ナノ計測の次世代AFM撮像モードが得られるQI

ヘイコ・ハシュケ、トルステン・ヤンケ

新しい原子間力顕微鏡（AFM）の定量撮像（QI）モードは、走査時にセットポイントや利得を調整しなくても、その計測技術が難しい試料の画像化を容易にしている。

原子間力顕微鏡（AFM）を今日のユーザの要求に合せようとすると、そこには数多くの難題がある。25年前に開発された当初のAFMの接触撮像モードは、液体中の試料の画像を試料の損傷なしに画像化する能力を得られなかった。さまざまな非接触モードと呼ばれる方法が導入されたが、それらはいまだに、柔らかくて壊れやすく注意深い準備が必要となる試料を、定量的に画像化したい生命科学分野の研究者たちの要求を満足できない。このユーザの要求に対応して、独JPKインスツルメンツ社（JPK Instruments）はAFMの新しい定量撮像（QI）モードを開発した。

QIは開発の当初から設計目標が明確に設定された。つまり、光学顕微鏡を扱うことに慣れていた生命科学者がAFMとその新しい撮像モードを受け入れるには、空気中や液体中のさまざまな環境でも使用でき、迅速かつ直感的に操作できるシステムの設計が必要であった。そのモードは柔軟性と粘性の両方または片方があり、基板にゆるく接触し、鋭い形状／エッジをもつ場合もある「難しい」試料の取り扱いも必要であった。このことは新しいナノ計測モードのプローブがすべての画素と相互作用するときに、その力の極端な精密制御が必要になることを意味している。

新しい撮像モードは定量的データも取得しなければならない。QIモードは機械的、化学的および電気的データを取得する。また、撮像時の実際のフォースカーブ、つまり曲線を描く作用からは最大量のデータポイントが得られる。細胞が付着した領域、つまり単一細胞とその他のもの（表面など）との間の力測定は、生命科学がAFMを使用するときの急速に増大する計測ニーズになっている。

QIの定義

標準のカンチレバーへの置き換えの可能な新しいQIは、すべての画素に作用するチップ - 試料間の力を完全に制御できるフォースカーブにもとづく撮像モードであり、このことは走査時のセットポイントや利得の調整が不要になることを意味している。そのTipSaverと名付けられたチップ動作アルゴリズムは、横方向の力を阻止し、垂直方向の力を制御して、カンチレバーチップと試料との間の非破壊測定を可能にする。

