

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6086347号
(P6086347)

(45) 発行日 平成29年3月1日(2017.3.1)

(24) 登録日 平成29年2月10日(2017.2.10)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 5/02 (2006.01) GO 1 N 5/02 A
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D

請求項の数 7 (全 18 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2013-28481 (P2013-28481) (22) 出願日 平成25年2月16日 (2013.2.16) (65) 公開番号 特開2014-157099 (P2014-157099A) (43) 公開日 平成26年8月28日 (2014.8.28) 審査請求日 平成28年2月12日 (2016.2.12)</p> <p>特許法第30条第2項適用 平成24年11月17日 第46回日本生体医工学会東北支部大会講演論文集 M E-B2-1 に発表</p>	<p>(73) 特許権者 504180239 国立大学法人信州大学 長野県松本市旭三丁目1番1号 (74) 代理人 100082876 弁理士 平山 一幸 (74) 代理人 100184262 弁理士 森田 義則 (72) 発明者 山口 昌樹 岩手県盛岡市上田三丁目18番8号 国立 大学法人岩手大学内 審査官 北川 創</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共振型質量センサ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

振動子と、
 上記振動子上に載置される振動体と、
 上記振動体の共振周波数を検出する検出部と、
 を備え、

上記振動体と上記振動子は機械的に結合されておらず、かつ、該振動体は何れの部材にも機械的に結合されていないことを特徴とする、共振型質量センサ。

【請求項2】

前記振動体の振動は、定在波であることを特徴とする、請求項1に記載の共振型質量センサ。

【請求項3】

前記振動体は、被測定物質の分子認識手段を備えていることを特徴とする、請求項1又は2の何れかに記載の共振型質量センサ。

【請求項4】

前記分子認識手段は、抗原 - 抗体反応で特定の分子を捕捉することを特徴とする、請求項3に記載の共振型質量センサ。

【請求項5】

前記振動体は、少なくとも一部に磁化可能な部材を含むことを特徴とする、請求項1～3の何れかに記載の共振型質量センサ。

10

20

【請求項 6】

前記磁化可能な部材には、抗体及び/又は抗原を固定化した磁気ビーズが磁氣的に吸着されることを特徴とする、請求項 5 に記載の共振型質量センサ。

【請求項 7】

前記検出部は、発光素子と受光素子からなり、周波数、変位、速度、及び加速度の何れかの検出手段を備えることを特徴とする、請求項 1 に記載の共振型質量センサ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、共振型質量センサに関する。

10

【背景技術】

【0002】

気体や液体に含まれる極微量な化学物質の濃度を測定する方法として、共振型質量センサが開発されている。これは、一定周波数で振動している振動体に他の物質が付着すると、そのわずかな質量変化に伴って共振周波数も変化することを利用している。振動体としては、水晶天秤(Quartz Crystal Microbalance; QCM)などの自励発振式の振動体や、セラミック製の片持ち梁(カンチレバー)等の振動体に圧電素子などの振動子を接合したものが用いられてきた。前者を、自励発振式質量センサと呼ぶと、後者は他励発振式質量センサと呼ぶことができる。

【0003】

20

振動体として圧電体の薄膜共振器を備えた自励発振式の質量センサは、例えば特許文献 1 に開示されている。また、特許文献 2 には、Si からなる振動子を静電結合した駆動部により振動させる質量センサが開示されている。

【0004】

振動体に圧電素子からなる振動子を接合した他励発振式の質量センサは、例えば特許文献 3 に開示されている。

【0005】

これらの共振型質量センサに共通して言えることは、被測定物質の質量が小さくなればなるほど、振動体の共振周波数の変化量も小さくなるので、振動体の固定方法、給電方法、温度や湿度などの環境要因が、計測感度限界を左右する。

30

【0006】

しかし、従来の質量センサでは、振動体自体に給電されていたり(自励発振式質量センサ、(株)多摩デバイス製、非特許文献 1 参照)、振動体に機械的に(接着)固定された圧電素子に給電しているので(他励発振式質量センサ)、それらの給電線の保持によって共振現象が阻害され、高感度化を阻んでいた。

