

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-14832
(P2008-14832A)

(43) 公開日 平成20年1月24日(2008.1.24)

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
GO 1 R 29/24 (2006.01) GO 1 R 29/24 A
 GO 1 R 29/24 J

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2006-187105 (P2006-187105)	(71) 出願人	305060567 国立大学法人富山大学 富山県富山市五福3190
(22) 出願日	平成18年7月6日(2006.7.6)	(74) 代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
		(74) 代理人	100092657 弁理士 寺崎 史朗
		(74) 代理人	100132090 弁理士 飯塚 敬子
		(72) 発明者	篠原 寛明 富山県富山市五福3190 国立大学法人 富山大学内
		(72) 発明者	伊藤 研策 富山県富山市五福3190 国立大学法人 富山大学内

最終頁に続く

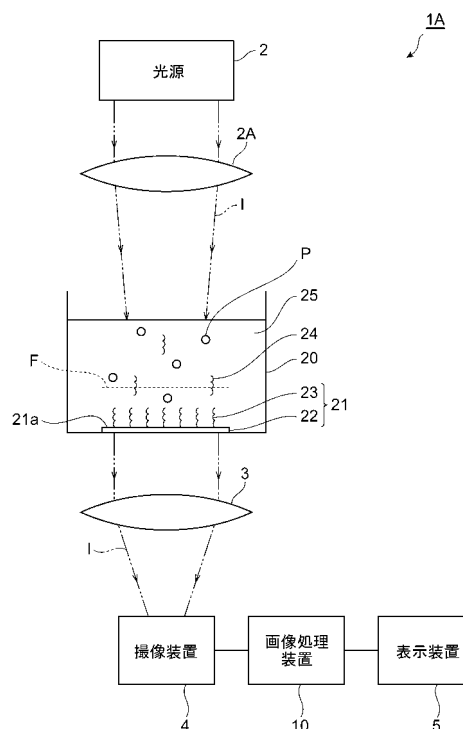
(54) 【発明の名称】 表面電荷量計測装置及び表面電荷量計測方法

(57) 【要約】

【課題】 試料の表面における電荷量を簡便に計測することが可能な表面電荷量計測装置及び表面電荷量計測方法を提供すること。

【解決手段】 表面上方を浮遊するプローブ粒子Pを用いて試料21の表面21aでの電荷量を計測する表面電荷量計測装置1Aであって、光源2と、プローブ粒子Pの像(プローブ像)を得る結像光学系3と、プローブ像を撮像してプローブ画像を得る撮像装置4と、プローブ画像からプローブ粒子Pの位置分布を取得し、当該位置分布から試料21の表面21aでの電荷量を計測する画像処理装置10とを備える。画像処理装置10は、予め格納されたプローブ画像におけるプローブ粒子Pの大きさを規定する値である直径とプローブ粒子Pの試料S表面からの距離との関係を示す校正データと撮像装置4によって撮像されたプローブ粒子Pの直径とに基づいて、プローブ粒子Pの位置分布を得る。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

荷電した複数のプローブ粒子を上方に浮遊させて荷電試料の表面での電荷量を計測する表面電荷量計測装置であって、

前記複数のプローブ粒子の位置分布を算出する位置分布算出手段と、

前記位置分布に基づいて前記試料表面での電荷量を算出する電荷量算出手段と、を備えることを特徴とする表面電荷量計測装置。

【請求項 2】

前記プローブ粒子の像を撮像して得られたプローブ画像に基づいて、前記試料の表面での前記電荷量を計測する請求項 1 記載の表面電荷量計測装置であって、

前記プローブ粒子の像を撮像して得られたプローブ画像における前記プローブ粒子の大きさを規定する測定値を求める大きさ規定値特定手段をさらに備え、

前記位置分布算出手段は、前記プローブ画像における前記プローブ粒子の大きさを規定する値と基準面からの前記プローブ粒子の距離との関係を示す校正データと、前記大きさ規定値特定手段で求められた前記測定値と、に基づいて、前記複数のプローブ粒子の前記位置分布を算出することを特徴とする表面電荷量計測装置。

10

【請求項 3】

光の強度を測定する強度測定手段をさらに備え、前記表面と交差する前記試料の第 1 の側面に斜めに入射光を入射させることにより前記試料の表面での前記電荷量を計測する請求項 1 記載の表面電荷量計測装置であって、

20

前記入射光は、前記試料表面において全反射しながら前記試料内を伝播した後、前記表面とは交差する前記試料の第 2 の側面から出射光として出射していくよう前記第 1 の側面に入射され、

前記位置分布算出手段は、前記入射光の強度と前記出射光の強度との強度差に基づいて、前記複数のプローブ粒子の前記位置分布を算出することを特徴とする表面電荷量計測装置。

【請求項 4】

前記プローブ粒子が球体であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 の何れか一項記載の表面電荷量計測装置。

【請求項 5】

30

前記試料は、荷電物質が前記表面に固定されることによって荷電されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 の何れか一項記載の表面電荷量計測装置。

【請求項 6】

荷電した複数のプローブ粒子を上方に浮遊させて荷電試料の表面での電荷量を計測する表面電荷量計測方法であって、

前記複数のプローブ粒子の位置分布を算出する位置分布算出ステップと、

前記位置分布に基づいて前記試料表面での電荷量を算出する電荷量算出ステップと、を備えることを特徴とする表面電荷量計測方法。

【請求項 7】

前記プローブ画像における前記プローブ粒子の大きさを規定する値と基準面からの前記

40

プローブ粒子の距離との関係を示す校正データを用意する校正データ準備ステップと、前記プローブ粒子の像を撮像して得られたプローブ画像における前記プローブ粒子の大きさを規定する測定値を求める大きさ規定値特定ステップと、をさらに備え、

前記位置分布算出ステップは、前記校正データと前記大きさ規定値特定手段で求められた前記測定値とに基づいて、前記複数のプローブ粒子の位置分布を算出することを特徴とする請求項 6 記載の表面電荷量計測方法。

【請求項 8】

前記試料表面で全反射しながら前記試料内を伝播する強度の測定された入射光を、前記表面と交差する前記試料の第 1 の側面に斜めに入射させる光入射ステップと、

前記入射光として入射し前記試料内を伝播した後、前記表面と交差する前記試料の第 2

50

の側面から出射する出射光の強度を測定する出射光強度測定ステップと、をさらに備え、前記位置分布算出ステップは、前記入射光の強度と前記出射光の強度との強度差に基づいて、前記複数のプローブ粒子の位置分布を算出することを特徴とする請求項6記載の表面電荷量計測方法。

【請求項9】

前記プローブ粒子が球体であることを特徴とする請求項6～8の何れか一項記載の表面電荷量計測方法。

【請求項10】

前記試料は、荷電物質が前記表面に固定されることによって荷電されることを特徴とする請求項6～9の何れか一項記載の表面電荷量計測方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、表面電荷量計測装置及び表面電荷量計測方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

従来、化学的反応や生物学的反応を検出する方法として、反応に伴う電気信号（例えば電位）の変化を検出する方法が知られている。例えば、特異性の高い生体分子について、当該生体分子と親和性の高い標的分子を検出する場合、この生体分子を半導体基板に固定し標的分子との結合を当該半導体基板から出力される電気信号の変化によって検出する方法が検討されている（特許文献1参照）。

20

【特許文献1】特開平10-332423号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明は、試料の表面における電荷量を簡便に計測することが可能な表面電荷量計測装置及び表面電荷量計測方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

ところで、検出の対象が電気信号だけでは、結合反応を検証するのに十分ではない。すなわち、例えば電位の変化等を検出できたとしても、それだけでは反応を定量的に分析することができず、さらには当該電位変化が実際に結合反応によってもたらされたものであることの実証もできない。

30

【0005】

通常、結合反応を特定するために、蛍光色素等で測定の対象物質を標識して直接観察されている。しかし、この場合標識操作が非常に煩雑になってしまうという問題があった。

【0006】

こうした問題に対し、本願発明者等は、基板等の表面における電荷量を測定することで、基板表面での生体反応等を特定することができる上、定量的な分析も可能となることを見出した。そこで、本願発明者等は生物学的反応あるいは化学的反応等についての分析のさらなる発展に貢献すべく、試料表面での電荷量を簡便に計測することができる装置及び方法について鋭意研究を重ねた結果、ついに本願発明に想到するに至った。

40

【0007】

かかる研究結果を踏まえ、本発明に係る表面電荷量計測装置は、荷電した複数のプローブ粒子を上方に浮遊させて荷電試料の表面での電荷量を計測する表面電荷量計測装置であって、複数のプローブ粒子の位置分布を算出する位置分布算出手段と、位置分布に基づいて試料表面での電荷量を算出する電荷量算出手段と、を備えることを特徴とする。

【0008】

上記の表面電荷量計測装置では、荷電された試料の表面上方に荷電プローブ粒子を分布させている。荷電されたプローブ粒子は、荷電された試料との間の静電的相互作用による

50

影響を受けて分布する。そのため、プローブ粒子の位置分布を求めることにより、荷電された試料表面の電荷量を算出することが可能となる。また、荷電されたプローブ粒子の位置分布を求めるだけであるため、簡便に且つ低コストで試料表面の電荷量を計測することが可能となる。また、試料表面上に液体あるいは気体が存在し当該液体等が流動している場合であっても、プローブ粒子は浮遊しているため、流動によって妨げられることなく試料表面での電荷量を計測することが可能となる。また、プローブ粒子の大きさを変えることで所望の分解能で電荷量を計測することが可能となる。

【 0 0 0 9 】

プローブ粒子の像を撮像して得られたプローブ画像に基づいて、試料の表面での電荷量を計測する上記の表面電荷量計測装置であって、プローブ粒子の像を撮像して得られたプローブ画像におけるプローブ粒子の大きさを規定する測定値を求める大きさ規定値特定手段をさらに備え、位置分布算出手段は、プローブ画像におけるプローブ粒子の大きさを規定する値と基準面からのプローブ粒子の距離との関係を示す校正データと、大きさ規定値特定手段で求められた測定値と、に基づいて、複数のプローブ粒子の位置分布を算出することが好ましい。

10

【 0 0 1 0 】

この表面電荷量計測装置では、プローブ画像における各プローブ粒子の大きさを規定する測定値さえ求められればそのプローブ粒子の位置分布が算出できる。そのため、プローブ画像に撮像されたプローブ粒子の数が複数であっても、当該撮像された複数のプローブ粒子の位置分布を算出することが可能であり、表面での電荷量の計測に要する時間を短縮することが可能となる。

20

【 0 0 1 1 】

あるいは、光の強度を測定する強度測定手段をさらに備え、表面と交差する試料の第1の側面に斜めに入射光を入射させることにより試料の表面での電荷量を計測する上記の表面電荷量計測装置であって、入射光は、試料表面において全反射しながら試料内を伝播した後、表面とは交差する試料の第2の側面から出射光として出射していくよう第1の側面に入射され、位置分布算出手段は、入射光の強度と出射光の強度との強度差に基づいて、複数のプローブ粒子の位置分布を算出することが好ましい。