QIはForceWatch技術を組み合わせて、柔軟な試料（ヒドロゲルや生体分

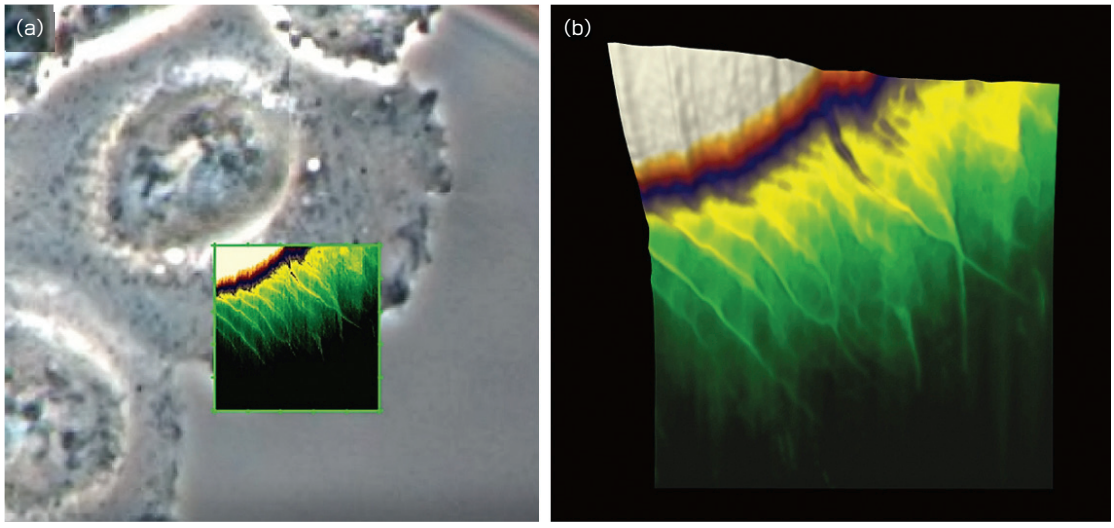


図1 閉ループ定量撮像（QI）AFMと37℃の緩衝液中のペトリ皿ヒータを用いて、生きたチャイニーズハムスターの卵巣（CHO）の細胞が画像化された。（a）は光学位相コントラスト画像と重ねたAFM高さ画像を示し、（b）は25μm^{2}の領域を走査した3Dトポグラフィー画像を示している。高さ情報のz範囲は3.6μm。

子)、粘性のある試料(液体中のナノチューブやウィルス粒子)、鋭いエッジをもつ試料(粉体やMEMS構造)を計測するときの難題を回避可能にしている。要するに、ForceWatchの1組のアルゴリズムはフィードバック信号を厳密に監視し、変化した信号を迅速に調整する。

QIモードは生物学あるいは試料が難しい物理的パラメータをもつ高分子科学や表面科学などの高分解能と力感度の両方を要求する分野の計測に適している。

画像化の前に設定が必要になるのは取得した画素ごとのフォースカーブの結像力とz長のパラメータの2つしかない。いずれのパラメータも容易に取得可能であり、詳細な技術知識を必要としない。また、両者はわれわれのForce-Watchと容量センサの技術を用いることで精密に測定できる。画像化前の掃引、振幅設定、位相補正による駆動周波数と電圧の複雑な決定なども不要になる。

QIはフィードバックループがない。したがって、撮像時に設定と最適化を必要とするパラメータがまったくない。位相同期ループ(PLL)や振幅利得制御(AGC)などの付加的フィードバックループを必要としない。フィードバックループがないことで、それぞれの画素は完全に独立したものとなり、不適切な1つの撮像点だけから生じる筋状の欠点は排除される。

QIは試料面(z軸)に垂直な圧電運動が注意深く最適化され、他のすべてのAFM撮像モードと同等の撮像速度が得られる。このz方向の最適化は押込みや接着力の定量的分析のための信頼性のあるフォースカーブと伸縮速度を確保するために必要となる。

生命科学ユーザの最重要ニーズを満足するために、QIはJPK社のAFMと光学顕微鏡法からなるDirectOverlay技術を使用して、高開口数共焦点レーザ走査顕微鏡法(CLSM)を含めたすべての一般的な光学撮像技術との組み合わせを可能にしている。この方法は特殊な光学較正法と重要な計算機プログラムを使用し、試料からのAFMと光学顕微鏡の情報を同時に表示する。試料上の重要な場所は光学位相コントラスト、微分干渉コントラスト(DIC)、可変リリーフコントラスト(VAREL)などのさまざまなコントラスト法を使用して決定する。

さらに、エピ蛍光、共焦点、内部全反射蛍光(TIRF)などの蛍光技術を使用して、特定の分子や生物種の挙動や位置の計測を可能にしている。AMFによる画像化と力測定を光学顕微鏡による撮像と一緒に試料の同一点上で組み合わせることは容易でない。光学画像の取得とAFM画像の記録は個別に行われる。したがって、両者の画像の重ね合せにはAFMのチップ走査の設計が重要であり、容量センサを用いた横方向(x, y)の閉ループ撮像の最適利用が鍵になる。

難しい試料の定量化

QIは撮像時に横方向の力が試料に加わらないので、緩やかに付着した物体や固定化されていない試料(生命科学の用途には多い)の画像化が可能になる。QIによる力の性質を利用すると、表面と強く粘着した背の高い物体の画像化が従来のAMF撮像モードよりも容易になる。このような試料の場合、プローブによる側面から側面へのラスタ走査は損傷を与えることがあり、表面を動かしてしまうこともある。対照的に、フォースカーブによる測定はプローブが上下の垂直方向に動くので、表面は引きずられることがない。