【0007】

また、他励発振式質量センサでは、電氣的にではなく磁氣的に振動体を励振するもの等もあるが(非特許文献 2 参照)、振動体と磁気ヘッドとのギャップを厳密に位置決めする必要があった。

【先行技術文献】

40

【特許文献】

【0008】

【特許文献 1】特表 2005 - 533265 号公報

【特許文献 2】特許第 4638281 号公報

【特許文献 3】特許第 3298897 号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献 1】<http://www.tamadevice.co.jp/9mhz.htm>

【非特許文献 2】J. Teva, et al, "A femtogram resolution mass sensor platform, based on SOI electrostatically driven resonant cantilever", Ultramicroscopy, Vol.

50

106, pp.800 - 807, 2006

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従来の他励発振式質量センサでは、振動体を筐体に固定する必要が生じ、振動体の固定保持によって共振現象が阻害され、高感度化を図れないという課題があった。

【0011】

本発明は、上記課題に鑑み、他励式で高感度な共振型質量センサを提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者は、振動体の両端を自由端とした梁の横振動モードの共振周波数を圧電素子で励起することで、 38.8 ng / Hz の計測感度を有する共振型質量センサが実現できるという知見を得て本発明に想到した。

【0013】

上記の目的を達成するため、本発明の共振型質量センサは、振動子と、振動子上に載置される振動体と、振動体の共振周波数を検出する検出部と、を備え、振動体と振動子は機械的に結合されておらず、かつ振動体は何れの部材にも機械的に結合されていないことを特徴とする。

【0014】

上記構成において、振動体の振動は、好ましくは、定在波である。

振動体は、好ましくは、被測定物質の分子認識手段を備えている。分子認識手段は、好ましくは、抗原 - 抗体反応を用いる。

振動体は、好ましくは、少なくとも一部に磁化可能な部材を含む。磁化可能な部材には、好ましくは、抗体又は抗原を固定化した磁気ビーズが磁氣的に吸着される。

前記検出部は、好ましくは、発光素子と受光素子からなり、振動、変位、速度及び加速の何れかの検出手段を備える。

【発明の効果】

【0015】

本発明の共振型質量センサによれば、振動体の振動子への固定が不要となるので、給電や固定による共振現象への阻害がなく、振動体の形状寸法の設計の制約を無くすことができ、質量変化を高感度で測定できる。さらに、振動体を振動子に固定していないので、振動体の交換が極めて容易となる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】本発明の第1の実施形態に係る共振型質量センサの構成を示すブロック図である。

【図2】本発明の振動体の形状を説明する斜視図である。

【図3】本発明の振動体の両端自由の場合の横振動モードにおけるモード次数を説明する図であり、(a)は1次モード、(b)は2次モード、(c)は3次モードを示している。

【図4】本発明の第2の実施形態に係る共振型質量センサの構成を示すブロック図である。

【図5】本発明の第2の実施形態に係る共振型質量センサにおける振動体の共振周波数の時間変化を示す図である。

【図6】抗原抗体反応時における振動体の共振周波数の変化を示す図である。

【図7】本発明の第3の実施形態に係る共振型質量センサの構成を示すブロック図である。

【図8】強磁性振動体の作製方法を示す図である。

【図9】共振型質量センサの振動体の変形例を示す断面図である。

10

20

30

40

50

【図10】図9の強磁性振動体の作製方法を示す図である。

【図11】第3の実施形態に係る共振型質量センサの使用方を説明する図である。

【図12】作製した振動体の外観を示す光学像である。

【図13】実施例で作製した共振型質量センサの構成を示すブロック図である。

【図14】振動体の共振周波数と負荷荷重質量の関係を示す図である。

【図15】B S Aの付着工程を示す図である。

【図16】振動体の質量変化と共振周波数変化の関係を示す図である。

【図17】振動体を示す断面図であり、(a)はおもりが載置された振動体、(b)はB S Aを吸着した振動体である。

【図18】別途測定しておいた総蛋白濃度とマイクロプレートリーダーの吸光度の関係を示す検量線である。

10

【図19】総蛋白濃度0.2(mg/μl)の唾液を用いた時の振動体の共振スペクトルを、スペクトラムアナライザで測定した結果を示す図である。

【図20】サンプル溶液の総蛋白濃度と振動体の共振周波数の関係を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本発明の実施形態を図面に基づいて詳細に説明する。