【 0 0 1 2 】

この表面電荷量計測装置では、入射光が表面において全反射しながら試料内を伝播するため、試料表面近傍の試料外側にエバネッセント光が浸透する。エバネッセント光の強度 E は、界面（試料表面）での光強度を E_0 とすると、式（1）で表される。

30

【 数 1 】

$$E = E_0 \cdot \exp\left(-\frac{X}{dp}\right) \quad \dots (1)$$

X : 界面からの距離

dp : エバネッセント光の強度が界面での強度の $1/e$ になるときの界面からの距離

40

【 0 0 1 3 】

式（1）から理解されるように、エバネッセント光の強度 E は、界面から離れるにしたがって指数関数的に減衰する。エバネッセント光の到達距離 dp は略波長オーダーとされ、以下の式（2）で表される。

【 数 2 】

$$dp = \frac{\lambda}{2\pi \cdot n_1 \left(\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right)^{\frac{1}{2}}} \quad \dots (2)$$

50

- : 入射光の波長
- n_1 : 試料の屈折率
- n_2 : 試料と界面で接する媒質の屈折率
- : 試料表面の法線に対する入射光の角度

【0014】

例えば、波長400nmの光を入射光とし、石英ガラス($n_1 = 1.47$)を試料として用い、水($n_2 = 1.33$)を試料と界面で接する媒質として用意し、試料表面の法線に対する入射光の角度を 70° (試料内では 66.8° を用いる。)を用いた場合、式(2)から約270nmがエバネッセント光の到達距離 d_p として得られる。実際に、吸収に寄与するエバネッセント光の最高到達距離は $3d_p$ とされているので、光の吸収は約810nmまで起こると考えられる。上記の表面電荷量計測装置は、このエバネッセント光を用いてプローブ粒子の位置分布を算出するため、非常に小さいスケールで試料表面を計測することができる。また、通常、荷電された抗体蛋白質を試料表面に固定化した場合、標的抗原の検出及びその定量分析が可能となる。

10

【0015】

プローブ粒子が球体であることが好ましい。この場合、プローブ粒子の扱いが容易となるため、上記表面電荷量計測装置はより一層簡便に試料表面での電荷量を計測することが可能となる。

20

【0016】

試料は、荷電物質が表面に固定されることによって荷電されることが好ましい。例えば荷電されたDNA分子が試料の表面に固定された場合、標的分子の検出だけでなく結合反応の定量的な分析も可能となる。

【0017】

一方、本発明に係る表面電荷量計測方法は、荷電した複数のプローブ粒子を上方に浮遊させて荷電試料の表面での電荷量を計測する表面電荷量計測方法であって、複数のプローブ粒子の位置分布を算出する位置分布算出ステップと、位置分布に基づいて試料表面での電荷量を算出する電荷量算出ステップと、を備えることを特徴とする。

【0018】

上記の表面電荷量計測方法では、荷電された試料の表面上方に荷電プローブ粒子を分布させている。荷電されたプローブ粒子は、荷電された試料との間の静電的相互作用による影響を受けて分布する。そのため、プローブ粒子の位置分布を求めることにより、荷電された試料表面の電荷量を算出することが可能となる。また、荷電されたプローブ粒子の位置分布を求めるだけであるため、簡便に且つ低コストで試料表面の電荷量を計測することが可能となる。また、試料表面上に液体あるいは気体が存在し当該液体等が流動している場合であっても、プローブ粒子は浮遊しているため、流動によって妨げられることなく試料表面での電荷量を計測することが可能となる。また、プローブ粒子の大きさを変えることで所望の分解能で電荷量を計測することが可能となる。

30

【0019】

プローブ画像におけるプローブ粒子の大きさを規定する値と基準面からのプローブ粒子の距離との関係を示す校正データを用意する校正データ準備ステップと、プローブ粒子の像を撮像して得られたプローブ画像におけるプローブ粒子の大きさを規定する測定値を求める大きさ規定値特定ステップと、をさらに備え、位置分布算出ステップは、校正データと大きさ規定値特定手段で求められた測定値とに基づいて、複数のプローブ粒子の位置分布を算出することが好ましい。

40

【0020】

上記表面電荷量計測方法では、プローブ画像における各プローブ粒子の大きさを規定する測定値さえ求められればそのプローブ粒子の位置分布が算出できる。そのため、プローブ画像に撮像されたプローブ粒子の数が複数であっても、当該撮像された複数のプローブ

50

粒子の位置分布を算出することが可能であり、表面での電荷量の計測に要する時間を短縮することが可能となる。

【0021】

あるいは、試料表面で全反射しながら試料内を伝播する強度の測定された入射光を、表面と交差する試料の第1の側面に斜めに入射させる光入射ステップと、入射光として入射し試料内を伝播した後、表面と交差する試料の第2の側面から出射する出射光の強度を測定する出射光強度測定ステップと、をさらに備え、位置分布算出ステップは、入射光の強度と出射光の強度との強度差に基づいて、複数のプローブ粒子の位置分布を算出することが好ましい。

【0022】

上記表面電荷量計測方法では、入射光が表面において全反射しながら試料内を伝播するため、試料表面近傍の試料外側にエバネッセント光が浸透する。上記の表面電荷量計測方法は、このエバネッセント光を用いてプローブ粒子の位置分布を算出するため、非常に小さいスケールで試料表面を計測することができる。

【0023】

プローブ粒子が球体であることが好ましい。この場合、プローブ粒子の扱いが容易となるため、上記表面電荷量計測方法はより一層簡便に試料表面での電荷量を計測することが可能となる。

【0024】

試料は、荷電物質が表面に固定されることによって荷電されることが好ましい。例えば荷電されたDNA分子が試料の表面に固定された場合、標的分子の検出だけでなく結合反応の定量的な分析も可能となる。

【発明の効果】

【0025】

本発明によれば、試料の表面における電荷量を簡便に計測することが可能な表面電荷量計測装置及び表面電荷量計測方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

以下、添付図面を参照して、好適な実施形態について詳細に説明する。なお、説明において、同一要素又は同一機能を有する要素には、同一符号を用いることとし、重複する説明は省略する。

【0027】

(第1実施形態)

図1は第1実施形態に係る表面電荷量計測装置1Aの構成を示す図である。図1に示すように表面電荷量計測装置1Aは、光源2と、水槽20と、結像光学系(結像手段)3と、撮像装置(撮像手段)4と、画像処理装置(画像処理手段)10と、表示装置(表示手段)5とを備える。表面電荷量計測装置1Aは、透明な基板22と、当該透明基板22の表面に固定された固定化DNA分子23とで構成される試料21の表面21aの電荷量を計測する。

【0028】

水槽20は、一面が開口した透明材質からなる容器である。水槽20内には、例えば純水25が満たされている。水槽20の底面上には、試料21が、固定化DNA分子23が固定されていない面が水槽20の底面と接するように載置されている。水槽20内では、試料21の表面21a上方において球体のプローブ粒子Pが複数浮遊している。必要に応じて、検出DNA分子24も水槽20内に浮遊させてもよい。プローブ粒子Pとして例えば、径が約1 μ mのポリスチレンラテックス微粒子を用いる。試料21、検出DNA分子24、及びプローブ粒子Pは、同符号で荷電している。試料21は、荷電物質である固定化DNA分子23がその表面に固定されることによって荷電する。

【0029】

光源2は、水槽20の上方に、すなわち水槽20の試料21が載置されている底面とは

10

20

30

40

50

反対側に位置する。光源 2 は、試料 2 1 及びプローブ粒子 P を照射する光 1 を出力する。表面電荷量計測装置 1 A は、光源 2 に対してさらに集光レンズ 2 A を備えている。集光レンズ 2 A は、光源 2 から出力された光 1 を集光して、水槽 2 0 内に入射させる。

【0030】

結像光学系 3 は、水槽 2 0 の下方に、すなわち水槽 2 0 の底面側に位置する。結像光学系 3 は、光源 2 から出力された光 1 によって照射されたプローブ粒子 P の像（プローブ像）を撮像装置 4 の受光面上に結ぶ。試料 2 1 は後述の結像光学系 3 の焦点面 F とは一致せず、本実施形態では試料 2 1 は結像光学系 3 の焦点面 F が水槽 2 0 内に位置するように配置される。

【0031】

撮像装置 4 は、結像光学系 3 によって結像されたプローブ像を撮像する CCD カメラである。撮像装置 4 は、プローブ像を撮像して得られたプローブ画像を画像処理装置 1 0 に出力する。

【0032】

画像処理装置 1 0 は、撮像されたプローブ画像を撮像装置 4 から入力する。画像処理装置 1 0 は、撮像装置 4 から出力されたプローブ画像からプローブ粒子 P の位置分布を算出し、当該位置分布から試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量を算出する。画像処理装置 1 0 は、算出した試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量を表示装置 5 へ出力する。なお、画像処理装置 1 0 は、必要に応じてプローブ画像も表示装置 5 へ出力してもよい。

【0033】

表示装置 5 は、画像処理装置 1 0 から入力された試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量あるいはプローブ画像を表示する。この表示装置 5 としては、例えば、CRT モニタや、液晶ディスプレイなどを用いることができる。

【0034】

次に、図 2 を参照して画像処理装置 1 0 の機能について説明する。図 2 に示すように、画像処理装置 1 0 は、校正データ格納部 1 1 と、大きさ規定値特定部 1 2 と、位置分布算出部 1 3 と、電荷量算出部 1 4 とを有する。

【0035】

校正データ格納部 1 1 には、プローブ画像におけるプローブ粒子 P の大きさを規定する値とプローブ粒子 P の試料 2 1 の表面 2 1 a からの距離との関係を示す校正データが格納されている。本実施形態ではプローブ粒子 P は球体であるため、プローブ粒子 P の大きさを規定する値を、画像上におけるプローブ粒子 P の直径とする。

【0036】

図 3 に校正データによって得られるグラフを示す。図 3 のグラフの横軸は試料 2 1 の表面 2 1 a に直交する方向（以下、z 方向という）での結像光学系 3 の焦点面 F からの距離 Z (μm) を表し、縦軸はプローブ画像におけるプローブ粒子 P の直径の大きさ d (μm) を表す。結像光学系 3 の焦点面 F は、プローブ粒子の位置を特定するための基準面として機能する。図 3 のグラフにおける円は実際の測定データを表し、曲線はこれらの測定データに対してフィッティングを行った結果である。校正データ格納部 1 1 は、例えばフィッティングによって得られた関係式を校正データとして格納する。あるいは、校正データ格納部 1 1 は、例えば実際の測定データを校正データとして格納する。図 4 に、校正データ格納部 1 1 が実際の測定データを校正データとして格納する場合における校正データの表を示す。

【0037】

試料 2 1 の表面 2 1 a からの結像光学系 3 の焦点面 F の位置は既知である。したがって図 3 のグラフから理解されるように、校正データによれば、プローブ粒子 P の直径の大きさ d を得ることによって、試料 2 1 の表面 2 1 a からのプローブ粒子 P の距離 Z を求めることができる。ここで、焦点面 F からそれぞれ距離 Z_0 、 Z_1 、 Z_2 だけ離れているプローブ粒子 P_0 、 P_1 、 P_2 の、距離 Z_0 、 Z_1 、 Z_2 とプローブ画像における直径 d_0 、 d_1 、 d_2 との関係の説明する。説明に際し、図 5~6 を参照する。

