

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月7日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26289330

研究課題名(和文) 海洋ナノ微生物資源の高精度探査に向けた現場型AFM技術の開発

研究課題名(英文) The development of an underwater atomic force microscope for the precise observation of underwater microbes in seawater

研究代表者

西田 周平(NISHIDA, SHUHEI)

東京大学・生産技術研究所・特任講師

研究者番号：90463900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では深海中に存在する微小微生物をナノスケールで可視化するために、深海調査の現場環境で動作する海中原子間力顕微鏡の開発に成功した。海中原子間力顕微鏡は無人型海中探査機に搭載し、海洋調査船上から遠隔的に操作してナノスケール撮像を行なうことができる。海水中の観察試料は本研究で発明されたフィルタ付試料台を用いて遠隔的に固定する。また自己検知型カンチレバーをパリレンを用いて絶縁コーティングすることより、深海中の撮像が可能になった。本装置を用いて水深600～2,000mの深海中における撮像を実施し、大きさ約1 μ mの深海試料を数100nmの分解能で観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we have succeeded in developing an underwater atomic force microscope which can be operated in a deep sea environment in order to visualize microscopic microorganisms in deepwater with nanometer resolution. The underwater atomic force microscope is mounted on an remotely-operated underwater vehicle, and can be operated remotely from a reserach vessel to perform nanoscale imaging in deep sea. The observation samples in deepwater are remotely fixed using the sample holder equipped with a membrane filter, which have been invented in this project. The precise imaging in the deep sea was achieved by insulation coating of a self-sensitive cantilever with Parylene. The imaging was carried out in the deep sea at water depth from 600 to 2,000 m using this system. As a result, we have successfully achieved in-situ observation of a deep sea sample with a size of about 1 μ m with a resolution of several 100 nm.

研究分野：海洋ナノセンシング

キーワード：原子間力顕微鏡 走査型プローブ顕微鏡 海洋探査 現場計測 海洋ナノセンシング ナノテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

海洋における生態系や物質循環を正確に理解することは、海洋の環境保全や持続的資源利用のために重要な課題である。このためには海洋環境に関係する様々なパラメータ(水温・溶存成分・微生物量)を効率的かつ安定的に計測することにより、これらの時空間分布と相互作用を大規模に分析する必要がある。近年、海洋調査船や海中探査機に計測器を搭載し、現場環境でハイスループットに計測する技術が注目されている。しかし海洋微生物の種類・時空間分布・生物間相互作用・生物量については未知の部分が多く、高精度に可視化・定量化する技術が求められている。

2. 研究の目的

近年、海洋計測において海中サンプルを地上ラボに持ち帰ることなく、現場環境で計測する技術が着目されている。特にウイルス等のナノスケールの海洋微生物(海洋ナノ微生物)を現場環境で可視化・定量化する技術が必要とされており、これを実現する海洋計測プラットフォームの実現を本研究の目的とする。具体的には、ポータブルな海中原子間力顕微鏡(海中 AFM)、マイクロ流体デバイス等を用いた海中サンプルの採取・固定機構、海洋調査船または海中探査機に実装するためのロバストなプラットフォーム、を開発する。これらを融合した計測システムを用いて、実海域における海洋ナノ微生物の測定・評価を行う。浅海・深海において繰り返し観察や広域調査を行い、海洋ナノ微生物の種類、時空間分布、宿主生物や環境パラメータとの関連性を解明する。さらにバイオマスの予測と制御、海底資源探査など、海洋ナノ微生物に関わる重要課題の解決を目指す。