(第1の実施形態)

図1は、本発明の第1の実施形態に係る共振型質量センサ1の構成を示すブロック図である。

20

図1に示すように、本発明の共振型質量センサ1は、振動体2と、振動体2を励起する励起用の振動子3と、励起用の振動子3を駆動する電源4と、振動体2の振動を検出する検出部5と、を含んで構成されている。本発明の共振型質量センサ1の振動体2は、振動子3上に載置される。振動体2と振動子3は機械的に結合されておらず、かつ振動体2は何れの部材にも機械的に結合されていない、つまり、振動体2はどこにも固定化されていない構造を有している。

【0018】

振動体2は、後述するように共振現象に最適な形状寸法に加工されている。振動体2は、圧電素子などの振動子3の上に非拘束状態で載置されており、圧電素子が任意の周波数で振動すると、振動体2が、振動体2自身の共振周波数で振動できる構造になっている。

圧電素子3に梁状の振動体2の固有周波数付近の交流電圧を印加すると、振動体2は自らの固有の共振周波数で共振する。このようにすれば、振動体2は材質や形状寸法に何ら制約を受けることが無くなるので、設計の自由度は飛躍的に改善できる。

30

【0019】

なお、振動体2の振動モードは、定在波型超音波モータのように、ある一定の方向へ移動するような1軸振動等の振動モードとならないように設定される。つまり、振動体2の振動モードは、ある一定の方向へ移動するような振動モードではなく、かつ、その振幅もナノメートル(nm)オーダーと小さいので、振動体2が振動子3の上から脱離することはない。

【0020】

40

液体もしくは気体の被測定サンプルに振動体2が曝されたり、振動体2に付着した場合には、振動体2の質量が増加する。これにより、振動体2の共振周波数が変化し、その変化割合からサンプル中の特定の化学物質濃度を推定することができる。振動体2の共振周波数の変化は、検出部5により検知される。検出部5は、振動体2の共振周波数の計測手段として、発光素子と受光素子からなる光学的な検出手段を使用することができる。光学的な検出手段は、振動体2の周波数、変位、速度、加速度の何れかを測定してもよい。検出部5には、レーザー変位計などを用いることができる。レーザー変位計によれば、振動体2の共振周波数の変化を非接触で計測することができる。

【0021】

(振動体の振動モード)

50

本発明の振動体 2 の振動モードについて説明する。

図 2 は、本発明の振動体 2 の形状を説明する斜視図である。

図 2 に示すように、本発明の振動体 2 は、例えば、長手方向の寸法である長さ l と、幅 w と、高さ h と、断面の面積 A とを有する細長い柱状の梁からなる。本発明の振動体 2 は、圧電結晶等を用いることができる。圧電結晶としては、水晶、PZT 等が挙げられる。本発明の振動体 2 に用いる振動モードは、梁の長手方向に対して垂直に振動する横振動モードであり、その共振周波数 (f_n) は下記 (1) 式で表される。横振動モードは、曲げ振動とも呼ぶ。

【 0 0 2 2 】

【数 1】

$$f_n = \frac{\lambda_n^2}{2\pi l^2} \sqrt{\frac{EI}{\rho A}} \quad [\text{Hz}] \quad (1)$$

10

【 0 0 2 3 】

上記 (1) 式の符号を以下に示す。

n : 振動系のモード次数 (図 3 参照)、

λ_n : 両端自由の条件で $\lambda_1 = 4.730$ 、 $\lambda_2 = 7.583$ 、 $\lambda_3 = 10.996$ 、

l : 振動体 2 の長さ (cm)、

E : 縦弾性係数 (水晶 : 9.72×10^{11}) [$\text{g/cm} \cdot \text{s}^2$]、

I : 断面二次モーメント [cm^4]、

ρ : 密度 (水晶 : 2.65) [g/cm^3]、

A : 梁の断面積 [cm^2]