10

20

30

40

50

【0038】

図5は、プローブ粒子 P_0 、 P_1 、 P_2 と焦点面 F との関係を説明するための図である。図5に示されているように、プローブ粒子 P_0 は焦点面 F に位置し、焦点面 F から Z_0 ($Z_0 = 0$)だけ離れている。プローブ粒子 P_1 は焦点面 F に対し Z_1 ($< Z_0$)の位置にある。プローブ粒子 P_2 は焦点面 F に対し Z_2 ($> Z_0$)の位置にある。

【0039】

図6は、撮像されたプローブ画像におけるプローブ粒子 P_0 、 P_1 、 P_2 の画像である。図6(a)はプローブ粒子 P_0 の、図6(b)はプローブ粒子 P_1 の、図6(c)はプローブ粒子 P_2 の画像である。図6に示されるように、焦点面 F に位置するプローブ粒子 P_0 の画像(図6(b))における円の大きさ(直径の大きさ)は、他のプローブ粒子 P_1 、 P_2 の画像(図6(a)、(c))における円(直径)に比べて小さくなる。図6(a)に示された二点鎖線 T_2 、図6(b)に示された二点鎖線 T_0 、図6(c)に示された二点鎖線 T_1 はそれぞれプローブ画像におけるプローブ粒子の中心点を通り、各プローブ粒子の画像を横断する線である。また、図6(a)に示された直径 d_{12} 、図6(b)に示された直径 d_{10} 、図6(c)に示された直径 d_{11} はそれぞれプローブ画像におけるプローブ粒子の白い輪で表される像の直径である。図6(a)に示された直径 d_{22} 、図6(b)に示された直径 d_{20} 、図6(c)に示された直径 d_{21} はそれぞれプローブ画像におけるプローブ粒子の黒い輪で表される像の直径である。

10

【0040】

図7は、プローブ画像における各プローブ粒子 P_0 、 P_1 、 P_2 の強度を示すグラフである。図7(a)はプローブ粒子 P_0 の、図7(b)はプローブ粒子 P_1 の、図7(c)はプローブ粒子 P_2 のグラフである。各グラフの横軸は図6(a)、(b)、(c)に示された横断線 T_2 、 T_0 、 T_1 上の位置 T 、縦軸はプローブ画像における強度 $I(T)$ を表す。各グラフにおける強度 I_0 は、背景画像の平均強度に相当する。プローブ画像における各プローブ粒子 P_0 、 P_1 、 P_2 の直径 d_0 、 d_1 、 d_2 は、例えば各横断線上であって画像上のプローブ粒子の円内に位置する強度 $I(T)$ の0次のピーク(凸部)の両脇にある1次のピーク(凸部)の頂点間の距離(図6(a)~(c)の各画像における白い輪の直径) d_{10} 、 d_{11} 、 d_{12} とする。あるいは、プローブ画像における各プローブ粒子 P_0 、 P_1 、 P_2 の直径 d_0 、 d_1 、 d_2 は、例えば各横断線上であって画像上のプローブ粒子の円内に位置する強度 $I(T)$ の0次のピーク(凸部)の両脇にある凹部の頂点間の距離(図6(a)~(c)の各画像における黒い輪の直径) d_{20} 、 d_{21} 、 d_{22} であってもよい。

20

30

【0041】

また、0次のピークの強度が平均強度 I_0 より小さい場合というのはプローブ粒子が焦点面 F より上に位置することを意味する。一方、0次のピークの強度 $I(T=0)$ が平均強度 I_0 より大きい場合というのはプローブ粒子が焦点面 F より下に位置することを意味する。したがって、図7(a)~(c)より、プローブ粒子 P_2 が焦点面 F より上に位置し、プローブ粒子 P_0 、 P_1 が焦点面 F より下に位置することが示される。

【0042】

再び図2を参照して画像情報処理装置10の機能についての説明を続ける。大きさ規定値特定部12は、撮像されたプローブ画像を撮像装置4から入力し、プローブ画像における複数のプローブ粒子 P それぞれの大きさを規定する値の測定値である直径 d を求める。すなわち、直径 d は、図6に示したような画像に基づいて得られるグラフ(図7参照)に基づき、1次ピーク間の距離として求められる。大きさ規定値特定部12は、直径 d を位置分布算出部13に出力する。

40

【0043】

位置分布算出部13は、大きさ規定値特定部12からプローブ粒子 P の直径 d を入力する。位置分布算出部13は、校正データ格納部11に格納された校正データとプローブ粒子 P の直径 d とに基づいて、試料21の表面21aからのプローブ粒子 P の位置情報を算出する。すなわち、位置分布算出部13は、校正データ格納部11から得た図3に示す校

50

正データに基づき、大きさ規定値特定部 1 2 で求められたプローブ粒子 P の直径の大きさが d の時の焦点面 F からの距離（位置情報）Z を求める。また、焦点面 F の試料 2 1 の表面 2 1 a からの距離を Z F とすると、Z F は既知であるから、位置分布算出部 1 3 は必要に応じて、Z F をこうして求められた Z に加えることにより試料 2 1 の表面 2 1 a からのプローブ粒子 P の距離 Z P を算出する。

【 0 0 4 4 】

位置分布算出部 1 3 は、2次元のプローブ画像から各プローブ粒子の当該2次元上、すなわち試料 2 1 の表面 2 1 a に投影させた2次元座標（x、y）を得る。そして、位置分布算出部 1 3 は焦点面 F からの距離に基づき、所望の位置を原点にとり、各プローブ粒子 P の3次元座標（x、y、z）（例えば、z = Z、あるいは z = Z P）を得る。

10

【 0 0 4 5 】

位置分布算出部 1 3 は、複数のプローブ粒子 P の3次元座標（x、y、z）から試料 2 1 の表面 2 1 a 上方を浮遊している複数のプローブ粒子 P の位置分布 n（x、y、z）を求める。本実施形態における位置分布 n（x、y、z）は、試料 2 1 の表面 2 1 a 上方であって、座標（x、y、z）の位置におけるプローブ粒子 P の個数の分布を表す関数であり、式（3）で表される。

【 数 3 】

$$\frac{n(x, y, z)}{n_0} = \exp\left\{-\frac{A \cdot \phi(x, y, z)}{kT}\right\} \quad \dots (3)$$

20

A：定数

（x、y、z）：静電的相互作用

n₀：（x、y、z）= 0 におけるプローブ粒子の個数（z が十分に大きいときに成立）

k：Boltzmann定数

T：絶対温度

【 0 0 4 6 】

位置分布算出部 1 3 は、こうして得た各プローブ粒子 P の位置分布である位置分布 n（x、y、z）を電荷量算出部 1 4 に出力する。

30

【 0 0 4 7 】

電荷量算出部 1 4 は、位置分布算出部 1 3 からプローブ粒子 P の位置分布 n（x、y、z）を入力する。電荷量算出部 1 4 は、プローブ粒子 P の位置分布に基づき、式（3）からプローブ粒子 P と試料 2 1 の表面 2 1 a との間の静電的相互作用（x、y、z）を求める。

【 0 0 4 8 】

電荷量算出部 1 4 は、式（3）から求めた静電的相互作用に基づいて、試料 2 1 の表面 2 1 a での表面電位を（4）式により求める。

【 数 4 】

$$\phi(x, y, z) = a \cdot \varepsilon \cdot \varphi_1 \cdot \varphi_2(x, y) \cdot \ln[1 + \exp\{-2 \cdot \kappa \cdot (z - a)\}] \quad \dots (4)$$

φ₁：プローブ粒子の表面電位φ₂（x、y）：試料の表面電位

a：プローブ粒子の半径

ε：媒質（本実施形態においては、純水）の誘電率

κ：Debye パラメータ

40

【 0 0 4 9 】

電荷量算出部 1 4 は、さらに、式 (4) から求めた試料 2 1 の表面電位に基づいて、試料 2 1 の表面 2 1 a での単位面積当たりの電荷量を (5) 式により求める。

【 数 5 】

$$\sigma = \varepsilon \cdot \kappa \cdot \varphi_2 (x, y) \quad \dots (5)$$

【 0 0 5 0 】

次に、図 8 及び図 9 を参照して、本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 A を用いる表面電荷量計測方法について説明し、併せて表面電荷量計測装置 1 A の動作についても説明する。図 8 は、表面電荷量計測方法の手順を示す図である。

【 0 0 5 1 】

まず、撮像装置 4 によって撮像された画像におけるプローブ粒子 P の大きさを規定する値である直径 d と、基準面である結像光学系 3 の焦点面 F からのプローブ粒子 P の距離 Z との関係を示す校正データ (図 3 及び図 4 参照) を用意する (校正データ準備ステップ S 0 1) 。図 9 は、校正データを求めることについて説明するための図である。校正データは以下の手順で取得される。

【 0 0 5 2 】

すなわち、図 9 に示されるように、2 枚のカバーガラス G 1、G 2 の間に挟まれたプローブ粒子 P を z 方向に移動する。すなわち、焦点面 F と一致する場合を基準 (Z = 0) とし、当該基準に対して上下方向 (Z < 0、Z > 0) にカバーガラス G 1、G 2 に挟まれたプローブ粒子 P を移動する。その際、各位置でのプローブ粒子 P のプローブ像が撮像装置 4 によって撮像され、プローブ画像におけるプローブ粒子 P の直径 d が求められる。こうして、焦点面 F からの距離 Z に対するプローブ画像におけるプローブ粒子 P の直径 d が求められ、校正データが得られる。得られた校正データは、画像処理装置 1 0 の校正データ格納部 1 1 に格納される。

【 0 0 5 3 】

再び図 8 に戻って、表面電荷量計測方法について説明を続ける。次に、基板 2 2 の一方の表面に固定化 DNA 分子 2 3 を固定して試料 2 1 を用意する。固定化 DNA 分子 2 3 は荷電しているため、固定化 DNA 分子 2 3 が基板 2 2 表面に固定されることによって試料 2 1 は荷電される。

【 0 0 5 4 】

さらに、純水 2 5 で満たされた水槽 2 0 を用意し、固定化 DNA 分子 2 3 が固定された表面と反対側の面が水槽 2 0 の底面と接するように、試料 2 1 を水槽 2 0 の底面上に載置する。試料 2 1 を水槽 2 0 内に入れた後、複数の荷電されたプローブ粒子 P を水槽 2 0 の純水 2 5 内に浮遊させる。これにより、試料 2 1 の表面 2 1 a 上方をプローブ粒子 P が浮遊するように、試料 2 1 及びプローブ粒子 P が配置される (プローブ粒子準備ステップ S 0 2) 。また、必要に応じて、水槽 2 0 内に検出 DNA 分子 2 4 を浮遊させてもよい。

【 0 0 5 5 】

続いて、結像光学系 3 によって結ばれた複数のプローブ粒子 P の像が、撮像装置 4 によって撮像される (撮像ステップ S 0 3) 。プローブ画像には様々な位置座標を有する複数のプローブ粒子 P が撮像されていてもよい。撮像されたプローブ画像は、撮像装置 4 から画像処理装置 1 0 の大きさ規定値特定部 1 2 へ出力される。

