

原子間力顕微鏡の発展と今後の展望

安藤 敏夫*, **

Atomic Force Microscopy: Its Evolution and Prospects

Toshio ANDO*, **

Among various types of scanning probe microscopes, the atomic force microscope (AFM) is most widely used. This is because AFM can be applied to various types of materials (ranging from metals to semiconductors, ceramics, and biological samples) and environments (vacuum, air, and liquid). The original configuration of AFM system was quickly reinforced by the introduction of various techniques including microfabricated cantilevers, methods for detecting cantilever deflection including an optical lever method, and some operation modes. This reinforcement was followed by its evolution towards (1) achieving extremely high spatial resolution and force detection sensitivity, (2) applications to biological samples, (3) creation of various practical instruments for the analysis and processing of materials and devices, and (4) understanding of cantilever dynamics associated with the tip-sample interaction and image contrasts given by the dynamics. This article does not intend to cover the whole range of progress in AFM technology. Instead, highlighting optical techniques involved in AFM, this review summarizes the fundamentals of AFM, outlines its evolution and current state, and briefly expresses author's views on the prospects of this field.

Key words: AFM, imaging, force sensing, spatial resolution, optical components, cantilevers

絶縁性固体の原子表面構造をみることを目的に、導電性試料にしか適用できない走査型トンネル顕微鏡 (scanning tunneling microscope; STM)¹⁾ に代わる手法として、原子間力顕微鏡 (atomic force microscope; AFM) が 1986 年に誕生した²⁾。探針プロフィールメーターのアイデアをもとにしている。手作りのカンチレバーに探針としてダイヤモンドの粉を付け、カンチレバーのたわみをトンネル電流で計測したこの論文は AFM のアイデアを示したものであって、実際には像は得られていない。しかし、その意義は素早く世界に広まり、さまざまな改良が行われていった。AFM の技術開発とその応用は大きく 4 つに分かれて発展していったといえる (図 1)。ひとつは、それまで STM 技術を研究してきた研究者による、有用な応用の可能性を度外視した極限の空間分解能を追求する方向であり、超高真空中でサブ原子レベルの分解能で原子をみられるまでに^{3,4)}、また、個々の原子を識別し操作できるまで

に発展した^{5,6)}。第 2 は、AFM のバイオ応用のための方向であり、液中 AFM の空間分解能を向上させる条件検討^{7,8)}、低侵襲性の向上⁹⁾、イメージング速度の向上¹⁰⁻¹²⁾ といった技術開発を進める一方で、分子から細胞にわたるさまざまな生物試料のイメージングや¹³⁻¹⁵⁾、一分子レベルの分子内・分子間に働く力^{16,17)} や細胞の弾性¹⁸⁾ などの測定が行われた。現在では、生体分子の機能中の動態を動画映像として観察できるまでに発展している¹⁹⁻²¹⁾。第三は、AFM のさまざまな実用を目指す技術開発と他の技術との融合であり、半導体や磁気デバイスなどの検査装置、赤外吸収分光法と融合させたプラスチック化成製品の分析装置²²⁾、ナノリソグラフィ^{23,24)}、ナノプリンティング²⁵⁾、バイオセンサー²⁶⁾ などの装置が実用されるまでに。第 4 は、AC モード AFM の基礎的な研究であり、おもにカンチレバーのダイナミクスと、そのダイナミクスの種々の計測値に含まれる情報の解釈とその実証に関する

*金沢大学理工研究域数物科学系, **金沢大学理工研究域バイオ AFM 先端研究センター (〒920-1192 金沢市角間町)
E-mail: tando@staff.kanazawa-u.ac.jp

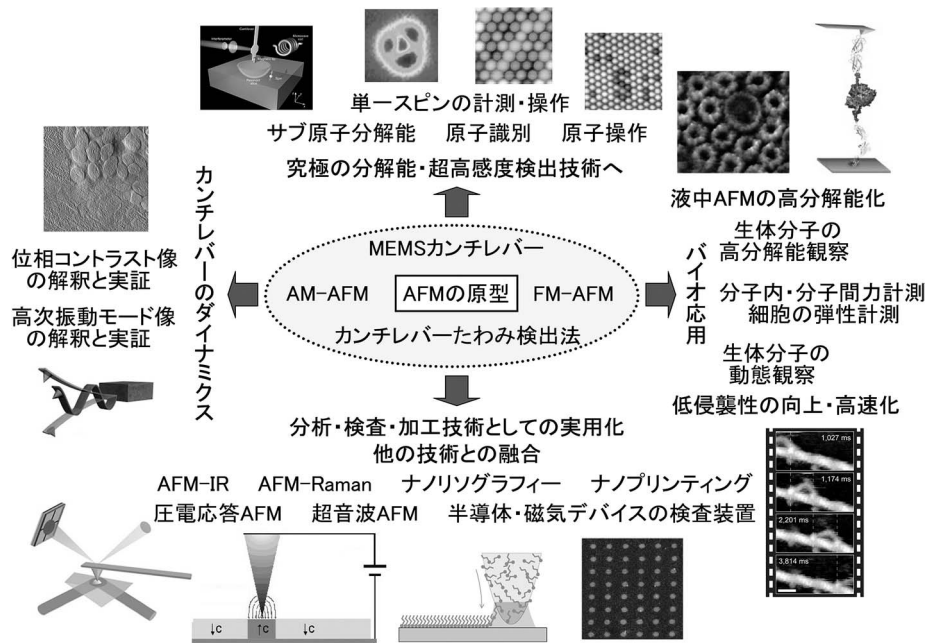


図1 AFMの原型はいくつかの技術によって補強され、その後いくつかの方向に発展していった。

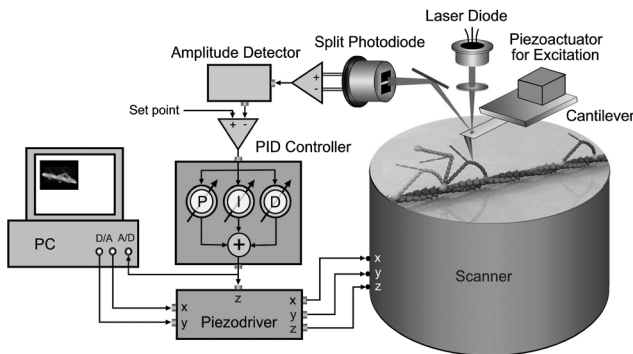


図2 AM-AFM装置の基本構成。

研究である²⁷⁻²⁹⁾。このように、当初のもくろみをはるかに超えて、AFM技術は多方面に発展し、広範な分野で利用されるまでになっている。このようなAFMの発展の全貌を解説することは著者の力の及ぶところではなく、本稿では、AFMに含まれる光学技術を所々で強調しつつ、AFMの基礎的な部分と発展の一部について概説し、将来展望については私見を簡単に述べる。