Orbits Lightwave

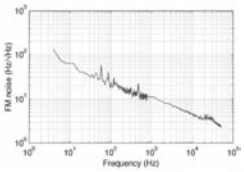
単一周波数 狭帯域 ファイバーレーザー

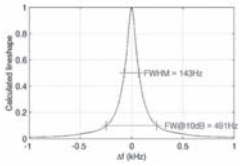
Ethernal™
SlowLight™
シリーズ

独自のVirtual Ring™ 構造を採用したSlowLight™ 技術により、業界最高水準の低ノイズ&狭い線幅をコンパクトなオールファイバ構成で実現。

脅威の狭帯域
超低AM/FMノイズ
タフで高い安定性
低消費電力

SL130モデル(200Hz)のFMノイズおよび線幅





主な仕様

【波長】
1047 ～ 1064 nm、
1530 ～ 1565 nm
【出力】
10 ～ 300 mW
【線幅】
< 400 Hz (オプション:<200 Hz)
【RIN】
< −120 dBc/Hz (@1MHz)
(オプション:<−130)
【周波数ノイズ】
55 Hz/√Hz (@100Hz)
(オプション:30)
【S/N】
> 80dB (0.05nm RBW)
【サイドモード抑制】
> 75 dB (@3MHz)
【チューニング】
1、10、20、30 GHz
(PZTタイプ)

主な用途

・ファイバーセンシング
・各種センシング
(音響、海洋、防衛など)
・ライダー
・レーザー干渉計
・コヒーレント通信
・インジェクション・シーディング
・マイクロ波・テラヘルツフォトニクス

http://www.japanlaser.jp/

E-mail: lase@japanlaser.jp

JLC JAPAN LASER 株式会社日本レーザー

本　社　〒169-0051 東京都新宿区西早稲田2-14-1
TEL: 03-5285-0863 (直)
大阪支店　TEL: 06-6323-7286
名古屋支店　TEL: 052-205-9711

QIによる多重走査はセンチメートルサイズの表面でも無人で走査できる。その結果、非常に広い領域（数百ミクロン）の走査が可能になり、次段階の操作に必要なフォースカーブの全てのデータが蓄積されるので、位置決めと拡大縮小が容易になり、ナノメートルスケールの特定された「狭い」領域の計測精度も向上する。

ユーザによる機能の選択を可能にするために、QIには剛性、接着力、エネルギー損失などを含めた多様なナノスケール材料特性を高い空間分解能で定量的に測定できる先端ソフトウエアパッケージが用意されている。これらのパッケージは試料の付加的情報の分析に必要となる多数のデータ抽出とデータ処理のチャネルが得られる。その結果、用途に応じて、単一画像からの電気伝導率や分子認識の測定が可能になる。

最新の制御装置は計測時に検出されたすべての信号を並列で記録して蓄積する。電子部品を改良したデジタル制御装置は極端に低い雑音レベルが得られる。例えば、JPK社のVortis SPM Control Stationは高速ロックイン増幅器の技術を使用して振幅と位相を精密に検出し、鮮明で高精度の定量撮像を可能にしている。

最終的に、すべての記録されたデータチャネルはQI力顕微鏡法の独自の能力にもとづいて、試料面に対して垂直方向の位置が異なる3D画像として写像される。例えば、相互作用力がゼロのトポグラフィーを写像すると、摂動のない試料面の詳細な画像が得られる。JPK社のデータ処理（DP）ソフトウエアは、すべてのデータチャネルがすべての画像ポイントにおいて完全な帯域幅をもつので、より柔軟に利用できる。このDPソフトウエアは接着力やヤング率の値を取得するためのQIデータ解析用のアルゴリズムも備えている。