【 0 0 5 6 】

プローブ画像が入力された大きさ規定値特定部 1 2 では、撮像装置 4 で撮像されたプローブ画像におけるプローブ粒子 P の大きさを規定する測定値である直径 d が求められる (大きさ規定値特定ステップ S 0 4) 。複数のプローブ粒子 P が撮像されている場合には、それらについての直径 d が求められる。こうして求められた直径の大きさ d は、大きさ規

10

20

30

40

50

定値特定部 1 2 から位置分布算出部 1 3 へ出力される。

【 0 0 5 7 】

直径 d が入力された位置分布算出部 1 3 では、校正データ格納部 1 1 に格納された校正データと、大きさ規定値特定ステップ $S 0 4$ で求められたプローブ粒子 P の直径 d と、に基づいて、基準面である焦点面 F からのプローブ粒子 P の 3 次元座標 (x, y, z) が算出される。位置算出部 1 3 は、こうして求められた各プローブ粒子 P の 3 次元座標 (x, y, z) に基づいて、プローブ粒子 P の個数分布である位置分布 $n(x, y, z)$ を算出する (位置分布算出ステップ $S 0 5$)。こうして求められた各プローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ は、位置分布算出部 1 3 から電荷量算出部 1 4 へ出力される。

【 0 0 5 8 】

プローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ が入力された電荷量算出部 1 4 では、位置分布 $n(x, y, z)$ に基づいて試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量が算出される (電荷量算出ステップ $S 0 6$)。電荷量算出部 1 4 では、プローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ から、式 (3) によりプローブ粒子 P と試料 2 1 の表面 2 1 a との間の静電的相互作用 (x, y, z) が算出される。さらに、静電的相互作用 (x, y, z) から、式 (4) により試料 2 1 の表面 2 1 a での表面電位が算出される。さらに、表面 2 1 a での表面電位から、式 (5) により、試料 2 1 の表面 2 1 a の単位面積当たりの電荷量が算出され、表面 2 1 a での電荷量が算出される。

【 0 0 5 9 】

本実施形態に係る電荷量算出装置 1 A 及び電荷量算出方法では、こうして水槽 2 0 内に複数のプローブ粒子 P が浮遊しているときの固定化 DNA 分子 2 3 が固定された基板 2 2 から構成される試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量が算出される。

【 0 0 6 0 】

次いで、例えば固定化 DNA 分子 2 3 と相補的な親和性を有する DNA 分子の検出する場合には、この計測系での校正データは既に取り得られているため、校正データ準備ステップ $S 0 1$ を省略することができる。そして、水槽 2 0 内の溶液を廃棄し、上述のプローブ粒子準備ステップ $S 0 2$ ~ 電荷量算出ステップ $S 0 6$ を繰り返す。すなわち、まず再度試料 2 1 を底面に載置し、水槽 2 0 内を純水 2 5 で満たす。その後、水槽 2 0 内に先ほどと同数のプローブ粒子 P 及び検出 DNA 分子 2 4 を浮遊させ (プローブ粒子準備ステップ $S 0 2$)、撮像ステップ $S 0 3$ 、大きさ既定値特定ステップ $S 0 4$ 、位置分布算出ステップ $S 0 5$ 、及び電荷量算出ステップ $S 0 6$ を実行する。こうしてプローブ粒子準備ステップ $S 0 2$ ~ 電荷量算出ステップ $S 0 6$ を繰り返すことにより、様々な DNA 分子の検出を行うことができる。

【 0 0 6 1 】

本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 A 及び表面電荷量計測方法では、プローブ粒子 P 及び試料 2 1 はいずれも荷電しており、互いに静電的相互作用を及ぼし合っている。したがって、プローブ粒子 P はこの静電的相互作用の影響を受けて分布することとなり、プローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ を求めることで、電荷量算出部 1 4 では、試料 2 1 の表面 2 1 a 電位を求めることが可能となる (式 (3) 及び (4) 参照)。電荷量算出部 1 4 ではさらに、式 (5) から、表面電位に基づき試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量を算出することができる。このように、本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 A 及び表面電荷量計測方法では、プローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ から試料 2 1 の表面 2 1 での電荷量を算出することが可能となる。

【 0 0 6 2 】

また、試料 2 1 表面での電荷量が計測可能である本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 B 及び表面電荷量計測方法は、バイオセンシング分野への応用において非常に有用であると考えられる。

【 0 0 6 3 】

すなわち、試料 2 1 の基板 2 2 に固定された固定化 DNA 分子 2 3 と検出 DNA 分子 2 4 とが結合した場合、当該結合により試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量が変化する。これ

10

20

30

40

50

に伴い、結合箇所における試料 2 1 の表面電位も変化する。そのため、固定化 DNA 分子 2 3 と検出 DNA 分子 2 4 とが結合されている箇所の上方では、結合していない場合に比べプローブ粒子 P が試料 2 1 から遠ざかる方向に移動する。したがって、結合が起こっている場合と起こっていない場合とでは、プローブ粒子 P の位置分布が変化し、電荷量にも変化が現れる。その結果、プローブ粒子 P のみであって検出 DNA 分子 2 4 が水槽 2 0 内に浮遊していない場合における試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量と、プローブ粒子及び検出 DNA 分子 2 4 が水槽 2 0 内に浮遊している場合における試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量とを比較検討することで反応を特定でき、さらには反応を定量的に分析することが可能となる。

【 0 0 6 4 】

特に、本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 B 及び表面電荷量計測方法では、プローブ粒子準備ステップ S 0 2 ~ 電荷量算出ステップ S 0 6 を繰り返すことで、検出 DNA 分子 2 4 が水槽 2 0 内に浮遊していない場合における試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量、及び検出 DNA 分子 2 4 が水槽 2 0 内に浮遊している場合における試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量をそれぞれ非常に簡単に計測することができる。そのため、本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 A 及び表面電荷量計測方法では、非常に簡便な方法で反応を特定でき、且つ定量的に分析することが可能となる。

【 0 0 6 5 】

このように、本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 A 及び表面電荷量計測方法で計測しているのは、試料 2 1 の表面 2 1 a における電気信号（例えば、電位等）ではなく、電荷量である。そのため、試料 2 1 の表面 2 1 a において固定化 DNA 分子 2 3 と検出 DNA 分子 2 4 とが結合したことを特定することが可能となる。さらに、結合反応によって得られる電荷量を特定することもでき、これにより反応についての定量的な分析も可能となる。そのため、本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 A 及び表面電荷量計測方法は、バイオセンシング分野への応用において非常に有用である。

【 0 0 6 6 】

また、本実施形態では荷電されたプローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ を求めるだけで電荷量が計測される。そのため、本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 A 及び表面電荷量計測方法では、簡便且つ低コストで電荷量を計測することができる。

【 0 0 6 7 】

試料 2 1 は純水 2 5 内に配置される。しかし、浮遊しているプローブ粒子 P によって計測がなされるため、当該純水 2 5 が流動している場合であっても、流動によって計測が妨げられることはない。

【 0 0 6 8 】

また、本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 A 及び表面電荷量計測方法では、流動体（この場合、純水 2 5）に浮遊しているプローブ粒子 P を利用して計測がなされるため、血液中、尿中、あるいは脳などの組織液中の生体物質に対して適用できる。そのため、極微量の特定遺伝子や特定蛋白質の検出、さらには細胞の化学物質に対する応答評価や脳を主とする生体組織の機能評価などのライフサイエンス研究及び医療計測、あるいは農・水産物などの食品分析等に極めて役立つと考えられる。そして、その結果、従来に比べ迅速且つ簡便な標的遺伝子・蛋白質のセンシングシステムの開発につながり、ライフサイエンス研究、医療診断等に大きく寄与するほか、新規薬剤や環境汚染物質のハイスループットスクリーニングなどにも応用が期待される。

【 0 0 6 9 】

また、プローブ粒子 P の大きさを変えることで、例えばより局所的な領域での電荷量を計測することも可能となる。

【 0 0 7 0 】

また、本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 A 及び表面電荷量計測方法それぞれでは、プローブ画像における各プローブ粒子 P の直径 d さえ求められればそのプローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ が算出できる。そのため、プローブ画像に撮像されたプロー

10

20

30

40

50

プローブ粒子 P の数が複数であっても、当該撮像された複数のプローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ を算出することが可能であり、電荷量の計測に要する時間を短縮することが可能となる。

【0071】

本実施形態では、プローブ粒子 P は球体であるため、プローブ画像によって得られるプローブ粒子 P の直径（プローブ粒子 P の大きさを規定する値）はプローブ粒子 P を撮像する方向に依存しない。その結果、プローブ粒子 P を如何なる方向からも撮像でき、電荷量の計測が容易になる。

【0072】

本実施形態では、プローブ粒子 P を照射する光 1 を出力する光源 2 を備えているため、自身で光を發しないプローブ粒子 P を用いて電荷量を計測することが可能となる。 10

【0073】

（第 2 実施形態）

図 10 は第 2 実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 B の構成を示す図である。図 10 に示すように表面電荷量計測装置 1 B は、光源 2 と、水槽 20 と、強度測定装置（強度測定手段）6 と、演算処理装置（演算処理手段）30 と、表示装置（表示手段）5 とを備える。表面電荷量計測装置 1 B は、透明な基板 22 と、当該透明基板 22 の表面に固定された固定化 DNA 分子 23 とで構成される試料 21 の表面 21 a の電荷量を計測する。

【0074】

水槽 20 の底面上には、試料 21 が載置されている。水槽 20 内では、試料 21 の表面 21 a 上方において球体のプローブ粒子 P が複数浮遊している。必要に応じて、検出 DNA 分子 24 も水槽 20 内に浮遊させてもよい。プローブ粒子 P として例えば、径が約 40 nm の金のコロイド粒子を用いる。試料 21、検出 DNA 分子 24、及びプローブ粒子 P は、同符号で荷電している。また、基板 22 の屈折率は、基板 22 と接する純水 25 及び水槽 20 のいずれの屈折率よりも高い。 20

【0075】

光源 2 は、試料 21 の表面 21 a と交差する試料 21 の第 1 の側面 21 b に斜めに入射光 1_1 を入射する。入射光 1_1 は、試料 21 の表面 21 a 及び当該表面 21 a に対向する面において全反射しながら試料 21 の基板 22 内を伝播する。すなわち、基板 22 は入射光 1_1 に対し光導波路として機能する。基板 22 内を伝播した入射光 1_1 は、表面 21 a とは交差する試料 21 の第 2 の側面 21 c から出射光 1_2 として出射し、強度測定装置 6 に入射する。また、光源 2 は、入射光 1_1 の強度を測定し、測定された強度を演算処理装置 30 へ出力する。 30

【0076】

強度測定装置 6 は、試料 21 の基板 22 から出射された出射光 1_2 を入力とする。強度測定装置 6 は、出射光 1_2 の強度を測定し、測定された強度を演算処理装置 30 へ出力する。