20

【 0 0 2 4 】

本発明の振動体 2 に用いる横振動モードの他に、梁の伸び縮み振動である縦振動モードと、梁のねじりから生じるねじり振動モードが生じる。本発明の振動体 2 に用いる横振動モードの周波数は、振動体 2 の縦振動モード及びねじり振動モードとは異なるように設定される。

【 0 0 2 5 】

梁の伸び縮み振動である縦振動の共振周波数 (f_n) は、下記 (2) 式で表される。

30

【 0 0 2 6 】

【数 2】

$$f_n = \frac{\lambda_n}{2\pi l} \sqrt{\frac{E}{\rho}} \quad [\text{Hz}] \quad (2)$$

【 0 0 2 7 】

ここで、 λ_n は両端自由の条件で、 $\lambda_1 = \pi$ 、 $\lambda_2 = 2\pi$ 、 $\lambda_3 = 3\pi$ 、 \dots である。

【 0 0 2 8 】

梁のねじり振動の共振周波数 (f_n) は、下記 (3) 式で表される。

40

【 0 0 2 9 】

【数 3】

$$f_n = \frac{\lambda_n}{2\pi l} \sqrt{\frac{G}{\rho}} \quad [\text{Hz}] \quad (3)$$

【 0 0 3 0 】

ここで、 λ_n は両端自由の条件で、 $\lambda_1 = \pi$ 、 $\lambda_2 = 2\pi$ 、 $\lambda_3 = 3\pi$ 、 \dots であり、 G はせん断弾性係数 ($\text{g/cm} \cdot \text{s}^2$) である。ちなみに水晶の G は、 2.95×10^{11} ($\text{g/cm} \cdot \text{s}^2$) である。

50

【 0 0 3 1 】

(振動体の横振動のモード次数)

本発明の振動体 2 における横振動モードのモード次数について説明する。

図 3 は、本発明の振動体 2 の両端自由の場合の横振動モードにおけるモード次数を説明する図であり、(a) は 1 次モード、(b) は 2 次モード、(c) は 3 次モードを示している。

図 3 に示すように、本発明の振動体 2 の両端自由の場合の横振動は定在波であり、1 次モードの節の数は 2、2 次モード節の数は 3、3 次モード節の数は 4 である。

【 0 0 3 2 】

(振動体の横振動モードの共振周波数)

振動体 2 の材料を水晶とし、梁の長さが 4 mm、幅が 0.4 mm、高さが 0.4 mm のときの縦振動モードの 1 ~ 3 次モードの共振周波数を上記 (1) 式を用いて計算した。計算結果を縦振動モード及びねじり振動と共に表 1 に纏めて示す。

【表 1】

寸法 l×h×w (mm)	n	横振動	縦振動	ねじり振動
		f(kHz)	f(kHz)	f(kHz)
4×0.4×0.4	1次	156	757	417
	2次	400	1514	834
	3次	841	2271	1251

【 0 0 3 3 】

表 1 に示すように、振動体 2 の横振動モードの共振周波数は、モード次数が増すと増加し、かつ、縦振動モード及びねじり振動とは異なる共振周波数であることが分かる。

【 0 0 3 4 】

本発明の共振型質量センサ 1 によれば、振動体 2 の振動子 3 への機械的な固定を不要とすることで、給電や固定による共振現象の阻害がなく、振動体 2 の形状寸法の設計の制約を無くすことができ、質量変化を高感度で測定できる。さらに、振動体 2 を振動子 3 に機械的に固定していないので、振動体 2 の交換が、極めて容易となる。

【 0 0 3 5 】

(第 2 の実施形態)