3. 研究の方法

課題 : 海中環境で安定的に動作する海中原子間力顕微鏡(海中 AFM)の開発

AFM を海洋調査船や海中探査機(ROV、AUV)に搭載するために、装置の小型化・軽量化・省電力化を図る。直径 100mm、長さ 250mm 程度の金属製圧力容器内に piezoelectric actuator・センサステージ・カンチレバー・ステージ移動機構などの AFM の中心機構が全て格納できるように設計を行う。AFM 最大の弱点である位置決めが難しく振動に弱い点を克服するために、光学系を排除して小型化・ロバスト化した自己検知型カンチレバー方式を用いる。一般に「自己検知型」は「光てこ型」は分解能が劣る傾向にあるが、検出回路に交流ブリッジを用いて、耐ノイズ性耐ドリフト性を高め、ナノオーダーの分解能を実現する。またシステム全体をパイレネ蒸着薄膜などの不導体保護膜で覆い、海水塩分による腐食や電気回路のショートに対応する。深海の高温高圧など過酷環境における測定に対応するため、駆動機構部の油浸機構

や金属密閉耐圧容器を開発し耐水耐圧化を図る。

課題 : サンプル採取・固定機構の開発

海水から採取し前処理で単離したサンプルをカンチレバー下部に配置・固定するための機構を開発する。このために AFM スキャナーには円筒型 piezoelectric actuator を使用する。特にマイクロ流体デバイス技術を利用して、AFM 探針先端に確実にサンプルを供給できるような流路機構を開発する。さらに連続的にサンプルを供給・除去することにより、海洋性ナノ微生物のハイスループットな観察を目指す。

原子間力顕微鏡で高分解能撮像を実現するためには観察試料は適切な方法で試料台表面に固定する必要がある。フローセルシステムで単に試料溶液を静置しただけでは十分に固定されない場合も予想される。また溶液中の試料濃度が低い場合、撮像の視野内に試料を探し出すことが困難な場合も予想される。このような場合、試料スキャナー先端に焼結製の試料台を固定し、メンブランフィルターによる濾過機構を取付ける。円筒型 piezoelectric actuator の内側からサンプル液を吸引することにより、観察試料の濃縮と固定を同時に行う。

課題 : 海洋調査船・海中探査機への実装技術開発

課題 および で開発した海中 AFM を、海洋調査船や海中探査機に実装してオンサイトで測定する場合、周辺環境からの音・振動が最大の障害になると考えられる。これを克服するため、空気バネ、コイルバネ・ダッシュポッド等を用いる、従来のパッシブな制音・制振に加えて、振動吸収性に優れたシリコーンゴムやゲルによる充填構造も検討する。さらに同振幅逆位相の制御音・制御振動を耐圧容器内に放射することや、海中探査機の姿勢制御情報を制震機構にフィードバックすること等による、アクティブな制音・制振も検討する。また母船との通信方法が制限されるため、探針試料アプローチ・撮像時の装置制御およびデータ取得をマイコン・FPGA 等を用いて自動化することにより装置をスタンドアロンで稼働させる。本課題では(独)海洋研究開発機構の海中探査機「ハイパードルフィン」および支援母船の海洋調査船「なつしま」を使用し、その運用についても同機構の支援を受ける。

課題 : 実海域における海洋ナノ微生物の測定・評価への展開

課題 ~ の成果による海中 AFM の基盤技術を実用化レベルに引き上げ、様々な海洋計測の現場におけるデータの取得を目指す。搭載する装置群の運用には(独)海洋研究開発機構の有する AUV、ROV、有人潜水船を積極的に活用する。海中から採取した試料を

搭載した AFM を用いその場で観察する。

探査領域は浅海・深海の両方で行い、特に海底熱水鉱床近傍における、ウイルスや生細胞などの生体試料を主たる観察対象とする。深海では光合成を行うことができないため、熱水域には硫化水素やメタンをエネルギー源にして生存する化学合成微生物が存在している。これら海中微生物やこれに寄生するウイルスの海中における微細構造をナノメートル領域で現場観察する。また微生物表面の力学的特性をフォースカーブ測定による粘弾性測定や周波数応答特性測定により明らかにする。これにより海中微生物の過酷環境下における微生物の形態保持機構の解明を目指す。海底微生物の生態系は二酸化炭素や硫化水素、水素など無機物濃度に依存すると考えられるので、現場型 CO₂ センサーや pH センサー等の計測・分析デバイスを取り付け同時計測することにより、生物情報だけではなく環境情報も多角的・総合的に解析する。