【0077】

演算処理装置 30 は、光源 2 から出力された入射光 1_1 の強度を、さらに強度測定装置 6 から出力された出射光 1_2 の強度をそれぞれ入力とする。演算処理装置 30 は、入射光 1_1 の強度と出射光 1_2 の強度との強度差からプローブ粒子 P の位置分布を算出し、当該位置分布から試料 21 の表面 21 a での電荷量を算出する。演算処理装置 30 は、算出した試料 21 の表面 21 a での電荷量を表示装置 5 へ出力する。 40

【0078】

表示装置 5 は、演算処理装置 30 から入力された試料 21 の表面 21 a での電荷量を表示する。この表示装置 5 としては、例えば、CRT モニタや、液晶ディスプレイなどを用いることができる。

【0079】

次に、図 11 を参照して演算処理装置 30 の機能について説明する。図 11 に示すように、演算処理装置 30 は、位置分布算出部（位置分布算出手段）31 と、電荷量算出部（ 50

電荷量算出手段) 3 2 とを有する。

【0080】

位置分布算出部 3 1 は、光源 2 から入射光 l_1 の強度を、強度測定装置 6 から出射光 l_2 の強度を入力する。位置分布算出部 3 1 は、入射光 l_1 の強度と出射光 l_2 の強度との強度差に基づいて、式 (6) より、複数のプローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ を算出する。

【数 6】

$$\log_{10}\left(\frac{I_1}{I_2}\right) = \int_0^{3dp} \left\{ \varepsilon_z \cdot \left(\frac{n(x, y, z)}{n_0} \right) \cdot C \cdot l_z \right\} dz \quad \dots (6)$$

10

I_1 : 入射光 l_1 の強度

I_2 : 出射光 l_2 の強度

ε_z : 試料表面 (界面) からの距離 z におけるプローブ粒子の吸光係数

C : プローブ粒子の数密度 (濃度)

l_z : 全反射光の試料表面 (界面) からの距離 z における光路長

$n(x, y, z)$: 試料表面 (界面) からの距離 z に分布するプローブ粒子の数

n_0 : 全プローブ粒子数

$n(x, y, z) / n_0$: 界面からの距離 z におけるプローブ粒子の分布関数

20

【0081】

電荷量算出部 1 4 は、位置分布算出部 1 3 からプローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ を入力する。電荷量算出部 1 4 は、プローブ粒子 P の位置分布に基づき、式 (3) からプローブ粒子 P と試料 2 1 の表面 2 1 a との間の静電的相互作用 (x, y, z) を求める。

【0082】

電荷量算出部 1 4 は、式 (3) から求めた静電的相互作用に基づいて、試料 2 1 の表面 2 1 a での表面電位を (4) 式により求める。電荷量算出部 1 4 は、さらに、式 (4) から求めた試料 2 1 の表面電位に基づいて、試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量を (5) 式により求める。

30

【0083】

こうして、電荷量算出部 1 4 が、試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量を算出することで、表面電荷量計測装置 1 B では試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量が計測される。

【0084】

次に、図 1 2 を参照して、本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 B を用いる表面電荷量計測方法について説明し、併せて表面電荷量計測装置 1 B の動作についても説明する。図 1 2 は、表面電荷量計測方法の手順を示す図である。

【0085】

まず、基板 2 2 の一方の表面に固定化 DNA 分子 2 3 を固定して試料 2 1 を用意する。

40

さらに、純水 2 5 で満たされた水槽 2 0 を用意し、固定化 DNA 分子 2 3 が固定された表面と反対側の面が水槽 2 0 の底面と接するように、試料 2 1 を水槽 2 0 の底面上に載置する。試料 2 1 を水槽 2 0 内に入れた後、複数の荷電されたプローブ粒子 P を水槽 2 0 の純水 2 5 内に浮遊させる。これにより、試料 2 1 の表面 2 1 a 上方をプローブ粒子 P が浮遊するように、試料 2 1 及びプローブ粒子 P が配置される (プローブ粒子準備ステップ S 1 2)。

【0086】

次に、試料 2 1 の表面 2 1 a で全反射しながら試料 2 1 の基板 2 2 内を伝播する入射光 l_1 を、表面 2 1 a と交差する試料 2 1 の第 1 の側面 2 1 b に斜めに入射させる (光入射ステップ S 1 2)。基板 2 2 の屈折率は、基板 2 2 が接している純水 2 5 及び水槽 2 0 の

50

何れよりも屈折率が高い。そのため、入射光を斜めに入れることで、試料 2 1 の表面、すなわち基板 2 2 の表面において入射光 l_1 が全反射を起こしながら、第 2 の側面 2 1 c に向かって伝播する。

【0087】

入射光 l_1 が基板 2 2 の表面で全反射を起こすとき、その表面から外側にはエバネッセント光が浸みだしている。固定化 DNA 分子 2 3 の厚さは、エバネッセント光が浸みだす範囲（例えば、基板 2 2 の外側に向かって約 200 nm の範囲）に比較して極めて薄い。また、プローブ粒子 P の径も例えば約 40 nm と非常に小さい。そのため、エバネッセント光が浸みだす範囲内にプローブ粒子 P は十分分布している。

【0088】

プローブ粒子 P は、浸みだしたエバネッセント光を吸収する。そのため、入射光 l_1 が全反射を起こしながら、基板 2 2 内を第 2 の側面 2 1 c に向かって伝播している間にプローブ粒子 P に吸収された分だけ光の強度が減少している。

【0089】

続いて、強度測定装置 6 において、表面 2 1 a と交差する試料 2 1 の第 2 の側面 2 1 c から出射する出射光 l_2 の強度が測定される（出射光強度測定ステップ S 1 3）。光源 2 で測定された入射光 l_1 の強度及び強度測定装置 6 において測定された出射光 l_2 の強度が、演算処理装置 3 0 に出力される。

【0090】

入射光 l_1 の強度及び出射光 l_2 の強度が入力された演算処理装置 3 0 の位置分布算出部 3 1 では、入射光 l_1 の強度と出射光 l_2 の強度との強度差に基づいて複数のプローブ粒子 P の位置分布が算出される（位置分布算出ステップ S 1 4）。式（6）に基づき算出されたプローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ は、位置分布算出部 3 1 から電荷量算出部 3 2 へ出力される。

【0091】

プローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ が入力された電荷量算出部 3 2 では、位置分布 $n(x, y, z)$ に基づいて試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量が算出される（電荷量算出ステップ S 1 5）。電荷量算出部 3 2 では、プローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ に基づき、式（3）～（5）によって、試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量が算出される。

【0092】

次いで、例えば固定化 DNA 分子 2 3 と相補的な親和性を有する DNA 分子の検出する場合には、水槽 2 0 内の溶液を廃棄し、上述のプローブ粒子準備ステップ S 1 1～電荷量算出ステップ S 1 5 を繰り返す。すなわち、まず再度試料 2 1 を底面に載置し、水槽 2 0 内を純水 2 5 で満たす。その後、水槽 2 0 内に先ほどと同数のプローブ粒子 P 及び検出 DNA 分子 2 4 を浮遊させ（プローブ粒子準備ステップ S 1 1）、光入射ステップ S 1 2、位置分布算出ステップ S 1 3、及び電荷量算出ステップ S 1 4 を実行する。こうしてプローブ粒子準備ステップ S 1 2～電荷量算出ステップ S 1 6 を繰り返すことにより、様々な DNA 分子の検出を行うことができる。

【0093】

本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 B 及び表面電荷量計測方法では、プローブ粒子 P 及び試料 2 1 はいずれも荷電しており、互いに静電的相互作用を及ぼし合っている。したがって、プローブ粒子 P はこの静電的相互作用の影響を受けて分布することとなり、プローブ粒子 P の位置分布 $n(x, y, z)$ を求めることで、式（3）～（5）から、試料 2 1 の表面 2 1 a での電荷量を算出することができる。このように、本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 B 及び表面電荷量計測方法では、プローブ粒子 P の位置分布から試料 2 1 の表面 2 1 での電荷量を算出することが可能となる。

【0094】

また、試料 2 1 表面での電荷量が計測可能である本実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 B 及び表面電荷量計測方法も、第 1 実施形態に係る表面電荷量計測装置 1 A 及び表面電

10

20

30

40

50

荷量計測方法同様、バイオセンシング分野への応用において非常に有用であると考えられる。

【0095】

また、本実施形態では荷電されたプローブ粒子Pの位置分布 $n(x, y, z)$ を求めるだけで電荷量が計測される。そのため、本実施形態に係る表面電荷量計測装置1A及び表面電荷量計測方法では、簡便且つ低コストで電荷量を計測することができる。

【0096】

試料21は純水25内に載置されている。しかし、浮遊しているプローブ粒子Pによって計測がなされるため、当該純水25が流動している場合であっても、流動によって計測が妨げられることはない。

【0097】

また、プローブ粒子Pの大きさを変えることで、例えばより局所的な領域での電荷量を計測することも可能となる。特に、本実施形態ではプローブ粒子Pとして非常に径の小さいもの(例えば約40nm)を用い、さらに試料21を光導波路として利用して計測にエバネッセント光を用いている。そのため、非常にミクロのスケールでの反応も検出することが可能となる。

【0098】

また、本実施形態に係る表面電荷量計測装置1B及び表面電荷量計測方法それぞれでは、入射光 I_1 の強度と出射光 I_2 の強度との強度差さえ求められれば、そのプローブ粒子Pの位置分布 $n(x, y, z)$ が算出できる。そのため、プローブ粒子Pを複数用いる場合であっても、位置分布 $n(x, y, z)$ の算出に要する時間は非常に短いものとなる。その結果、電荷量の計測に要する時間を短縮することが可能となる。

【0099】

ここで、エバネッセント光が浸みだす範囲にプローブ粒子が存在する場合に、プローブ粒子Pがエバネッセント光を吸収することを実証するための実施例をデータとともに示す。厚みの薄いガラス基板を光導波路として用い、径が40nmの金コロイド粒子(負電荷に荷電)をプローブ粒子Pとして利用した。

【0100】

まず、図17に、未処理のガラス基板(表面が負電荷に荷電)及び表面をアミノ化処理されたガラス基板(表面が正電荷に荷電)それぞれを金コロイド粒子が浮遊している純水中に配置し、ガラス基板への入射光と出射光との強度差を測定したグラフを示す。図17のグラフAが未処理のガラス基板の結果を表し、グラフBがアミノ化処理されたガラス基板の結果を表す。図17のグラフの横軸は吸収スペクトル(λ/nm)を表し、縦軸は入射光と出射光との強度差(A.U.)、すなわちエバネッセント光の吸収量を表す。図17のグラフから、未処理のガラス基板では、エバネッセント光の吸収量がアミノ化処理されたガラス基板に比べ少ないことがわかる。これは、未処理のガラス基板表面がもつ負電荷と金コロイド粒子がもつ負電荷とが反発しあい、金コロイド粒子がガラス表面に近づきにくいことを示す。さらには、アミノ化処理されたガラス基板では、金コロイド粒子との間に静電的引力が働き、金コロイド粒子がガラス表面近傍に近づきやすくなることも理解される。