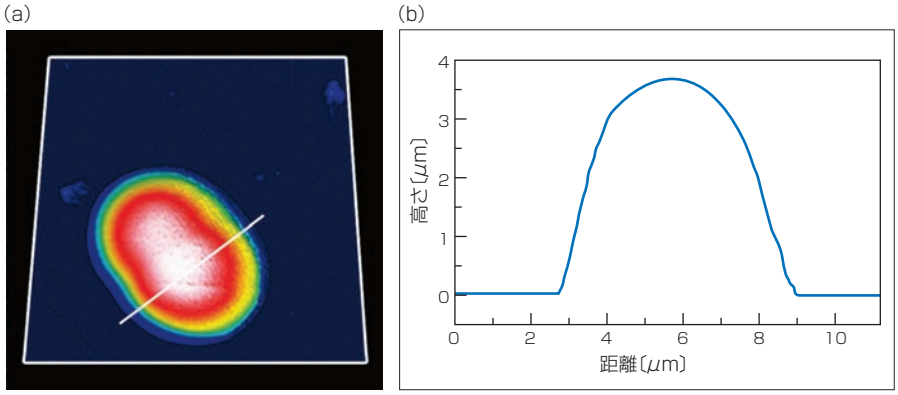


図2　生きたシアノバクテリアの緩衝液中で測定された3Dトポグラフィー画像とバクテリアの高さの線走査場所を示している（a）。閉ループ方式による走査面積は10μm²、z範囲は4.8μm。バクテリアの断面は約4μmの高さをもつことが明らかにされた（b）。

図3　調製したヘキサコンタン試料が高配向熱分解グラファイト上で撮像された。「緑色」画像は高さを示し、挿入図は弾性率の測定を示している。これらの縞模様はヘキサコンタンの各単分子層の高さを示し、分子長（7.5nm）に対応する。走査面積は5μm²、挿入図は300×300nm、z高さは12nmの範囲に、弾性率は2.2Gpaの範囲にある。

応用

JPK社のNanoWizard 3 AFMを使用して、HEPES緩衝液（有機化学緩衝剤）中のチャイニーズハムスターの卵巣（CHO）細胞のゼロイメージングフォースによる画像化が初めて行われた（**図1**）。これらの画像はすべてのデータポイントが走査アーチファクトをまったく含まないので、細胞の詳細なトポロジーを把握できる。このQI法は生きたシアノバクテリアの固定化されない状態での撮像にも適用され、その画像化が緩衝液中のゼロイメージングフォースで行われ、そこでは力が加えられていない精密なトポグラフィーが画像歪みのまったくない状態で取得された（**図2**）。

QIモードの最新版を使用して、$C_{60}H_{122}$ヘキサコンタン分子の弾性率とトポグラフィー情報が取得された（**図3**）。ヘキサコンタンがグラファイト上に吸着するときの個々の分子（約7.5nmの長さ）は並列して分子の長い縞模様を形成する。これらの縞模様は個々の分子

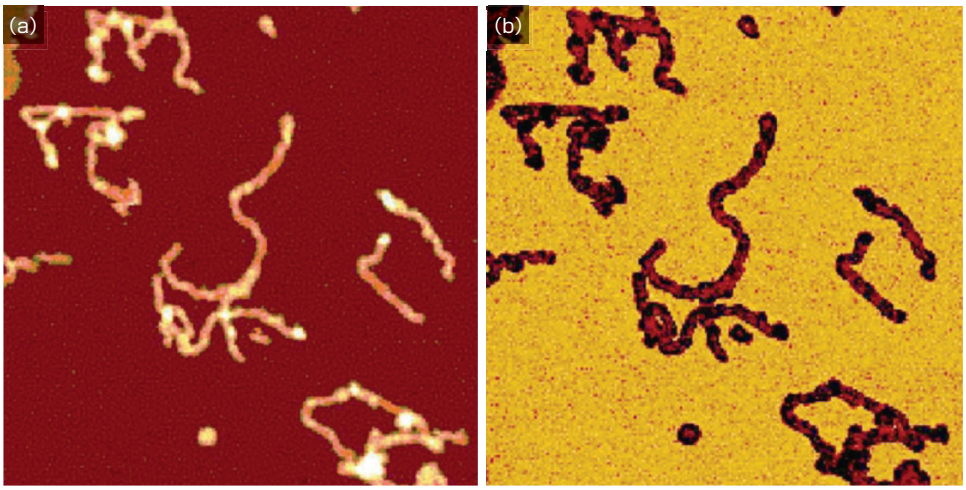


図4　へき開した新鮮なマイカ上に吸着した樹枝状高分子の自然環境下で計測されたトポグラフィー画像（a）と弾性率（b）を示している。500×500nmの領域が走査され、zの範囲は6nm、弾性率の範囲は250MPaであった（試料提供：スイス、チューリヒのETHのA・ディター・シュリューター教授）