実海域探査は一度につき 1 週間～1 ヶ月を予定している。限られた割り当て時間のなかで可能な限りデータを収集するため、一度の潜航中に数 10 回の解析操作を行う予定である。試料採取・観察測定までを一度に短時間で行い、複数回解析操作を行うことで、取得データの信頼性向上を図る。また迅速測定より広い海域における調査を実施する。これによりウイルスなど海洋ナノ微生物の種類、時空間分布、宿主生物や環境パラメタとの関連性を解析する。

4. 研究成果

平成 26 年度は、1)海中探査機に搭載可能な現場型原子間力顕微鏡（海中 AFM）の開発、および 2)観察試料の採取・固定機構の開発を行った。

1)海中 AFM の開発においては、海中探査機の限られたペイロードに実装するために、装置の小型化・軽量化・省電力化を図った。小型の円筒型金属製容器内にピエゾスキャナー・カンチレバー・試料台・アプローチ機構等、海中 AFM の主要機構が全て格納できるように設計した。またカンチレバーの変位検出法として、光学系に依らない自己検知型カンチレバー方式を採用した。ここで自己検知型カンチレバーをパリレン薄膜でコートすることにより、撮像性能を保持しつつ海水塩分による腐食や電気回路の短絡を防止する手法を確立した。また深海の高圧環境における対応するため、駆動機構部の油浸機構や金属密閉耐圧容器を開発し耐水耐圧化を図った。本装置は国立研究開発法人海洋研究開発機構の「なつしま」および「ハイパードルフィン」を用いた調査航海において実海域試験を実施し、伊豆小笠原海域の熱水活動域においてカンチレバーの変位を安定的に計測することに成功した。

2)観察試料の採取・固定機構の開発において

は、メンブランフィルターによる濾過機構を備えた AFM 試料台を考案し、これを用いてピエゾスキャナーの内側から海水を吸引することにより、観察試料の濃縮と固定を同時に行うことに成功した。これにより、液中環境を保持したままの試料固定、遠隔的な観察試料の採取・固定、および懸濁液中の試料濃度が低い場合の観察試料の濃縮等、従来法では困難であった試料固定の課題を克服することに成功した。本機構を備えた海中 AFM は、東京大学臨海実験所周辺の油壺湾浅海域において動作試験を実施した。この結果、メンブランフィルタのポアを AFM 観察することに成功し、実海域においてナノメートルオーダーの微小構造が観察可能であることを確認した。

平成 27 年度は、前年度に開発した海中 AFM の実証試験を進め、1)海中 AFM の要素技術の高度化を行い、さらに 2)浅海および深海における実海域試験のための海洋調査船・海中探査機への実装技術開発を行った。1)海中 AFM の要素技術の高度化においては、まず自己検知型カンチレバーのパリレンによる絶縁コーティングにおいて、絶縁性能に偏りが出ないように処理条件を検討し、さらに均一なコーティングを達成した。つぎにメンブランフィルターによる濾過機構を備えた AFM 試料台の実証試験を進め、チューブスキャナーの内側から海水を吸引する際、海水が油漬容器内に漏出して電触を引き起こすことを防止するため、チューブスキャナーからの吸引法を改良することにより、より確実に観察試料を採取固定する手法を開発した。さらに、海中 AFM の制御システムとして、シングルボードコンピュータを用いた専用制御システムを新たに開発した。これにより、スキャン信号の生成、カンチレバー変位信号の取り込み、アプローチ動作、試料採取用ポンプの制御等、海中 AFM の動作を一元的に管理することに成功した。