1. AFMの原理とイメージングモード

基板表面に置かれた試料の凹凸形状のAFMによる可視化は、試料表面上の多数の点における高さ情報の取得によって行われる(図2)。ここでは、試料ステージをスキャナーで走査する場合で述べるが、カンチレバー支持部を走査するタイプもある(後述)。カンチレバーの自由端に付いた探針先端を試料表面に接近あるいは接触させる。探針

と試料表面との間に働く力に対するカンチレバーの力学応答(動作モードに依存して、たわみ、振幅、あるいは共振周波数シフト)を測定し、フィードバック制御の下でこれらの値が決められた値(セットポイント)に戻るよう試料ステージをZ方向に移動させる。試料ステージをXY方向に走査しながら、この一連の動作を試料表面の多くの点で繰り返す。この過程で試料ステージは試料表面をなぞるように動くため、XY各点でスキャナーをZ方向に走査させている信号(フィードバック制御の出力)はそのXY位置における試料の高さを表す。したがって、その信号から試料の凹凸像が得られる。

DCモードでは、探針と試料との接触によるカンチレバーのたわみを計測する。試料ステージのXY走査中に探針が試料に常に接触しているため、摩擦による試料(および探針)のダメージが大きく、また、たわみゼロにおける計測基準値のドリフトの影響を受けやすい。ACモードは、一定の励振周波数を使用する振幅変調(amplitude modulation: AM)モードと、探針・試料間相互作用により変動するカンチレバーの共振周波数に励振周波数を常に一致させる周波数変調(frequency modulation: FM)モードに分けられる。距離 z だけ離れた探針・試料間に働く力 $F(z)$ は近似的に、

$$F(z) = F_0(z = z_0) + k(z - z_0) \quad (1)$$

と表される(ここで、 $k = \partial F / \partial z$ は力の勾配を表す)。斥力領域($z < z_0$)では、 $k < 0$ 、引力領域($z > z_0$)では $k > 0$ であるので、カンチレバーのばね定数 k_c は見かけ上、斥

力領域で増大し、引力領域で減少する。それゆえ、斥力が作用する場合には共振周波数 f_c は増大し、引力が作用する場合には減少する。AM モードでは、共振周波数のシフトは励振信号に対する位相のシフトとして検出できる。また、探針・試料間接触による振動エネルギーの減少に伴う振幅の減少に加え、共振周波数シフトによる励振効率の変化によっても振幅は変化する。FM モードでは位相は常に $\pi/2$ に固定されている。AM モードにおける位相シフトと FM モードにおける共振周波数シフトを感度よく検出するには、カンチレバーの Q 値 (Q_c) は高くなければならない。石英性カンチレバー (q-plus センサー) を用いた超高真空の超解像・超高感度の FM-AFM では Q 値は非常に大きく、200,000 程度である³⁾。しかし、Q 値に逆比例してカンチレバーの振幅応答は遅くなり、それゆえ、共振周波数のシフトの整定は遅く、画像取得に時間がかかる。カンチレバーの自由振動振幅 A_0 、走査中の振幅 A_s 、カンチレバーのばね定数 k_c と、探針・試料間に働くピーク斥力 F_p との間には、

$$F_p = k_c(A_0^2 - A_s^2)^{1/2}/Q_c \quad (2)$$

の関係があるため³⁰⁾、 Q_c が大きいほど微弱な斥力の下でのイメージングが可能になる。

カンチレバーの励振は通常、カンチレバーホルダーのそばに設置した piezo 素子を振動させることで行うが、共振周波数の異なるいろいろなものが振動するため、カンチレバーの振動はいくつかの周波数でピークをもつ (forest of peaks と呼ばれる)。この問題を避けるために、カンチレバーを強磁性コートし交流磁場で励振させる手法や³¹⁾、AC レーザーを当てて励振する手法も使われている³²⁾。また、光を当てることによるカンチレバーの熱膨張を利用して、Z スキャナーを使わずに探針・試料間の距離制御を行うことも可能である³²⁾。

2. カンチレバー

利用されるカンチレバーの特性は、真空中 AFM と液中 AFM で大きく異なる。また、FM-AFM と AM-AFM でも異なる。真空中 FM-AFM は超解像観察・超高感度検出を目指すものであるため、熱ゆらぎが小さく、Q 値の大きい硬いシリコン製 (共振周波数: 数百 KHz-2MHz, ばね定数: 数十 N/m)、あるいは、石英製のカンチレバー (共振周波数: 30 kHz 程度, ばね定数: 2000 N/m 程度) が利用される。液中 AFM では柔らかい試料系がおもな対象となるため、窒化シリコン製のカンチレバーが一般に使われる。大きめのカンチレバーは三角形状、小さめのは短冊形状である。長さ 100~200 μm のものでは、共振周波数 f_c は

大気中で 10~30 kHz 程度、水中では 1~3 kHz 程度に落ちる。ばね定数 k_c は 0.1~0.3 N/m である。共振周波数を上げイメージング速度を上げるために、最近では長さ 6~30 μm の微小カンチレバーが使われ始めている。 f_c は大気中で 100 kHz~3.5 MHz、水中で 20 kHz~1.2 MHz 程度、 k_c は 0.1~0.2 N/m である。

短いカンチレバーは、共振周波数が高く応答速度が速いということだけにとどまらず、いくつかの長所をもつ。カンチレバーの熱ゆらぎの大きさは $(k_B T/k_c)^{1/2}$ (ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度) であるが⁴⁾、共振周波数よりも若干高い周波数にまで分布するため、 f_c が高いと、ノイズ密度が小さくなる。AC モードで使われる周波数帯域は、共振周波数を中心とするイメージング周波数 (フィードバック周波数 f) であるため (すなわち、 $f_c \pm f$)、分割フォトダイオード (split photo-diode: SPD; 図 2 参照) の出力をこの周波数領域を透過するバンドパスフィルターに通すことができ、熱ゆらぎの影響は f_c が高いほど少ない。光てこ法 (後述) ではカンチレバーのたわみは角度の変化として検出されるため、一定のたわみに対する角度変化は短いカンチレバーほど大きく、たわみ (および振幅) 検出感度は高くなる。さらには、探針と試料との間にかかる力の勾配 k によるカンチレバーの共振周波数シフトは約 $-0.5 k f_c/k_c$ であるため、共振周波数が高くばね定数の小さいカンチレバーは励振周波数が固定の AM-AFM で大きな位相変化を与える (大きなカンチレバーの数百~千倍)。共振周波数のシフトは AM-AFM では振幅の減少となって現れるため、探針・試料間の接触力の検出感度をさらに上げることになる。共振周波数シフトを直接計測する FM-AFM でも有利にはなるが、FM-AFM ではカンチレバーを自励振動させるため、ばね定数が小さいと振幅が大きくなり、探針が試料表面を大きく離れ試料表面近傍で大きい力場の検出にとって必ずしも有利にならないといわれている。しかし、実際に微小カンチレバーを FM-AFM で試した例は報告されていない。