【0101】

図18に、金コロイド粒子が浮遊しているイオン交換蒸留水中及び金コロイド粒子が浮遊しているリン酸緩衝液中それぞれに、未処理のガラス基板(表面が負電荷に荷電)を配置し、ガラス基板への入射光と出射光との強度差を測定したグラフを示す。図18のグラフCがイオン交換蒸留水中に配置された結果を表し、グラフDがリン酸緩衝液中に配置された結果を表す。図18のグラフの横軸は吸収スペクトル(λ/nm)を表し、縦軸は入射光と出射光との強度差(A.U.)、すなわちエバネッセント光の吸収量を表す。図18のグラフから、リン酸緩衝液中の方がイオン交換蒸留水中に比べ、金コロイド粒子がガラス基板に近づきやすくなることが理解される。

【0102】

図17のグラフから、ガラス基板表面の荷電状態を反映して入射光の強度に対する出射光の強度の比が変化する（プローブ粒子と基板表面に静電的引力が働く場合、この比は低下する）ことが実証された。また、図18のグラフから、ガラス基板を配置する溶液によって、プローブ粒子である金コロイド粒子をガラス基板に近づきやすくさせることができることが実証された。これらの結果から、ガラス基板を光導波路として用い、エバネッセント光を利用した計測により、電荷量の測定をより一層簡便に行うことが可能なことが理解される。

【0103】

（第3実施形態）

図13を参照して、第3実施形態に係る表面電荷量計測装置1Cの構成について説明する。図11は第3実施形態に係る表面電荷量計測装置1Cの構成を示す図である。第3実施形態に係る表面電荷量計測装置1Cは、試料21の基板22が不透明な基板22Aであって、当該不透明基板22Aに対する反射型の顕微鏡として構成されている点で第1実施形態に係る表面電荷量計測装置1Aと異なる。

10

【0104】

不透明な基板22Aは、例えば半導体デバイス、あるいは着色されたガラス基板等である。

【0105】

光源2は、水槽20の斜め上方に位置する。光源2は、試料21及びプローブ粒子Pを照射する光1を、その光軸が基板22Aに対して傾きを有するように出力する。

20

【0106】

一方、結像光学系3も、水槽20の斜め上方に位置する。結像光学系3は、基板22A表面で反射された光の像を撮像装置4の受光面上に結ぶように、基板22Aに対して傾きを有して配置される。このように、表面電荷量計測装置1Cは、限外照明系を採用する。また、限外照明系を用いる場合、例えば作動距離の長い高倍率対物レンズを用いる方法、あるいは低倍率対物レンズにズーム光学系を組み合わせる方法、あるいは暗視野対物レンズを用いる方法などがある。

【0107】

本実施形態に係る表面電荷量算出装置1Cを用いる表面電荷量算出方法も、表面電荷量算出装置1Aを用いる表面電荷量算出方法と同様、図8に示すような校正データ準備ステップS01、プローブ粒子準備ステップS02、撮像ステップS03、大きさ規定値特定ステップS04、位置分布算出ステップS05、及び表面電荷量算出ステップS06を備える。

30

【0108】

反射型の顕微鏡に同軸（明視野）照明系を用いると背景反射が対物レンズに入射されてしまいプローブ粒子の像が不明瞭となってしまう。表面電荷量算出装置1Cでは、限外（暗視野）照明系を用いているため、不透明な基板22から構成される試料21を計測する場合であっても、プローブ粒子Pの像を撮像することができる。これにより、プローブ画像におけるプローブ粒子Pの直径を特定することが可能となるため、試料21の表面21aでの電荷量を計測することが可能となる。このように、本実施形態に係る表面電荷量算出装置1C及び表面電荷量算出方法では不透明な試料21に対しても表面21aでの電荷量を計測することが可能となる。

40

【0109】

本実施形態に係る表面電荷量計測装置1C及び表面電荷量計測方法では、プローブ粒子P及び試料21はいずれも荷電しており、互いに静電的相互作用を及ぼし合っている。したがって、プローブ粒子Pはこの静電的相互作用の影響を受けて分布することとなり、プローブ粒子Pの位置分布 $n(x, y, z)$ を求めることで、式(3)～(5)から、試料21の表面21aでの電荷量を算出することができる。このように、本実施形態に係る表面電荷量計測装置1C及び表面電荷量計測方法では、プローブ粒子Pの位置分布から試料21の表面21での電荷量を算出することが可能となる。

50

【0110】

また、試料21表面での電荷量が計測可能である本実施形態に係る表面電荷量計測装置1C及び表面電荷量計測方法も、第1実施形態に係る表面電荷量計測装置1A及び表面電荷量計測方法同様、バイオセンシング分野への応用において非常に有用であると考えられる。

【0111】

また、本実施形態では荷電されたプローブ粒子Pの位置分布 $n(x, y, z)$ を求めるだけで電荷量が計測される。そのため、本実施形態に係る表面電荷量計測装置1C及び表面電荷量計測方法では、簡便且つ低コストで電荷量を計測することができる。

【0112】

試料21は純水25内に載置されている。しかし、浮遊しているプローブ粒子Pによって計測がなされるため、当該純水25が流動している場合であっても、流動によって計測が妨げられることはない。

【0113】

また、プローブ粒子Pの大きさを変えることで、例えばより局所的な領域での電荷量を計測することも可能となる。

【0114】

また、一度の撮像で複数のプローブ粒子について位置を算出することができるため、実際の計測が容易となり、電荷量の計測に要する時間を短縮することが可能となる。

【0115】

本実施形態では、プローブ粒子Pは球体であるため、プローブ粒子Pを如何なる方向からも撮像でき、実際の計測が容易になる。その結果、電荷量の計測が容易になる。

【0116】

本実施形態では、プローブ粒子Pを照射する光1を出力する光源2を備えているため、自身で光を発しないプローブ粒子Pを用いて電荷量を算出することが可能となる。

【0117】

以上、本発明の好適な実施形態について説明したが、本発明は上記実施形態に限定されるものではなく、様々なリアルタイムセンシング測定システムに応用することが可能である。例えば、図14に示す測定システムのように、第1実施形態に係る表面電荷量計測装置1Aと電気化学的測定装置40とをともに備えていてもよい。すなわち、図14に示す測定システムでは、表面電荷量計測装置1Aにより試料21の表面21aでの電荷量を計測し、同時に電気化学的測定装置40により試料21で発生する電気信号を検出することができる。電気化学的測定装置40は、参照電極41、対向電極42、ポテンシオスタット43、及び電気信号表示装置44を備える。基板22上には、透明電極層(図示を省略)が形成されており、当該透明電極層が電気化学的測定装置40の作用電極として機能する。

【0118】

あるいは、例えば、図15に示す測定システムのように、第1実施形態に係る表面電荷量計測装置1Aと物理的現象あるいは化学的現象を測定する半導体測定装置50とをともに備えていてもよい。すなわち、図15に示す測定システムでは、表面電荷量計測装置1Aにより試料21の表面21aでの電荷量を計測し、同時に半導体測定装置50により試料21で発生する電気信号を検出することができる。半導体測定装置50は、参照電極61、半導体装置SC、及び電気信号表示装置62を備える。半導体装置SCは、 n^+ 層51aを有するSi基板51と、 SiO_2 層52と、 Si_3N_4 層53と、Poly-Si層54と、 Si_3N_4/SiO_2 層55と、Al導体部56と、Au/Ti層57とを有する。また、半導体装置SCは、拡張ゲート型(Extended Gate型)の電極部63を有する。半導体装置SCの電極部63は、基板22上に形成された透明電極層として形成される。電極部63は、Au/Ti層57と導線によって接続されている。

【0119】

図16を参照して、半導体測定装置50の半導体装置SCの測定動作を説明する。図1

10

20

30

40

50

6は、半導体測定装置50の半導体装置SCの測定動作を説明するための図である。半導体装置SCは、機能的に、電荷供給部71、電荷注入調節部72、センシング部(電荷変換部)73、障壁部74、フローティングディフュージョン部75、リセットゲート76、及びリセットドレイン77を備える。測定に際し、電荷供給部71、障壁部74およびリセットゲート76にパルス電圧が印加され、フローティングディフュージョン部75を除く他の電極に直流電圧が印加される。

【0120】

まず、図16(a)に示すように、電荷供給部71の電位を高く設定する。次に図16(b)に示すように、電荷供給部71の電位を下げ、センシング部73に電荷78が注入されるようにする。続いて図16(c)に示すように、電荷供給部71の電位を再び高く設定する。これにより、電荷78は電荷注入調節部72によってすりきられ、センシング部73に蓄積される。

10

【0121】

続いて図16(d)に示すように、障壁部74の電位を上げる。これにより、センシング部73に蓄積されていた電荷78がフローティングディフュージョン部75に転送される。センシング部73に蓄積されていた電荷78が全てフローティングディフュージョン部75に転送された後、図16(e)に示すように、障壁部74の電位を下げて、電荷78の転送を止める。フローティングディフュージョン部75の電位は、転送されてきた電荷78の量で決まり、この電位を出力として測定がなされる。

【0122】

その後、図16(f)に示すように、リセットゲート76をオンし、リセットドレイン77の電位にリセットし、図16(a)に戻る。図16(a)~(f)に示される動作を繰り返すことにより、電荷が外に出力され、測定がなされる。

20

【0123】

また、本発明は上記実施形態及び応用例に限定されるものではなく、様々な変形が可能である。例えば、上記実施形態では、生物学的反応であるDNA反応に適用した場合を例示したが、様々な分野に適用可能である。例えば、DNA反応以外であっても、抗体や受容体、結合性蛋白質を用いることによる標的となる蛋白質、糖類等のバイオ分子の検出にも応用できる。さらには、生物学的反応に限らず、例えば化学的反応に適用してもよい。

【0124】

また、プローブ粒子Pの形状は球状に限らず、例えば棒状であってもよい。棒状プローブ粒子を用いた場合における、プローブ画像におけるプローブ粒子Pの大きさを規定する値というのは、プローブ粒子の長手方向の両端での短手方向の長さとなる。すなわち、例えば、プローブ画像においてプローブ粒子の長手方向の両端での短手方向の長さがある場合には、棒状のプローブ粒子は、長手方向と試料表面とが平行になるように分布している。一方、プローブ画像においてプローブ粒子の長手方向の両端での短手方向の長さが異なる場合には、棒状のプローブ粒子は、長手方向が試料表面に対して角度を有して分布している。したがって、プローブ画像におけるプローブ粒子の長手方向の両端での短手方向の長さを求めることによって、プローブ粒子Pの試料表面に対する位置情報としてプローブ粒子Pの試料表面に対する傾きが得られる。棒状のプローブ粒子Pは、試料表面と有機的に関連することによりその傾きが決定する。したがって、プローブ粒子Pの試料表面に対する傾きに基づいて、表面電位を算出することができる。

30

40

【0125】

また、プローブ粒子Pはポリスチレンラテックスあるいは金に限らず、他の材料からなるものであってもよい。また、プローブ粒子は液体に限らず、例えば気体中に浮遊していても、あるいは真空中に浮遊していてもよい。

【0126】

また、光源を有さず、例えばプローブ粒子P自身が蛍光を発光し、その像を撮像して試料21の表面での電荷量を計測してもよい。光源に限定はなく、可視光、紫外線、赤外線、X線、電子線、あるいは中性子線など、どのような波長の光を出す光源であってもよい

