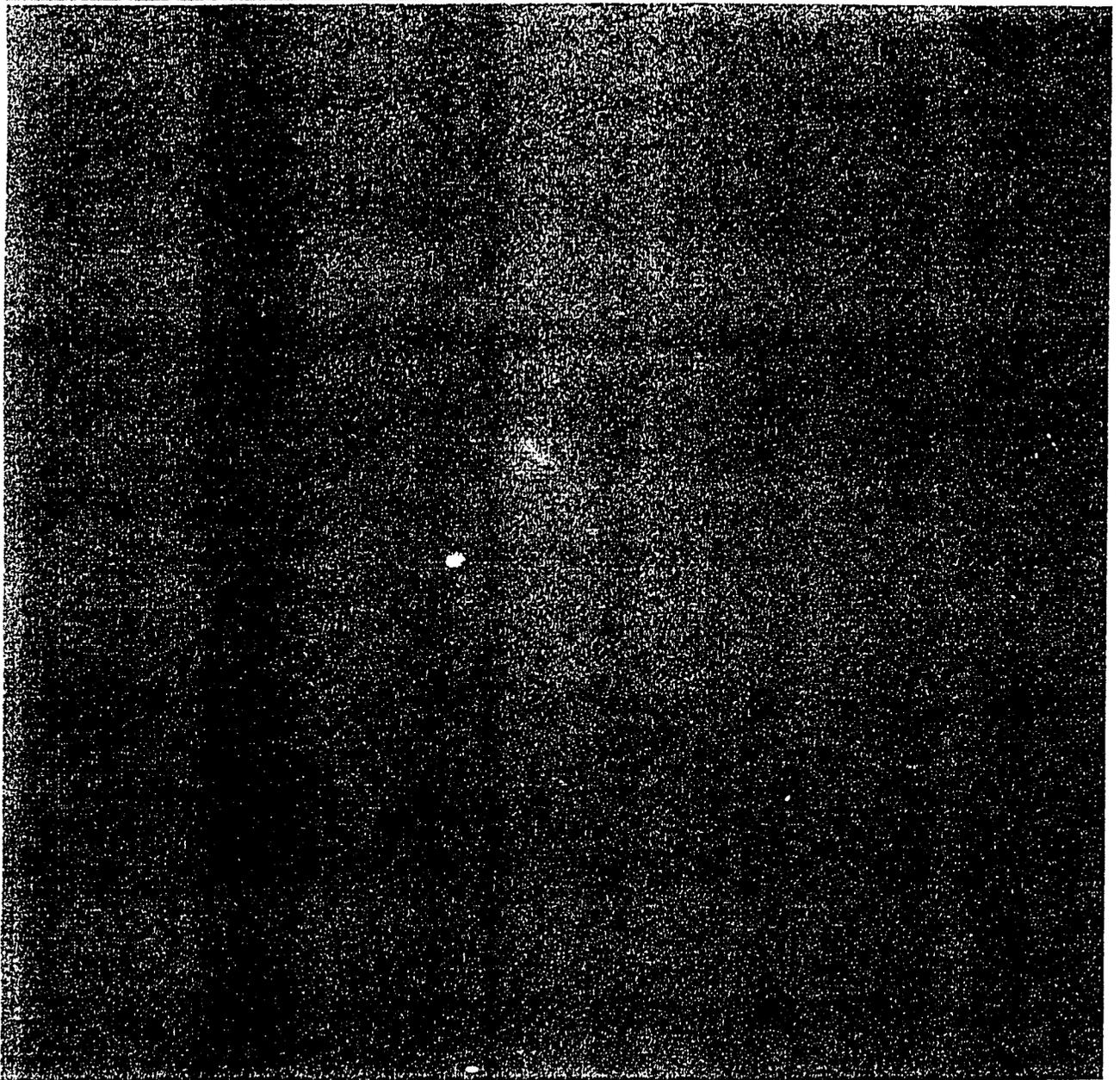


図31：カンチレバーを引き上げたあとの探針先端の蛍光像