3. てこ法

カンチレバーのたわみ検出については、ここでは光てこ法^{33,34)} (図 1 参照) を取り挙げる。この特集号で川勝氏がレーザードップラー検出を、内橋氏が微小カンチレバーに適用する光てこ光学系を、山田氏が光てこ法の低ノイズ化を詳しく述べているので、参照されたい。光てこ法は比較的簡単な装置構成で高感度なたわみ検出が可能であることから、最も広く利用されている。カンチレバー先端付近のたわみ δz と傾きの変化 $\delta\phi$ との間には、 $\delta z = (3L\delta\phi)/2$ と

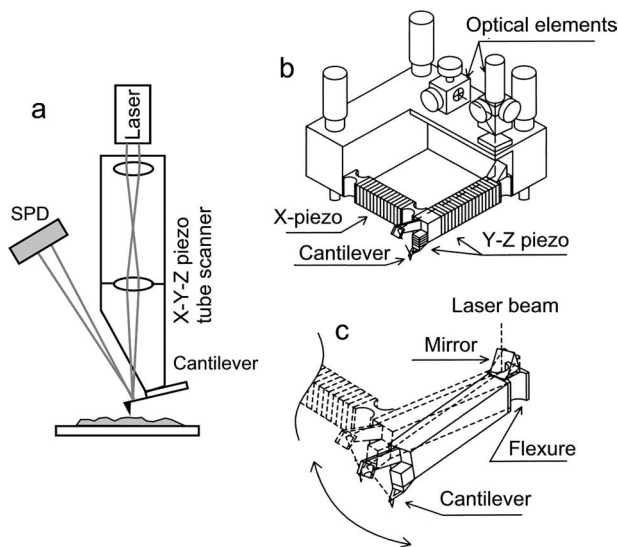


図3 カンチレバー走査方式のAFMで採用されているトラッキング（レーザーを走査されるカンチレバーの一定位置に常にフォーカスする）手法。

いう関係がある。ここで L はレバーの長さである。カンチレバー先端が $\delta\phi$ 傾くと、レーザーの反射角は $2\delta\phi$ 変わる。カンチレバーとSPDとの間の距離を D とすると、SPD位置での反射レーザースポット位置の変化 δd は $2D\delta\phi$ となる。SPD位置でのレーザースポットの直径を $2d$ とすると、各フォトダイオードに当たるレーザー光強度の差の挿入射光量に対する割合は

$$\Delta d/d = (2D/d) \times \delta\phi = (4D/3d) \times \delta z/L \quad (3)$$

になる。 D を大きくすればこの割合が大きくなるように思われるが、 D を大きくすれば d も比例して大きくなるので、割合は D に依存しない。 D/d はレーザーを絞る角度で決まり、角度が小さいほど D/d は大きくなって有利である。だが、カンチレバーに当てるレーザー光を小さいスポットに絞るためには、角度をある程度大きくしなければならぬ。反射光の一部がレーザー素子に戻ると、誘導放出効果により発振が不安定になりノイズが発生するため、駆動電流に高周波信号を重畳させて干渉性を低下させることによりノイズを小さくする手法が採用されている（山田氏の解説を参照）。

試料ステージ走査方式のAFMではレーザーの焦点位置を固定できるが、大きな試料観察に適したカンチレバー走査方式では、XY走査に合わせてレーザーの焦点位置を移動（トラッキング）させる必要がある。これまでに、スキャナーである円筒ピエゾの内部にトラッキング用レンズを組み込む方式³⁵⁾（図3a）、積層ピエゾの根本に設けたヒンジにミラーを付ける方式³⁶⁾（図3b, c）、円筒ピエゾの側面にミラーを付ける方式³⁷⁾、積層ピエゾで構成したス

キャナーにレンズを組み込む方式（Bruker社の一部のAFM）が採用されている。これらの方式のトラッキングは、SPDに導かれた反射光の位置を変えない。ACモードではこの位置のDC変化は問題にならないので、フォーカシングレンズに入射させるレーザー光の角度をミラーで走査するトラッキング方式も可能である。音響光学素子でレーザーの入射角度を走査する方式は、高速性の点で有利だが、いまだ採用されていない。

4. 大気中・真空中AFMの発展

ここでは、大気中・真空中AFMの発展を概説する。AFM発明当初から1990年代半ばまでは、装置構成がシンプルで試料準備も簡便な大気中AFMの開発と応用が主流であり、現在広く使われているたわみ検出方式や動作モードのほとんどは大気中AFMで開発されたものである。トンネル電流検出方式のコンタクトモードAFMを使って、1987年にはBinnigらによってグラファイト（HOPG）で³⁸⁾、また、Albrechtらによって絶縁体試料の高配向のボロンナイトライドで³⁹⁾原子分解能観察が報告され、STMと同程度の分解能で表面構造解析が可能となることが示された。しかし、トンネル電流検出方式ではSTM探針とカンチレバー背面、さらにカンチレバーと試料の二段の位置合わせが必要になり、調整が非常にやっかいな装置であった。トンネル電流検出方式に代わる変位検出法として、光技術を利用した光干渉方式⁴⁰⁾や光てこ方式^{33,34)}がすぐに開発された。その他にも、静電容量方式⁴¹⁾やピエゾ抵抗方式⁴²⁾などいくつかの方法も提案されたが、現在では上述のように光てこ方式が主流になっている。

ところで、AFM測定で原子分解能観察が可能となることが示されたが、大気中で原子分解能を得るには、コンタクトモードAFMでは探針を試料に $0.1\sim 1\mu\text{N}$ もの斥力で押し付けなければならない^{38,39)}、マイカやグラファイトなど層状物質のごく限られた試料しか観察できなかった。そもそも大気中では試料表面に吸着水が存在するので、原子レベルの表面構造解析手法としては最近では超高真空や溶液中環境での応用が主流である。一方で、カンチレバーを磁性コートしたり、センサーを付与するなどの工夫で、表面構造と同時に導電性⁴³⁾、静電容量⁴⁴⁾、静電気力⁴⁵⁾、磁気力⁴⁶⁾の分布を可視化できるため、大気中の応用としては磁性デバイスや半導体デバイスの電気特性評価に利用されることが多い。また、凹凸像と同時に摩擦力⁴⁷⁾や粘弾性分布⁴⁸⁾をマッピングすることで、高分子薄膜などの機械特性評価にも利用されている。