50

。

【図面の簡単な説明】

【0127】

【図1】第1実施形態に係る表面電荷量算出装置の構成を示す図である。

【図2】画像処理部の機能について説明するための図である。

【図3】校正データによって得られるグラフの図である。

【図4】実際の測定データを校正データとする場合における校正データの表を示す。

【図5】プローブ粒子と結像光学系の焦点面との関係を説明するための図である。

【図6】撮像されたプローブ画像におけるプローブ粒子の画像を表す図である。

【図7】プローブ画像における各プローブ粒子の強度を示すグラフの図である。

10

【図8】第1実施形態に係る表面電荷量算出方法の手順を示す図である。

【図9】校正データを求めることについて説明するための図である。

【図10】第2実施形態に係る表面電荷量算出装置の構成を示す図である。

【図11】演算処理部の機能について説明するための図である。

【図12】第2実施形態に係る表面電荷量算出方法の手順を示す図である。

【図13】第3実施形態に係る表面電荷量算出装置の構成を示す図である。

【図14】第1実施形態に係る表面電荷量算出装置を応用した測定システムの構成を示す図である。

【図15】第1実施形態に係る表面電荷量算出装置を応用した測定システムの構成を示す図である。

20

【図16】半導体測定装置の半導体装置の測定動作を説明するための図である。

【図17】ガラス基板への入射光とガラス基板からの出射光との強度差を測定したグラフを示す。

【図18】ガラス基板への入射光とガラス基板からの出射光との強度差を測定したグラフを示す。

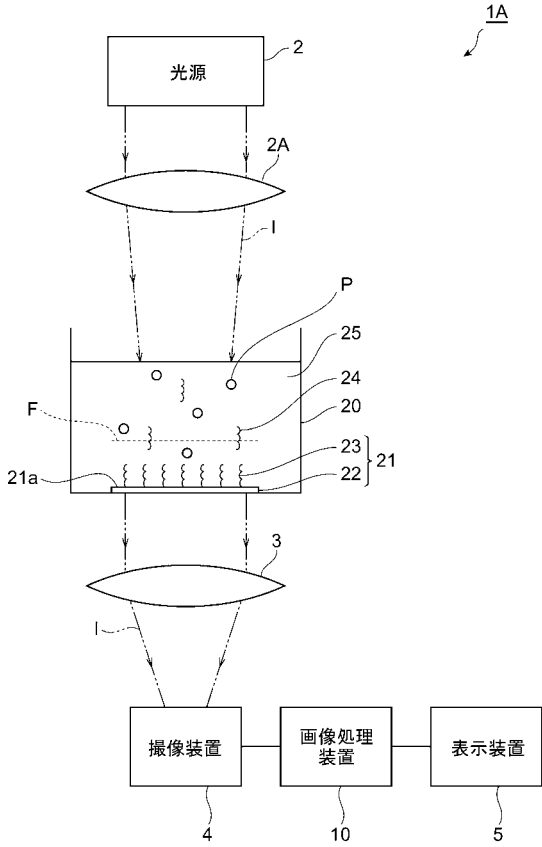
【符号の説明】

【0128】

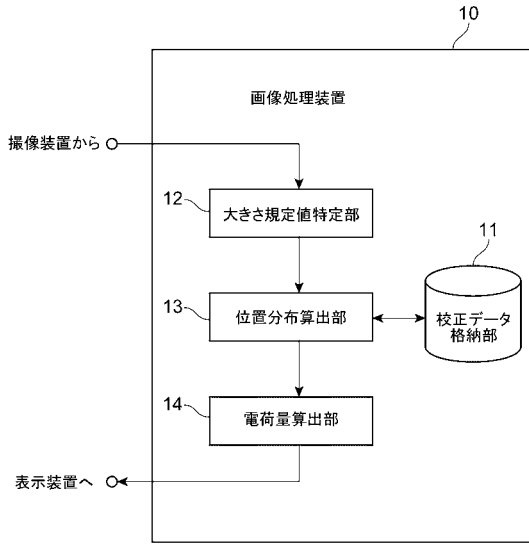
1 A、1 B、1 C ... 表面電荷量計測装置、P ... プローブ粒子、2 ... 光源、3 ... 結像光学系、4 ... 撮像装置、5 ... 表示装置、6 ... 強度測定装置、10 ... 画像処理装置、11 ... 校正データ格納部、12 ... 大きさ規定値特定部、13、31 ... 位置分布算出部、14、32 ... 電荷量算出部、30 ... 演算処理装置、40 ... 電気化学的測定装置、41 ... 参照電極、42 ... 対向電極、43 ... ポテンシオスタット、44、62 ... 電気信号表示装置、50 ... 半導体測定装置、S C ... 半導体装置、61 ... 参照電極

30

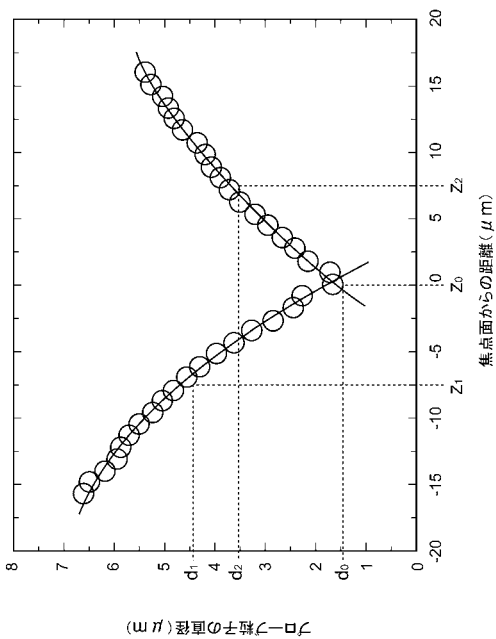
【 図 1 】



【 図 2 】



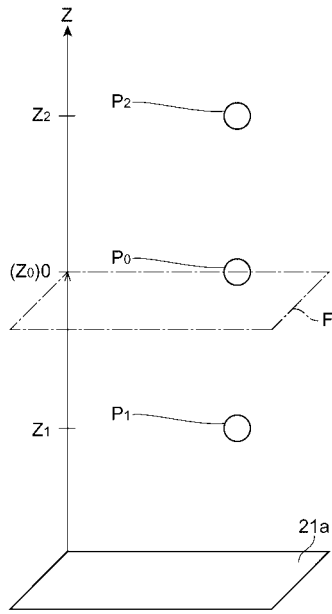
【 図 3 】



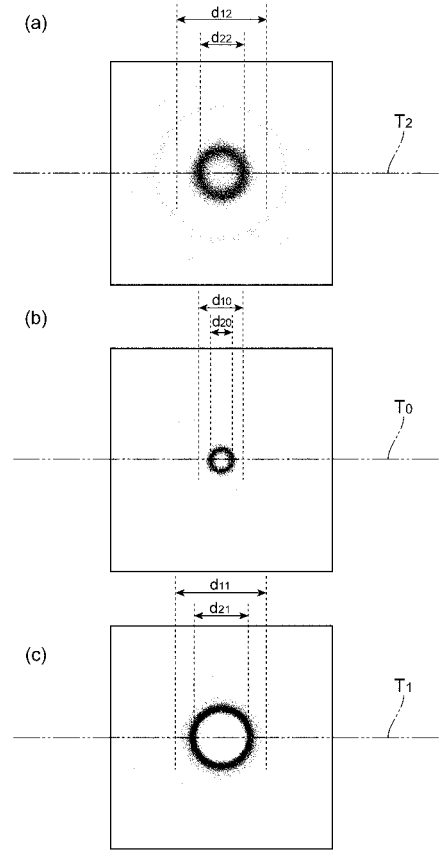
【 図 4 】

焦点面からの距離Z (μm)	直径d (μm)
-18.0	6.6
-17.0	6.6
-16.0	6.1
⋮	⋮
⋮	⋮
-1.0	2.2
0.0	1.6
1.0	1.7
⋮	⋮
⋮	⋮
16.0	5.0
17.0	5.1
18.0	5.2