図 4 は、本発明の第 2 の実施形態に係る共振型質量センサ 10 の構成を示すブロック図である。

図 4 に示すように、この第 2 の実施形態の共振型質量センサ 10 が、図 1 の共振型質量センサ 1 と異なるのは、振動体の表面に抗体等の分子認識素子 16 が固定化されて抗体固定化振動体 12 として構成されている点である。つまり、被測定物質の分子認識手段 16 を備えている。分子認識手段 16 としては、例えば抗体 16 a と抗原からなり、これにより抗原 - 抗体反応で特定の分子を捕捉する。図示の場合、抗体 16 a 等の分子認識素子 16 は、振動体 12 表面の自由端などの振幅が大きい位置に固定されている。分子認識手段 16 となる抗体及び / 又は抗原が振動体 12 の表面に固定化されてもよい。

【 0 0 3 6 】

(抗体の固定化方法)

振動体 12 に抗体 16 a を固定する方法について説明する。

振動体 12 の表面に金属薄膜を被覆し、この金属被膜上に分子層オーダーの分子膜をスパッタ法等により形成し、この分子膜に抗体 16 a を修飾することにより振動体 12 に抗体 16 a を固定することができる。金属薄膜としては、密着層と密着層上に形成される白金 (Pt) 膜を用いることができる。密着層は、Ti や Cr 等が挙げられる。分子層オー

10

20

30

40

50

ダーの分子膜としては、自己組織化単分子膜（以下、SAM膜と呼ぶ。）を用いることができる。

【0037】

（抗体の固定化方法の具体例）

抗体16aの固定化方法の一例を説明する。

梁状の振動体12の一面には、チタン（Ti）と白金（Pt、500）を、スパッタ法により成膜する。白金表面に抗体16aを固定化するには、SAM膜を形成し、SAM膜に抗体16aを修飾する。SAM膜と抗体16aの結合にはアミンカップリング法を用いた。また、余計なタンパクが付着して測定に影響が無いように、エタノールアミン水溶液でのブロッキングと、ウシ血清アルブミン（Bovine Serum albumin、以下BSAと呼ぶ。）水溶液でのブロッキングも施した。

10

【0038】

以下に、梁状振動体12にSAM膜を形成して抗体16aを修飾する工程の一例を、さらに詳しく説明する。

（1）有機物の除去：電極の表面をピラニア溶液に15分間浸漬し、有機物を除去する。

（2）保管方法：蒸留水で洗浄した直後、窒素ガスで乾燥させ、SAM膜形成まで蒸留水に浸漬させ保管する。この保管は、1時間以内とした。

（3）SAM膜の形成：エタノールで溶解した1mmol/L（ 10^{-3} モル/リットル）の5-Carboxy-1-decanethiol（5-カルボキシ-1-デカンチオール）を滴下し、25の恒温槽内において1時間浸漬させる。

20

（4）未反応物の除去：エタノールで電極表面を洗浄し未反応物を除去する。

（5）活性化：蒸留水で洗浄後、NHS（N-ヒドロキシコハク酸イミド）水溶液、WSC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド）水溶液の混合溶液（1：1）を滴下し、25の恒温槽内において1時間浸漬させる。

（6）抗体16aの固定：リン酸緩衝生理食塩水（PBSと呼ぶ。）で洗浄後、PBSで希釈した抗体16aを滴下し、25の恒温槽内において30分間浸漬させる。

（7）不活性化：PBSで洗浄後、25の恒温槽内において20%エタノールアミン水溶液に1時間浸漬し、残った活性エステルを不活性化する。

（8）ブロッキング処理：蒸留水で洗浄後、1%BSA水溶液を滴下し、4で90分間浸漬する。

30

【0039】

図5は、本発明の第2の実施形態に係る共振型質量センサ10における振動体12の共振周波数の時間変化を示す図であり、図6は、抗原抗体反応時における振動体12の共振周波数の変化を示す図である。