超高真空（ultra high vacuum; UHV）環境下で清浄表面

の原子分解能観察をしようとする試みも AFM 発明当初から行われており、1990 年に NaCl 表面で最初の原子分解能観察が報告された⁴⁹⁾。その後もイオン性結晶を中心に原子分解能での観察例が報告されている^{50,51)}。これらの報告はすべてコンタクトモード AFM での観察であり、観察中に試料表面の原子構造が破壊されたり⁵¹⁾、STM で通常観察されるような原子欠陥が AFM では観察されず、シリコン表面のような活性表面では探針と試料が強く凝着して原子像が得られないという多くの問題があった。探針が試料に非接触、すわなち、引力領域で力の検出ができる FM モードの導入により、初めて STM と同等、あるいはそれ以上の分解能で原子像を得ることが可能となった^{4,52,53)}。その後の UHV-AFM の発展は目覚ましく、上述したように原子の同定⁵⁾や操作⁶⁾、磁気交換力の原子レベルでの検出⁵⁴⁾に成功している。最近では、探針と試料間の力検出に水晶振動子を利用した q-plus センサー方式を採用し、探針先端原子種の制御によって、原子の荷電状態⁵⁵⁾や分子の六員環構造⁵⁶⁾までもが可視化できるようになってきており、今では STM を凌駕する表面解析ツールとなっている。

5. 液中 AFM の発展

AFM が液中でも使えることは、1987 年にパラフィンオイル中の塩化ナトリウム結晶の観察で最初に実証された⁵⁷⁾。その後、バッファー溶液中に置いたさまざまな生物試料の観察が試みられた。興味深いことに、1989 年にはすでに、血液凝固に関連するフィブリンたんぱく質の凝集という動的プロセスの観察が試みられている⁵⁸⁾。また、それに続いて、細胞がウイルスに感染したあとのプロセス⁵⁹⁾やバクテリアの外皮にある S 層たんぱく質に抗体が結合するプロセス⁶⁰⁾の観察が DC モード AFM で試みられた。もちろん、動的プロセスとはいっても、1 画像取得に 1 分程度の時間がかかるため、鮮明な像は得られていない。一方、DC モードでおもに Engel のグループにより、ギャップ結合⁶¹⁾、大腸菌の OmpF ポリン^{62,63)}、赤血球のアクアポリン⁶⁴⁾、バクテリオロドプシン^{65,66)}といった膜たんぱく質系の美しい高分解能の像が得られ、AFM のバイオ分野での有効性が次々と実証されていった。AM モード (タッピングモード) が導入されると、基板に緩く吸着した分子も観察可能になり、DNA から RNA への転写⁶⁷⁾や、 λ Cro たんぱく質との結合による DNA の曲げ⁶⁸⁾、DNA の DNase による分解⁶⁹⁾といった動的プロセスの観察が再び試みられるようになった。しかし、イメージング速度は遅いままであり、真に有意義な情報は得られず、動的

プロセスの観察はその後行われなくなっていった。AM モードでも、例えば膜貫通型の 2 本の α ヘリックスをつなぐループの像が得られるほど高解像であることが示され⁷⁰⁾、おもに膜たんぱく質系で多くの観察が行われていった⁷¹⁻⁷³⁾。

このようなバイオイメーキングが多く試みられていった一方で、力センサーとしても AFM は活用されるようになっていった。1994 に Gaub のグループにより、親和性の高いアビジンとビオチン化したたんぱく質との結合を破断するに必要な力が初めて測定された¹⁶⁾。1997 年には、アクチンとミオシンの結合の破断力や有効破断距離などが測定された¹⁷⁾。その後、破断力が力を加える速さの対数に比例するという Bell-Evans の理論⁷⁴⁾が実証され、その理論に基づく破断力の解析により、結合のエネルギー地形図がある程度得られるようになった⁷⁵⁾。また、たんぱく質を解くのに必要な力^{76,77)}や生きた細胞の弾性測定^{78,79)}などが行われていき、現在ではフォースカーブ測定を自動的に繰り返し測定する装置も使われるようになってきている。

上述のように、AFM によるバイオイメーキングは、結晶化しにくい膜たんぱく質の観察、特に天然の膜に埋め込まれた膜たんぱく質の高分解能像を得るのに威力を發揮したが、生命科学にそれ以上の貢献をすることはほとんどなかった。生理的溶液条件下で光学顕微鏡よりもはるかに高い空間分解能で活性のある生物試料を観察できるものの、本質的にダイナミックである生体分子のダイナミクスを観察するには AFM の走査速度は遅すぎた。AFM を高速化する研究が多くの研究室で行われていても不思議ではないが、実際には、米国の Quate のグループと Hnasma のグループ、そして日本のわれわれのグループしか本格的に研究を進めなかった。Quate のグループは半導体ウェハの検査やナノリソグラフィーの高速化を目的に、MEMS 技術による自己検知・自己駆動型のカンチレバーとカンチレバーアレイの開発に向かった^{80,81)}。機能が統合されたカンチレバーは AFM の装置構造をきわめてシンプルにする点で大きな利点をもつ。しかし、このような複雑なカンチレバーは大きくならざるを得ず、共振周波数は低い。それゆえ、達成されたある程度的高速化はカンチレバーアレイによるものである。液中 AFM の高速化も同様の手法で試みられたが、自己駆動型カンチレバーを絶縁コートする必要があるため、カンチレバーの共振周波数はさらに低くならざるを得なかった⁸²⁾。Hansma のグループは、微小カンチレバー⁸³⁾、微小カンチレバーに適用可能な光てこ光学系⁸⁴⁾の開発により、ある程度的高速化を実現し、GroEL-GroES の結合・解離の動態イメージングを試みている⁸⁵⁾。しかし、フィードバック領域は足りず、この動態は X 走査なし

で検出するしかなかった。われわれのグループは、これらのデバイスに加え、高速スキャナー、高速振幅計測回路を開発し、2001年にブラウン運動するたんぱく質分子を80 ms/frameの速さで撮ることに成功した¹¹⁾。しかし、脆いたんぱく質を傷付けずにイメージングできるほどにはフィードバック帯域は十分でなかった。その後、QコントロールによるZスキャナーの振動ダンピング⁸⁶⁾、新規フィードバック制御回路などの開発により⁹⁾、2008年に実用レベルの高速AFMを実現した¹²⁾。その結果、本特集号の内橋氏の解説にあるようなたんぱく質の動態イメージングに成功している。