2)実海域試験のための海洋調査船・海中探査機への実装技術開発においては、浅海と深海で試験装備が異なるため、個々に専用のプラットフォームを開発した。浅海試験においては海中 AFM を小型台座に固縛し、海洋調査船上から水深 50m までの海底に手動で設置する手法を開発した。海中 AFM は有線により船上から直接制御した。深海試験においては海洋研究開発機構の海中探査機「ハイパードルフィン」のペイロードに固縛して使用し、海洋調査船「なつしま」船上から、探針試料アプローチ・撮像時の装置制御およびデータ取得を遠隔的に実施した。この結果、沖縄トラフ水深約 2,000m の海域においてアプローチおよび撮像に成功し、ナノメートルスケールの画像を取得することに成功した。

平成 28 年度は、平成 27 年度までに開発した海中原子間力顕微鏡（海中 AFM）の実証

試験を引き続き実施し、1)海中 AFM の要素技術および海洋調査船・海中探査機への実装技術の高度化を行い、さらに2)実海域における海洋ナノ微生物の測定および評価手法の検討を行った。

1)海中 AFM の要素技術および海洋調査船・海中探査機への実装技術の高度化においては、まずメンブランフィルターによる観察試料の吸引濾過・固定機構が深海の圧力下で安定的に動作するよう、配管の小径化や短縮によるデッドボリウムの縮小化およびメンブランフィルター径の最適化を行った。また、自己検知型カンチレバーの変位検出を行うためのブリッジ回路を改良し低雑音化を図った。また海中 AFM を海中探査機へ実装技術として、免震ゲルおよびバネを組み合わせた振動抑制機構を考案した。これらの高度化により海中 AFM システムをより効率的かつ効果的に運用することに成功した。

2)実海域における海洋ナノ微生物の測定および評価手法の検討においては、平成 27 年度までの成果による海中 AFM の基盤技術を実用化レベルに引き上げ、浅海・深海両方を含む様々な海洋計測の現場においてデータの取得を行った。深海試験においては、国立研究開発法人海洋研究開発機構および海洋エンジニアリング株式会社の有する無人探査機を活用し、海中から採取した微小試料を搭載した海中 AFM を用いてその場で観察した。この結果、伊豆小笠原海域の水深約 600m の海底熱水活動近傍において、探針試料アプローチと安定的撮像に成功した。また浅海試験においては、鹿児島湾たぎり海域の海底熱水活動近傍において、水深 50m における海中 AFM 撮像を行い、安定的な運用に成功した。

研究最終年度となる平成 29 年度は、新規な海洋計測技術としてこれまで開発された、海中 AFM を積極的に活用し、様々な海洋計測の現場において積極的に撮像データの取得を行なった。本装置は、当初の目的である深海環境における微小生物試料を観察するために、シリアル有線通信を通じて遠隔操作が可能になり、特に(独)海洋研究開発機構の有する遠隔走査型無人潜水艇「ハイパードルフィン」に搭載されることを想定して、機器仕様の最適化を行なった。本年度は海中 AFM のユーザビリティ向上に力を入れ、自己検知型カンチレバーの交換方法の改良、新規低ノイズ化変位検出用ブリッジ回路による高感度化、深海微生物試料導入のための海水ポンプの改良を行なった。海中 AFM による実海域深海調査は、KS-17-J07C 調査航海(2017 年 5 月 19 日~23 日)において実施され、伊豆小笠原海域・水深約 450~600m の深海現場環境で海中 AFM による試料採取とナノスケール撮像が実施された。この結果、自己検知型カンチレバーの絶縁を保持しながら探針試料アプローチに成功し、さらに海水から採取したサンプルを、ナノメートルス

ケールの分解能で撮像することに成功した。撮像イメージではスキャン範囲(3 μ m x 3 μ m)中に海水由来と推定される大きさ 1 μ m x 1 μ m 程度の大きさの海中試料を確認することができた。さらに、水深 30m まで浅海における現場観察も可能にするため、海中 AFM のヘッド部分のみを手動で海中に投入するための浅海用機器仕様を開発し、海洋環境のみならず多様な水中環境で動作可能な様に改良を進めた。浅海仕様の海中 AFM による実海域調査は、鹿児島湾熱水活動サイト(たぎり海域)調査(2017 年 12 月 20 日・21 日)において実施され、海流などの影響を受けることなく、海中 AFM による安定的な観察・分析が実施可能なことが確認出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 11 件)