図5に示すように、共振型質量センサ10では、振動体12が液体又は気体の被測定サンプルに曝されると、被測定サンプルに含まれる特定の分子、例えば抗原16bが抗原-抗体反応のような免疫反応（イムノアッセイとも呼ばれている。）によって捕捉され、振動体12の質量が増加する。その結果、図6に示すように、振動体12の共振周波数が低下する。その変化割合から被測定サンプル中の特定の化学物質濃度を推定することができる。振動体12の共振周波数の変化は、図1の共振型質量センサ1と同様に検出部5により検知される。例えば、検出部5としてレーザー変位計などを用いた場合には、振動体12の共振周波数の変化を非接触で計測することができる。

40

尚、上記説明においては、梁状振動体12にSAM膜を形成して抗体16aを修飾したが、梁状振動体12に抗原16bを修飾してもよい。

【0040】

本発明の共振型質量センサ10では、上記した被測定サンプルに含まれる特定の分子の質量の測定が終了した後、抗体16aを固定化した振動体12を再利用することができる。使用済みの抗体固定化振動体12を、所定濃度の抗原解離液に浸すと、例えば数分で被測定分子である抗原16bが除去され、他励共振式の共振型質量センサ10を再利用できるようになる。抗原解離液の濃度は、測定する抗原16bの種類によって決めることがで

50

きる。

【0041】

(第3の実施形態)

図7は、本発明の第3の実施形態に係る共振型質量センサ20の構成を示すブロック図である。

図7に示す共振型質量センサ20が、図1の共振型質量センサ1と異なるのは、振動体22が磁性特性を有している点である。振動体22には、磁性を帯びた被測定サンプルを磁力により吸着して、磁性を帯びた被測定サンプルの質量を測定することができる。磁性を帯びた被測定サンプルとしては、例えば、抗原16bを含むサンプル溶液と、抗体16aと磁気粒子、例えば磁気ビーズ26とからなる磁気ビーズ溶液と、を混合した磁性を帯びた被測定サンプル溶液を用いることができる(図11参照)。

10

【0042】

振動体22としては、少なくとも一部に磁化可能な部材を含んで構成することができる。この磁化可能な部材には、抗体16a又は抗原16bが吸着した磁気ビーズ26が磁的に吸着されてもよい。振動体としては、強磁性体の振動体22を用いることができる。振動体22の材料となる強磁性体は、例えば、軟鉄、ケイ素鋼、フェライト、コバルト、ニッケル、アルニコ等である。

【0043】

(強磁性振動体の作製方法)

図8は、強磁性振動体22の作製方法を示す図である。

20

図8に示すように、強磁性材料からなる振動体を所定の共振周波数が得られる形状に加工して強磁性振動体22を作製し、次に作製した強磁性振動体22を、永久磁石28や電磁石で磁化し、つまり、着磁することにより作製できる。

【0044】

図9は、図7に示す共振型質量センサ20の振動体の変形例を示す断面図である。

図9に示すように、この強磁性振動体23は、非磁性の振動体2に磁性薄膜29を被覆した構成を有している。非磁性の振動体2は、図1に示す振動体2と同様に、圧電結晶等を用いることができる。圧電結晶としては、水晶、PZT等が挙げられる。

【0045】

(強磁性振動体の別の作製方法)

30

図10は、図9の強磁性振動体23の作製方法を示す図である。

図10に示すように、強磁性振動体23は、以下の工程により作製される。

(1) 非磁性材料からなる振動体2を所定の共振周波数が得られる形状に加工して非磁性振動体2を作製する。

(2) 作製した非磁性振動体2に磁性薄膜29を形成する。磁性薄膜29は、圧電結晶等からなる非磁性振動体2上に、鉄(Fe)、コバルト(Co)、ニッケル(Ni)等やこれらの合金からなる強磁性体蒸着法やスパッタ法を用いて形成される。