6. その他のAFM技術の発展

AFMと他の技術を組み合わせることにより、元々のAFMにはない機能をもたせることができる。ここでは、そのような技術のいくつかを紹介する。

赤外(Infrared; IR)分光顕微鏡は分子の同定に有用であり利用されているが、空間分解能は低い。この限界を破るためにAFM-IRが開発された⁸⁷⁾。チューナブルIRパルスレーザを当てると、それを吸収した物体は光熱効果により膨張し振動が生じる。試料をプリズムの上に乗せ、全反射角でレーザーを入射し、エバネセント場で試料を励起する。探針が試料に接触したカンチレバーは試料の急速な膨張で励振される。IRの波長を掃引しつつ、また、試料ステージを走査しつつ、その振動を解析することにより、IRスペクトルのナノスケールマップを得ることができる。プラスチックフィルムなどの化成品の分析に利用され始めている⁸⁸⁾。この例のように、試料に外部から何らかの擾乱を与え、その擾乱に特異的に力学応答する物質の試料内分布をカンチレバー探針で検出する手法は種々考えられる。例えば、圧電応答AFMがある^{89,90)}。導電性探針をもつカンチレバーを試料に接触させ、探針・試料間に交流電圧をかける。それによって生じる試料の歪みを検出し、強誘電性ドメインマップを得る手法である。

超音波とAFMを組み合わせる手法も開発されている^{91,92)}。試料を超音波で振動させ、探針を試料表面に強く接触させる。その強い接触により、探針は試料表面下にある異なる弾性率をもつ物体や空洞のような構造を検出する。表面から200 nm程度下にある物体・構造を検出できるといわれている。試料基板を振動させる超音波の周波数 f_1 とは異なる周波数 f_2 の超音波でカンチレバー支持部を振動させておくと、探針と試料との接触により2つの超音波の非線形干渉が起こり、 $|f_1-f_2|$ の周波数をもつ音波が発生する。 $|f_1-f_2|$ をカンチレバーの共振周波数に合わせて

おくと、カンチレバーは効率よく振動する。非線形干渉の強度や位相は試料表面下200 nm程度にある物体・構造に影響されるため、その存在をカンチレバーの振幅・位相計測により検出できる^{93,94)}。もっと深い位置にある物体・構造を強い押し込みによる効果以外の効果(すなわち、試料内部にある物体・構造が試料下部から伝搬してくる超音波を擾乱する効果)で検出できるという報告はあるものの⁹⁵⁾、確かではない。

カンチレバーに新しい機能をもたせて、新しい分析・加工のためのツールとする研究開発も進められてきた。中空探針をもつカンチレバー(アレイ)に溶液溜めを設け、溶液を探針先端から出して描画するディップペンナノリソグラフィが開発され²⁴⁾、電子線ナノリソグラフィに代わる手法として実用されている。同様の手法で基板に一定のパターンでたんぱく質などの分子をプリントする手法⁹⁶⁾や、試料と探針の間に電圧をかけ、試料表面にある水などの電気分解により試料表面を陽極酸化するリソグラフィ法⁹⁷⁾が開発されている。また、カンチレバーの片面に特定の分子を載せ、その分子に特異的に結合する分子の存在や量をカンチレバーのたわみ計測から測定する手法が開発され、核酸や抗原の分析装置としての実用化が進められている^{98,99)}。

7. 今後の展望

空間分解能や力検出感度、および、その力検出を通じた距離計測精度を極めようとする超真空AFMの研究はどこまで進むのであろうか。すでに、距離精度は原子核の大きさ程度にまでなっている。実用を度外視した追求がどこまで進むか門外漢には予言不可能であるが、ここまで来た超性能を生かして新しい物理を開拓することが重要と思われる。液中FM-AFMの空間分解能は固体表面や生体分子に吸着した水の層の観察¹⁰⁰⁾やたんぱく質外側にある α ヘリックスを解像できる¹⁰¹⁾までに向上している。一方、高速AM-AFMの開発により、生体分子の動態撮影が可能になっている¹⁹⁻²¹⁾。これら超解像と高速性を併せもつAFMは実現可能なのではないか。現状の高速性能はカンチレバーとピエゾ素子で制限されており、2倍程度のさらなる高速化が限界であろう。時間、空間分解能とも液中AFMの性能向上はあまり期待できない。むしろ、他の技術(例えば、蛍光顕微鏡法)と融合させ観察情報を増やすこと、また、これらの技術を広く普及させ、バイオや、電気化学反応、腐食、洗浄などの液中で起こる現象の詳細理解に向けた応用研究をさらに進めることが重要と考える。さまざまな機能をもった実用的なAFM関連装置・ツールは今後

も出てくる可能性が高い。AFM 関連技術はこれまではおもに技術シーズの観点から研究され、また、応用は技術の性能実証を主眼に行われてきたといえるが、今後はニーズの観点からの技術開発と技術を生かした応用研究が重要である。