1) S. Nishida, N. Matsubara, and T. Fujii, "Underwater Atomic Force Microscope" Proceedings of The 24th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM24), 2016, Hawaii (USA)

2) 西田周平, 松原直貴, 藤井輝夫, "海中原子間力顕微鏡 - 深海における自己検知型カンチレバーの利用 -" 第 33 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2016 年 10 月 24 日, 長崎

3) S. Nishida, N. Matsubara and T. Fujii, "Underwater Atomic Force Microscope: Development and In situ Testing in Deep Sea" Proceedings of OCEANS 2016 Monterey, 2016, Monterey (USA)

4) S. Nishida, N. Matsubara, T. Fukuba, M. Kyo, T. Fujii, "Underwater Atomic Force Microscope: Instrumentation, Operation, and Measurement" Techno-Ocean 2016, 2016, Kobe (Japan)

5) S. Nishida, N. Matsubara, T. Fukuba, M. Kyo, T. Fujii, "Underwater Atomic Force Microscope for in-situ Nanoscale Imaging in Deep-sea" The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2016), 2016, Dublin (Ireland)

6) S. Nishida, N. Matsubara, T. Fukuba, M. Kyo, and T. Fujii "Underwater Atomic Force Microscope - Toward in situ nanoscale measurements in deep sea -"

Proceedings of OCEANS 2015 (CD-ROM),
2015, Washington DC, USA

7) 松原直貴, 西田周平, 福場辰洋, 木下晴之,
許正憲, 藤井輝夫: “深海微小試料の現場観
察に向けた海中原子間力顕微鏡の開発(第2
報) - パリレンコーティングを施した自己検
知型カンチレバーでの微小試料の撮像 - ”,
2015 年度精密工学会春季大会学術講演会講
演論文集, 東京(2015), pp.621-622

8) 松原直貴, 西田周平, 福場辰洋, 木下晴之,
許正憲, 藤井輝夫: “海中 AFM 用カンチレ
バーの深海における絶縁性実証実験”, プル
ーアース 2015 要旨集, 東京(2015),
pp.59-60

9) S. Nishida, N. Matsubara, T. Fukuba, K.
Okamura, K. Shitashima, M. Kyo, and T.
Fujii, “Underwater Atomic Force
Microscopy for in situ Observation of
Microorganisms in the Deep Sea”
Proceedings of International Symposium
on Underwater Technology 2015
(CD-ROM), UT15-171, 2015, Chennai,
India

10) 松原直貴, 西田周平, 福場辰洋, 木下晴
之, 許正憲, 藤井輝夫: “深海微小試料の現
場観察に向けた海中原子間力顕微鏡の開発”
2014 年度精密工学会秋季大会学術講演会講
演論文集, 鳥取(2014), pp.789-790.

11) T. Fukuba, T. Noguchi, K. Okamura, M.
Kyo, S. Nishida, T. Miwa, and T. Fujii,
“ATP Sensing in Deep-Sea Environments
Using Continuous Flow Microfluidic
Device” Proceedings of The 18th
International Conference on Miniaturized
Systems for Chemistry and Life Sciences
(μ TAS 2014), pp.1912-1914, 2014, Texas,
USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計1件)

名称: Specimen support and scanning probe

microscope
発明者: Shuhei Nishida, Teruo Fujii
権利者: The Foundation for the Promotion
of Industrial Science
種類: 特許
番号: US9746494B2
取得年月日: 2017-08-29
国内外の別: 国外

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田周平(NISHIDA, Shuhei)
東京大学・生産技術研究所・特任講師
研究者番号: 90463900

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()