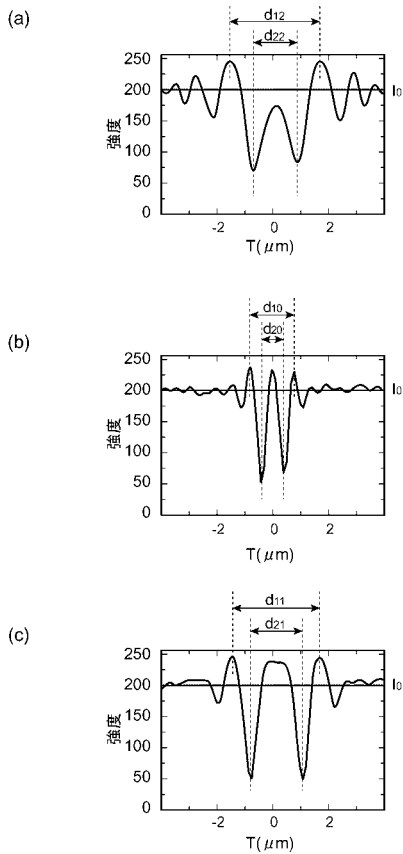
【 図 5 】



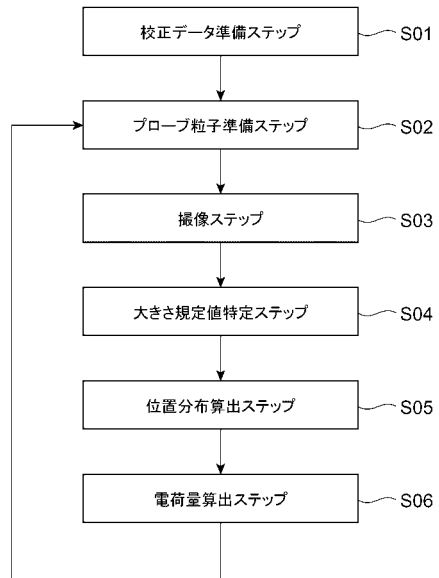
【 図 6 】



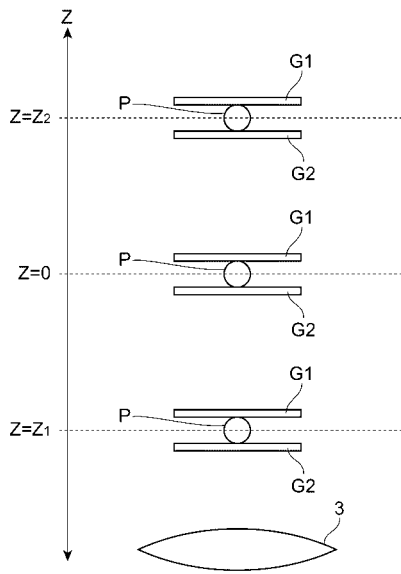
【 図 7 】



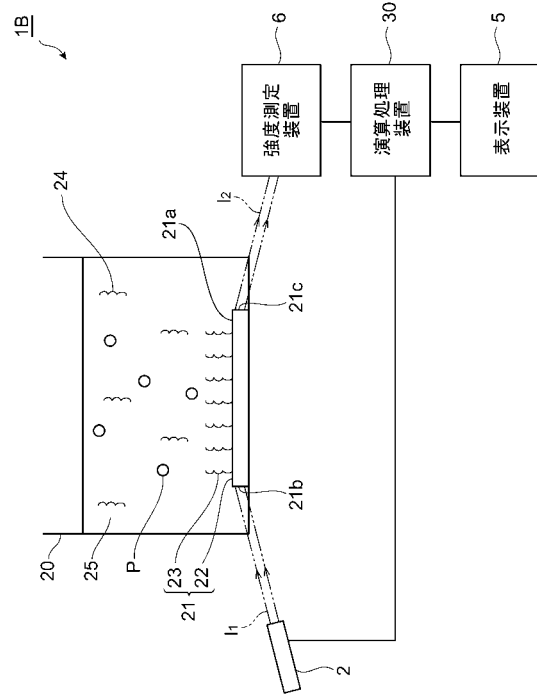
【 図 8 】



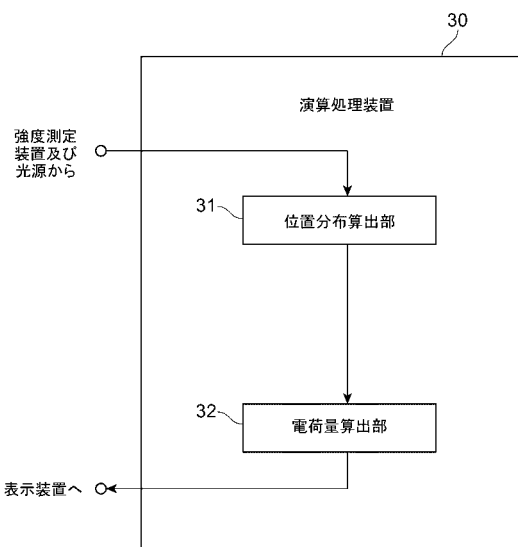
【 図 9 】



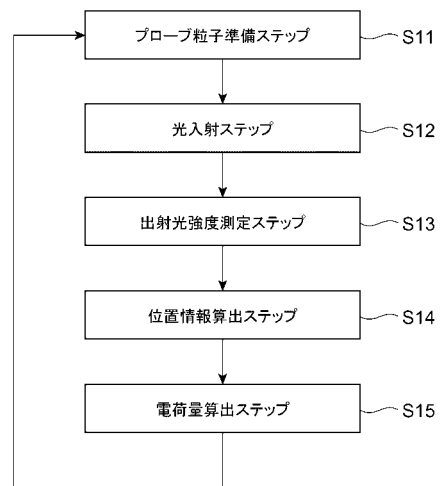
【 図 10 】



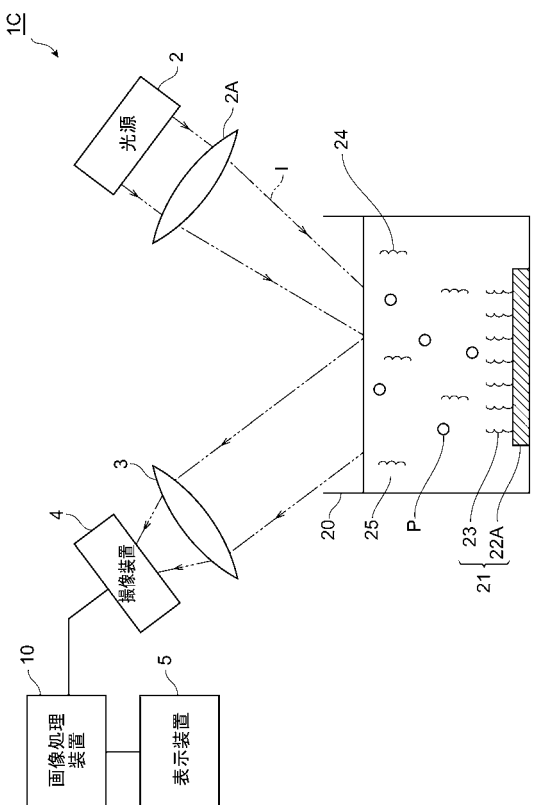
【 図 11 】



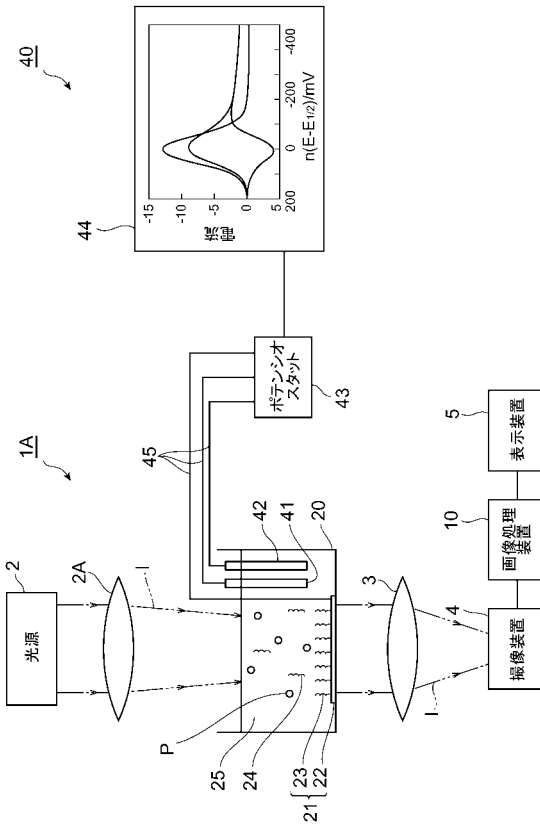
【 図 12 】



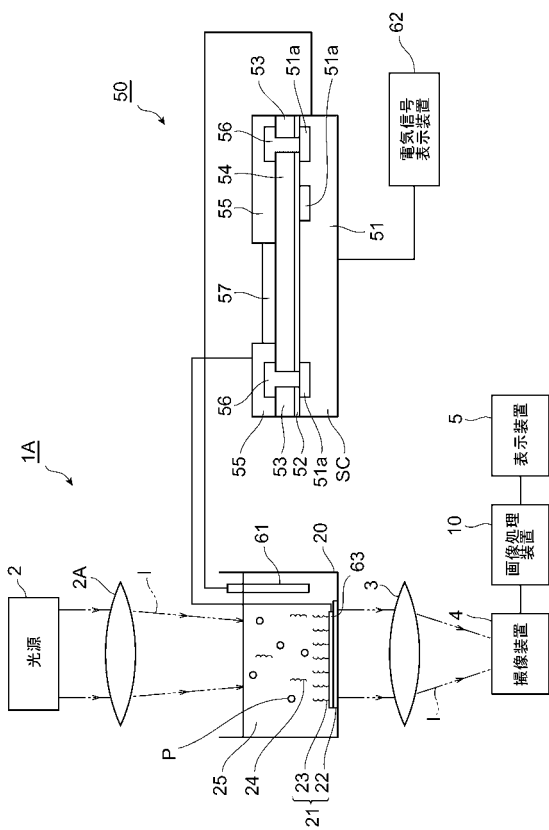
【 図 1 3 】



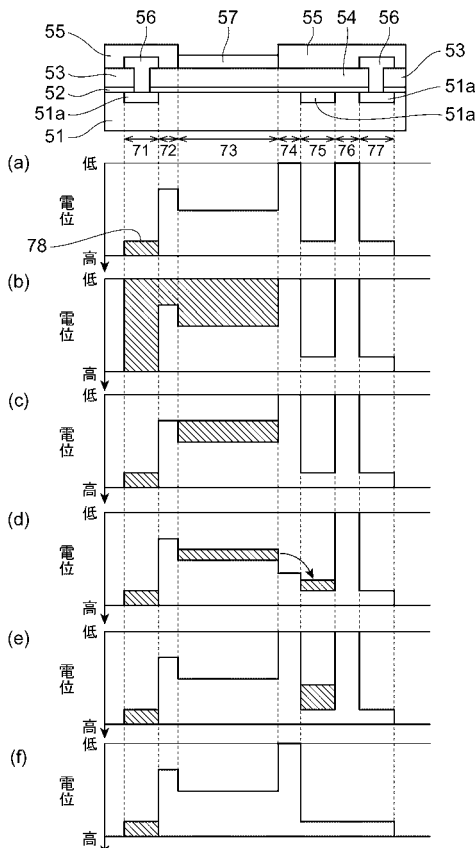
【 図 1 4 】



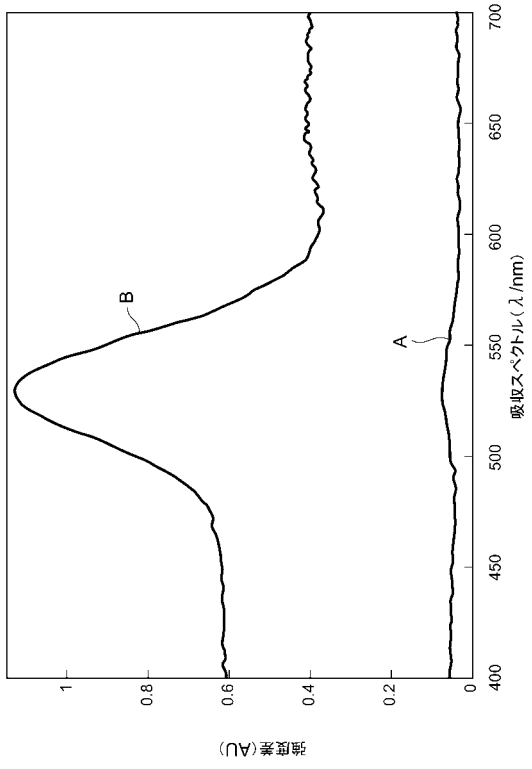
【 図 1 5 】



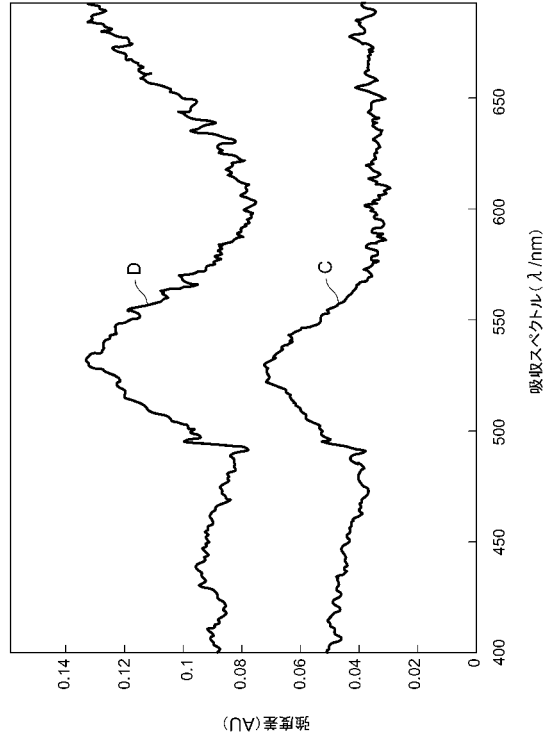
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



フロントページの続き

(72)発明者 富田 勝彦
富山県富山市五福3190 国立大学法人富山大学内