文 献

- 1) G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber and E. Weibel: "Tunneling through a controllable vacuum gap," *Appl. Phys. Lett.*, **40** (1982) 178-180.
- 2) G. Binnig, C. F. Quate and Ch. Gerber: "Atomic force microscope," *Phys. Rev. Lett.*, **56** (1986) 930-933.
- 3) J. Welker and F. J. Giessibl: "Revealing the angular symmetry of chemical bonds by atomic force microscopy," *Science*, **336** (2012) 444-449.
- 4) F. J. Giessibl, S. Hembacher, H. Bielefeldt and J. Mannhart: "Subatomic features on the Silicon(111)-(7×7) surface observed by atomic force microscopy," *Science*, **289** (2000) 422-425.
- 5) Y. Sugimoto, P. Jelinek, P. Pou, M. Abe, P. Jelinek, R. Pérez, S. Morita and Ó. Custance: "Chemical identification of individual surface atoms by atomic force microscopy," *Nature*, **446** (2007) 64-67.
- 6) Y. Sugimoto, P. Pou, O. Custance, P. Jelinek, M. Abe, R. Perez and S. Morita: "Complex patterning by vertical interchange atom manipulation using atomic force microscopy," *Science*, **322** (2008) 413-417.
- 7) D. J. Müller, H.-J. Sass, S. A. Müller, G. Büldt and A. Engel: "Surface Structures of native bacteriorhodopsin depend on the molecular packing arrangement in the membrane," *J. Mol. Biol.*, **285** (1999) 1903-1909.
- 8) A. Engel and D. J. Müller: "Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope," *Nat. Struct. Biol.*, **7** (2000) 715-718.
- 9) N. Kodera, M. Sakashita and T. Ando: "Dynamic proportional-integral-differential controller for high-speed atomic force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, **77** (2006) 083704.
- 10) M. B. Viani, T. E. Schäffer, G. T. Paloczi, L. I. Pietrasanta, B. L. Smith, J. B. Thompson, M. Richter, M. Rief, H. E. Gaub, K. W. Plaxco, A. N. Cleland, H. G. Hansma and P. K. Hansma: "Fast imaging and fast force spectroscopy of single biopolymers with a new atomic force microscope designed for small cantilevers," *Rev. Sci. Instrum.*, **70** (1999) 4300-4303.
- 11) T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito and A. Toda: "A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (2001) 12468-12472.
- 12) T. Ando, T. Uchihashi and T. Fukuma: "High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes," *Prog. Surf. Sci.*, **83** (2008) 337-437.
- 13) S. Gould, O. Marti, B. Drake, L. Hellemans, C. E. Bracker, P. K. Hansma, N. L. Keder, M. M. Eddy and G. D. Stucky: "Molecular resolution images of amino acid crystals with the atomic force microscope," *Nature*, **332** (1988) 332-334.
- 14) M. Egger, F. Ohnesorge, A. L. Weisenhorn, S. P. Heyn, B. Drake, C. B. Prater, S. A. C. Gould, P. K. Hansma, H. E. Gaub: "Wet lipid-protein membranes imaged at submolecular resolution by atomic force microscopy," *J. Struct. Biol.*, **103** (1990) 89-94.
- 15) F. A. Schabert and A. Engel: "Reproducible acquisition of Escherichia coli porin surface topographs by atomic force microscopy," *Biophys. J.*, **67** (1994) 2394-2403.
- 16) E.-L. Florin, V. T. Moy and H. E. Gaub: "Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs," *Science*, **264** (1994) 415-417.
- 17) H. Nakajima, Y. Kunioka, K. Nakano, K. Shimizu, M. Seto and T. Ando: "Scanning force microscopy of the interaction events between a single molecule heavy meromyosin and actin," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234** (1997) 178-182.
- 18) V. Parpura and J. M. Fernandez: "Atomic force microscopy study of the secretory granule lumen," *Biophys. J.*, **71** (1996) 2356-2366.
- 19) M. Shibata, H. Yamashita, T. Uchihashi, H. Kandori and T. Ando: "High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin," *Nat. Nanotechnol.*, **5** (2010) 208-212.
- 20) N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa and T. Ando: "Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy," *Nature*, **468** (2010) 72-76.
- 21) T. Uchihashi, R. Iino, T. Ando and H. Noji: "High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F₁-ATPase," *Science*, **333** (2011) 755-758.
- 22) T. Eby, U. Gundusharma, M. Lo, K. Sahagian, C. Marcott and K. Kjoller: "Reverse engineering of polymeric multilayers using AFM-based nanoscale IR spectroscopy and thermal analysis," *Spectrosc. Eur.*, **24** (2012) 18-21.
- 23) P. Avouris, T. Hertel and R. Martel: "Atomic force microscope tip-induced local oxidation of silicon: kinetics, mechanism, and nanofabrication," *Appl. Phys. Lett.*, **71** (1997) 285-287.
- 24) R. D. Piner, J. Zhu F. Xu, S. Hong and C. A. Mirkin: "Dip pen" nanolithography," *Science*, **283** (1999) 661-663.
- 25) M. Jaschke and H.-J. Butt: "Deposition of organic material by the tip of a scanning force microscope," *Langmuir*, **11** (1995) 1061-1064.
- 26) J. Zhang, H. P. Lang, A. Bietsch, W. Grange, U. Certa, R. Mckendry, H.-J. Güntherodt, M. Hegner and Ch. Gerber: "Rapid and label-free nanomechanical detection of biomarker transcripts in human RNA," *Nat. Nanotechnol.*, **1** (2006) 214-220.
- 27) J. P. Cleveland, B. Anczykowski, A. E. Schmid and V. B. Elings: "Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy," *Appl. Phys. Lett.*, **72** (1998) 2613-2615.
- 28) R. W. Stark and W. M. Heckl: "Higher harmonics imaging in tapping-mode atomic-force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, **74** (2003) 5111-5114.
- 29) T. Uchihashi, H. Yamashita and T. Ando: "Fast phase imaging in liquids using a rapid scan atomic force microscope," *Appl. Phys. Lett.*, **89** (2006) 213112.
- 30) T. R. Rodríguez and R. García: "Theory of Q control in atomic force microscopy," *Appl. Phys. Lett.*, **82** (2003) 4821-4823.
- 31) W. Han, S. M. Lindsay and T. Jing: "A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids," *Appl. Phys. Lett.*, **69** (1996) 4111-4113.
- 32) H. Yamashita, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, T. Uchihashi, D. Yamamoto and T. Ando: "Tip-sample distance control using photothermal actuation of a small cantilever for high-speed atomic force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, **78** (2007) 083702.
- 33) G. Meyer and N. M. Amer: "Novel optical approach to atomic force microscopy," *Appl. Phys. Lett.*, **53** (1988) 1045-1047.
- 34) R. Erlandsson, G. M. McClelland, C. M. Mate and S. Chiang: "Atomic forcemicroscopy using optical interferometry," *J. Vac. Sci Technol.*, **A6** (1988) 266-270.
- 35) P. K. Hansma, B. Drake, D. Grigg, C. B. Prater, F. Yashar, G.