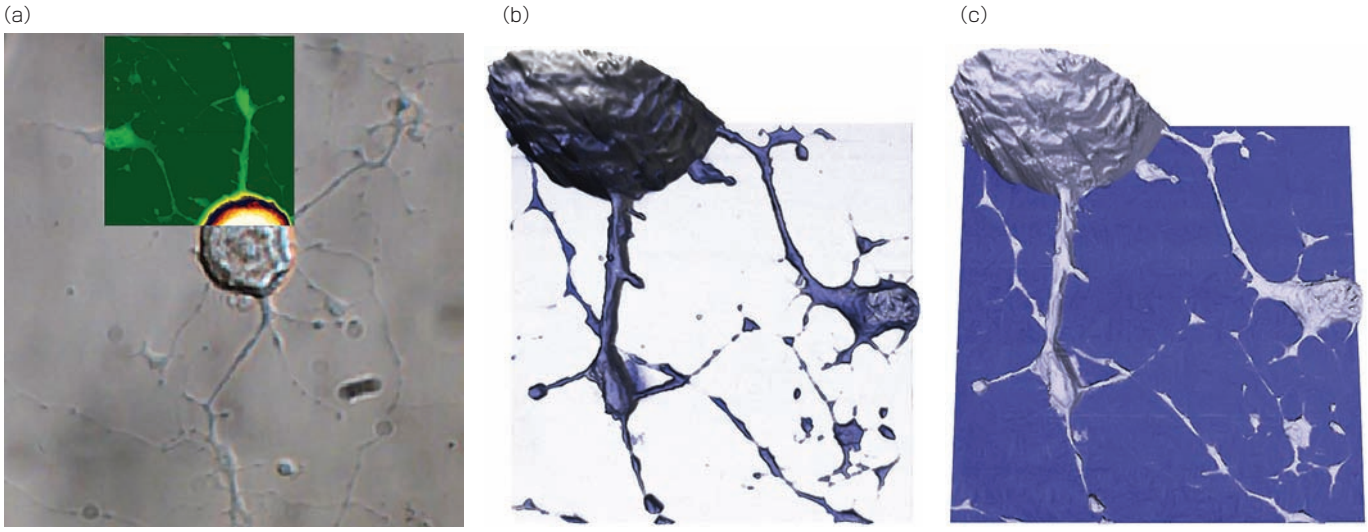


図5　生きた後根神経節細胞が緩衝液中で撮像された。（a）は試料の微分干渉コントラスト（DIC）による画像とAFMによる高さ画像を重ねている。（b）は接着力画像と重ねた3Dトポグラフィー画像を、（c）は弾性率データと重ねた3Dトポグラフィー画像を示している。走査領域は40μm^2、z範囲は10μm。閉ループ方式で画像化された接着力の範囲は600pN、弾性率の範囲は100kPa。

に解像されるばかりでなく、単一分子の1つと次列の端のグループに並列する端のグループとの間に1.2Gpaの弾性率の差があることが測定された。

これらの単一分子を測定することで、QIは樹木状になった高分子鎖、つまりポリスチレンのバックボーンと樹枝状の側鎖を構成する孤立した個々の分子を画像化できる。これらの単一分子の重なりとねじれはトポグラフィー画像として明瞭に解像される（**図4**）。

QIとDICの組み合わせによる生きた後根神経節細胞の実験では、それぞれの細胞の接着力は数百ピコニュートンの変化をもつことが明らかにされた（**図5**）。この測定は前述の細胞表面に対して垂直になるように最適化した圧電運動を使用し、接触後の後退を保証して行われたので、得られた接着力データには信頼性がある。接着力データは3Dトポグラフィー画像上にバックグラウンドのDIC画像と一緒に写像できるので、接着力データとトポグラフィーまたは光学的コントラストとの相関を高い信頼性で容易に調べることができる。

将来を展望すると、QIは生命科学の分野において顕微鏡を使用する研究者の重要な手法となり、迅速で正確な定量的ナノ計測の手段になると期待される。

著者紹介
ヘイコ・ハシュケ（Heiko Haschke）は独JPKインスツルメンツ社（JPK Instruments AG）の応用部長、トルステン・ヤンケ（Torsten Jaehnke）は同社の設立者兼最高技術責任者。
e-mail: haschke@jpk.com; www.jpk.com。

LFWJ