- Gurley, V. Elings, S. Feinstein and R. Lal: "A new, optical-lever based atomic force microscope," *J. Appl. Phys.*, **76** (1994) 796-799.
- 36) K. Nakano: "A novel low profile atomic force microscope compatible with optical microscopes," *Rev. Sci. Instrum.*, **69** (1998) 1406-1409.
 - 37) K. Nakano: "Three-dimensional beam tracking for optical lever detection in atomic force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, **71** (2000) 137-141.
 - 38) G. Binnig, Ch. Gerber, E. Stoll, T. R. Albrecht and C. F. Quate: "Atomic resolution with atomic force microscope," *Europhys. Lett.*, **3** (1987) 1281-1286.
 - 39) T. R. Albrecht and C. F. Quate: "Atomic resolution imaging of a nonconductor by atomic force microscopy," *J. Appl. Phys.*, **62** (1987) 339435-339438.
 - 40) Y. Martin, C. C. Williams and H. K. Wickramasinghe: "Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale," *J. Appl. Phys.*, **61** (1987) 4723-4729.
 - 41) G. Neubauer, S. R. Cohen, G. M. McClelland, D. Horne and C. M. Mate: "Force microscopy with a bidirectional capacitance sensor," *Rev. Sci. Instrum.*, **61** (1990) 2296-2308.
 - 42) M. Tortonese, R. C. Barrett and C. F. Quate: "Atomic resolution with an atomic force microscope using piezoresistive detection," *Appl. Phys. Lett.*, **62** (1993) 834-836.
 - 43) Y. Sugawara, T. Ishizaka and S. Morita: "Scanning force tunneling microscopy of a graphite surface in air," *J. Vac. Sci. Technol.*, **B9** (1991) 1092-1095.
 - 44) J. R. Matey and J. Blanc: "Scanning capacitance microscopy," *J. Appl. Phys.*, **57** (1985) 1437-1444.
 - 45) Y. Martin, D. W. Abraham and H. K. Wickramasinghe: "High-resolution capacitance measurement and potentiometry by force microscopy," *Appl. Phys. Lett.*, **52** (1988) 1103-1105.
 - 46) D. Rugar, H. J. Mamin, P. Guethner, S. E. Lambert, J. E. Stern, I. McFadyen and T. Yogi: "Magnetic force microscopy: General principles and application to longitudinal recording media," *Appl. Phys.*, **68** (1990) 1169-1183.
 - 47) C. M. Mate, G. M. McClelland, R. Erlandsson and S. Chiang: "Atomic-scale friction of a tungsten tip on a graphite surface," *Phys. Rev. Lett.*, **59** (1987) 1952-1945.
 - 48) P. Maivald, H. J. Butt, S. A. C. Gould, C. B. Prater, B. Drake, J. A. Gurley, V. B. Elings and P. K. Hansma: "Using force modulation to image surface elasticities with the atomic force microscope," *Nanotechnology*, **2** (1991) 103-106.
 - 49) G. Meyer and N. M. Amer: "Optical-beam-deflection atomic force microscopy: The NaCl (001) surface," *Appl. Phys. Lett.*, **56** (1990) 2100-2101.
 - 50) E. Meyer, H. Heinzlmann, D. Brodbeck, G. Overney, R. Overney, L. Howald, H. Hug, T. Jung, H.-R. Hidber and H.-J. Güntherodt: "Atomic resolution on the surface of LiF(100) by atomic force microscopy," *J. Vac. Sci. Technol. B*, **9** (1991) 1329-1332.
 - 51) M. Ohta, Y. Sugawara, K. Hontani, S. Morita, F. Osaka, M. Suzuki, H. Nagaoka, S. Mishima and T. Okada: "Atomically resolved image of cleaved GaAs(110) surface observed with an ultrahigh vacuum atomic force microscope," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **33** (1994) L52-L54.
 - 52) S. Kitamura and M. Iwatsuki: "Observation of 7×7 reconstructed structure on the silicon(111) surface using ultrahigh vacuum noncontact atomic force microscopy," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **34** (1995) L145-L148.
 - 53) Y. Sugawara, M. Ohta, H. Ueyama and S. Morita: "Defect motion on an InP(110) surface observed with noncontact atomic force microscopy," *Science*, **270** (1995) 1646-1648.
 - 54) U. Kaiser, A. Schwarz and R. Wiesendanger: "Magnetic exchange force microscopy with atomic resolution," *Nature*, **446** (2007) 522-525.
 - 55) L. Gross, F. Mohn, P. Liljeroth, J. Repp, F. J. Giessibl and G. Meyer: "Measuring the charge state of an adatom with noncontact atomic force microscopy," *Science*, **324** (2009) 1428-1431.
 - 56) L. Gross, F. Mohn, P. Liljeroth and G. Meyer: "The chemical structure of a molecule resolved by atomic force microscopy," *Science*, **325** (2009) 1110-1114.
 - 57) O. Marti, B. Drake and P. K. Hansma: "Atomic force microscopy of liquid-covered surfaces: Atomic resolution images," *Appl. Phys. Lett.*, **51** (1987) 484-486.
 - 58) B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, S. A. Gould, T. R. Albrecht, C. F. Quate, D. S. Cannell, H. G. Hansma and P. K. Hansma: "Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope," *Science*, **243** (1989) 1586-1589.
 - 59) W. Häberle, J. K. H. Höber, F. Ohnesorge, D. P. Smith and G. Binnig: "*In situ* investigations of single living cells infected by viruses," *Ultramicroscopy*, **42-44** (1992) 1161-1167.
 - 60) F. Ohnesorge, W. M. Heckl, W. Häberle, D. Pum, M. Sara, H. Schindler, K. Schilcher, A. Kiener, D. P. Smith and U. B. Sleytr: "Scanning force microscopy studies of the S-layers from *Bacillus coagulans* E38-66, *Bacillus sphaericus* CCM2177 and of an antibody binding process," *Ultramicroscopy*, **42-44** (1992) 1236-1242.
 - 61) J. H. Hoh, R. Lal, S. A. John, J. P. Revel and M. F. Arnsdorf: "Atomic force microscopy and dissection of gap junctions," *Science*, **253** (1991) 1405-1408.
 - 62) F. A. Schabert and A. Engel: "Reproducible acquisition of *Escherichia coli* porin surface topographs by atomic force microscopy," *Biophys. J.*, **67** (1994) 2394-2403.
 - 63) D. J. Müller and A. Engel: "Voltage and pH-induced channel closure of porin OmpF visualized by atomic force microscopy," *J. Mol. Biol.*, **285** (1999) 1347-1351.
 - 64) T. Walz, P. Tittmann, K. H. Fuchs, D. J. Müller, B. L. Smith, P. Agre, H. Gross and A. Engel: "Surface topographies at subnanometer-resolution reveal asymmetry and sidedness of aquaporin-1," *J. Mol. Biol.*, **264** (1996) 907-918.
 - 65) D. J. Müller, F. A. Schabert, G. Büldt and A. Engel: "Imaging purple membranes in aqueous solutions at subnanometer resolution by atomic force microscopy," *Biophys. J.*, **68** (1995) 1681-1686.
 - 66) D. J. Müller, G. Büldt and A. Engel: "Force-induced conformational change of bacteriorhodopsin," *J. Mol. Biol.*, **249** (1995) 239-243.
 - 67) S. Kasas, N. H. Thomson, B. L. Smith, H. G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E. T. Kool, M. Kashlev and P. K. Hansma: "*Escherichia coli* RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy," *Biochemistry*, **36** (1997) 461-468.
 - 68) D. A. Erie, G. Yang, H. C. Schultz and C. Bustamante: "DNA bending by Cro protein in specific and nonspecific complexes: Implications for protein site recognition and specificity," *Science*, **266** (1994) 1562-1566.
 - 69) M. Bezanilla, B. Drake, E. Nudler, M. Kashlev, P. K. Hansma and H. G. Hansma: "Motion and enzymatic degradation of DNA in the atomic force microscope," *Biophys. J.*, **67** (1994) 2454-2459.
 - 70) C. Möller, M. Allen, V. Elings, A. Engel and D. J. Müller: "Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces," *Biophys. J.*, **77** (1999) 1150-1158.
 - 71) S. Scheuring and J. Sturgis: "Chromatic adaptation of photosynthetic membranes," *Science*, **309** (2005) 484-487.

- 72) S. Scheuring, R. P. Gonçalves, V. Prima and J. N. Sturgis: "The photosynthetic apparatus of *Rhodospseudomonas palustris*: Structures and organization," *J. Mol. Biol.*, **358** (2006) 83–96.
- 73) Ch. A. Bippes and D. J. Müller: "High-resolution atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins," *Rep. Prog. Phys.*, **74** (2011) 086601.
- 74) E. Evans and K. Ritchie: "Dynamic strength of molecular adhesion bonds," *Biophys. J.*, **72** (1997) 1541–1555.
- 75) C. B. Yuan, A. Chen, P. Kolb and V. T. Moy: "Energy landscape of streptavidin-biotin complexes measured by atomic force microscopy," *Biochemistry*, **39** (2000) 10219–10223.
- 76) M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez and H. E. Gaub: "Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM," *Science*, **276** (1997) 1109–1112.
- 77) J. M. Fernandez and H. B. Li: "Force-clamp spectroscopy monitors the folding trajectory of a single protein," *Science*, **303** (2004) 1674–1678.
- 78) R. E. Mahaffy, C. K. Shih, F. C. MacKintosh and J. Käs: "Scanning probe based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells," *Phys. Rev. Lett.*, **85** (2000) 880–883.
- 79) M. P. Stewart, J. Helenius, Y. Toyoda, S. P. Ramanathan, D. J. Muller and A. A. Hyman: "Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding," *Nature*, **469** (2012) 226–230.
- 80) S. C. Minne, J. D. Adams, G. Yaralioglu, S. R. Manalis, A. Atalar and C. F. Quate: "Centimeter scal atomic force microscope imaging and lithography," *Appl. Phys. Lett.*, **73** (1998) 1742–1744.
- 81) T. Sulchek, R. J. Grow, G. G. Yaralioglu, S. C. Minne, C. F. Quate, S. R. Manalis, A. Kiraz, A. Aydine and A. Atalar: "Parallel atomic force microscopy with optical interferometric detection," *Appl. Phys. Lett.*, **78** (2001) 1787–1789.
- 82) T. Sulchek, R. Hsieh, J. D. Adams, S. C. Minne, C. F. Quate and D. M. Adderton: "High-speed atomic force microscopy in liquid," *Rev. Sci. Instrum.*, **71** (2000) 2097–2099.
- 83) D. A. Walters, J. P. Cleveland, N. H. Thomson, P. K. Hansma, M. A. Wendman, G. Gurley and V. Elings: "Short cantilevers for atomic force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, **67** (1996) 3583–3590.
- 84) M. B. Viani, T. E. Schaffer, G. T. Palocz, L. I. Pietrasanta, B. L. Smith, J. B. Thompson, M. Richter, M. Rief, H. E. Gaub, K. W. Plaxco, A. N. Cleland, H. G. Hansma and P. K. Hansma: "Fast imaging and fast force spectroscopy of single biopolymers with a new atomic force microscope designed for small cantilevers," *Rev. Sci. Instrum.*, **70** (1999) 4300–4303.
- 85) M. B. Viani, L. I. Pietrasanta, J. B. Thompson, A. Chand, I. C. Gebeshuber, J. H. Kindt, M. Richter, H. G. Hansma and P. K. Hansma: "Probing protein-protein interactions in real time," *Nat. Struct. Biol.*, **7** (2000) 644–647.
- 86) N. Kodera, H. Yamashita and T. Ando: "Active damping of the scanner for high-speed atomic force microscopy," *Rev. Sci. Instrum.*, **76** (2005) 053708.
- 87) A. Dazzi, R. Prazeres, F. Glotin and J. M. Ortega: "Local infrared microspectroscopy with subwavelength spatial resolution with an atomic force microscope tip used as a photo-thermal sensor," *Opt. Lett.*, **30** (2005) 2388–2390.
- 88) K. Kjoller, J. Felts, D. Cook, C. B. Prater and W. P. King: "High-sensitivity nanometer-scale infrared spectroscopy using a contact mode microcantilever with an internal resonator," *Nanotechnology*, **21** (2010) 185705.
- 89) A. Gruverman, O. Kolosov, J. Hatano, K. Takahashi and H. Tokumoto: "Domain structure and polarization reversal in ferroelectrics studied by atomic force microscopy," *J. Vac. Sci. Technol. B*, **13** (1995) 1095–1099.
- 90) S. Sriram, M. Bhaskaran, K. T. Short, G. I. Matthews and A. S. Holland: "Thin film piezoelectric response characterisation using atomic force microscopy with standard contact mode imaging," *Micron*, **40** (2009) 109–113.
- 91) K. Yamanaka, H. Ogiso and O. Kolosov: "Analysis of subsurface imaging and effect of contact elasticity in the ultrasonic force microscopy," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **33** (1994) 3197–3203.
- 92) B. D. Huey: "AFM and Acoustics: Fast, quantitative nanomechanical mapping," *Annu. Rev. Mater. Res.*, **37** (2007) 351–385.
- 93) M. T. Cuberes, H. E. Assender, G. A. D. Briggs and O. V. Kolosov: "Heterodyne force microscopy of PMMA/rubber nanocomposites: Nanomapping of viscoelastic response at ultrasonic frequencies," *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **33** (2000) 2347–2355.
- 94) M. T. Cuberes: "Mechanical diode-based ultrasonic atomic force microscopies," *Applied Scanning Probe Methods XI: NanoScience and Technology*, eds. B. Bhushan and H. Fuchs (Springer, 2009) pp. 39–71.
- 95) G. Shekhawat, A. Srivastava, S. Avasthy and V. Dravid: "Ultrasound holography for noninvasive imaging of buried defects and interfaces for advanced interconnect architectures," *Appl. Phys. Lett.*, **95** (2009) 263101.
- 96) K.-B. Lee, S.-J. Park, C. A. Mirkin, J. C. Smith and M. Mrksich: "Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography," *Science*, **295** (2002) 1702–1705.
- 97) S. Myhra: "Tip-induced local anodic oxidation: Nanolithography and nanobiotechnology," *Nanobiotechnology*, **3** (2007) 212–222.
- 98) J. Zhang, H. P. Lang, F. Huber, A. Bietsch, W. Grange, U. Certa, R. Mckendry, H.-J. Güntherodt, M. Hegner and Ch. Gerber: "Rapid and label-free nanomechanical detection of biomarker transcripts in human RNA," *Nat. Nanotechnol.*, **1** (2006) 214–220.
- 99) J. Fritz, M. K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H.-J. Güntherodt, Ch. Gerber and J. K. Gimzewski: "Translating biomolecular recognition into nanomechanics," *Science*, **288** (2000) 316–318.
- 100) K. Kimura, S. Ido, N. Oyabu, K. Kobayashi, Y. Hirata, T. Imai and H. Yamada: "Visualizing water molecule distribution by atomic force microscopy," *J. Chem. Phys.*, **132** (2010) 194705.
- 101) H. Asakawa, K. Ikegami, M. Setou, N. Watanabe, M. Tsukada and T. Fukuma: "Submolecular-scale imaging of α -helices and C-terminal domains of tubulins by frequency modulation atomic force microscopy in liquid," *Biophys. J.*, **110** (2011) 1270–1276.

(2012年9月18日受理)