(3) 作製した強磁性振動体23を、永久磁石28や電磁石で磁化し、つまり、着磁することにより作製できる。

【0046】

40

図11(a)~(d)は、第3の実施形態に係る共振型質量センサ20の使用方法を説明する図である。

最初に抗原抗体反応を調べるために、上記の磁性を帯びた被測定サンプル溶液31を調製する(図11(a)参照)。磁性を帯びた被測定サンプル溶液31は、磁気ビーズ溶液32と、サンプル溶液33とからなる。磁気ビーズ溶液32には、抗体の16aを予め吸着させた磁気ビーズ26が含有されている。一方、サンプル溶液33には抗体被測定対象物である抗原16bが含有されている。磁気ビーズ溶液32とサンプル溶液33の適量をよく混合させ、磁性を帯びた被測定サンプル溶液31として調製する。

次に、磁性を帯びた被測定サンプル溶液31を振動体22上に滴下し、振動体22の表面に吸着させ、よく乾燥させ、磁性を帯びた被測定サンプルを振動体22に吸着する(図

50

1 1 (b) 参照)。

振動体 2 2 に吸着した被測定サンプルの共振周波数変化を測定する (図 1 1 (c) 参照) 。 さらに、予め、磁気ビーズ溶液 3 2 のみを振動体 2 2 又は同 2 3 に滴下し、よく乾燥させ、その際の共振周波数を測定しておく。次に、磁性を帯びた被測定サンプル溶液 3 1 を振動体 2 2 又は同 2 3 に滴下し、よく乾燥させ、その際の共振周波数の変化を算出することにより抗原 1 6 b の質量を測定することが可能となる。振動体 2 2 としては、図 9 に示す振動体 2 3 でもよい。以下の説明でも同様である。

【 0 0 4 7 】

次に、振動体 2 2 の磁性を無くすこと、つまり消磁により、振動体 2 2 に付着した磁性を帯びた被測定サンプルを振動体 2 2 から取り外すことができる (図 1 1 (d) 参照)。

10

【 0 0 4 8 】

抗原抗体反応を使用したバイオセンサとしては、振動体 2 2 のセンシング部分 (自由端) に抗体 1 6 a を固定化しておき、抗原抗体反応で特定の分子を捕捉する。振動体 2 2 に被測定物質 (抗原 1 6 b) が捕捉されると、その質量に応じて共振周波数が低くなるため (図 5 参照) 、周波数変化から微量な質量変化を求めることができる (図 6 参照)。

【 0 0 4 9 】

第 3 の実施形態に係る共振型質量センサ 2 0 によれば、振動体 2 2 の磁性を消磁することにより振動体 2 2 に付着した磁性を帯びた被測定サンプルを、振動体 2 2 から取り外すことができる。このため振動体 2 2 の再利用がより一層容易となる (図 1 1 (d) 参照) 。 この方法では、抗体 1 6 a を修飾した磁気ビーズ 2 6 を変更すれば、同一の振動体 2 2 で

20

複数の被測定物質の測定が可能となる。

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

【実施例】

【 0 0 5 0 】

(振動体の製作)

最初に図 1 の振動体 2 の作製を行った。振動体 2 の材質を A T カットの水晶板とし、横振動モードの 1 次モードの共振周波数が 1 4 0 ~ 1 6 0 k H z 程度となるように、0 . 4 m m × 0 . 4 m m × 5 m m の寸法とした。A T カットの水晶板は、水晶の Z 軸から 3 5 ° 1 5 ' 傾けた面に平行にカットされた板である。図 1 2 は、作製した振動体 2 の外観を示す光学像である。

30

【 0 0 5 1 】

図 1 3 は、実施例で作製した共振型質量センサ 1 の構成を示すブロック図である。

図 1 3 に示すように、共振型質量センサ 1 は、振動体 2 及び振動子 3 と、振動体 2 及び振動子 3 が載置される X Y Z テーブル 6 と、振動子 3 を駆動する発振器 4 a と、検出部 5 と、観察部 7 と、を含んで構成されている。振動子 3 は、直径が 2 0 m m で、厚さが 0 . 5 m m の円板形状の圧電素子 (N E C トーキ (株) 製、材質、N 2 1) を使用した。検出部 5 は、レーザードップラー振動計 5 a (電子技研工業 (株) 、 V 1 0 0 - S) とオシロスコープ 5 b とで構成されている。観察部 7 は、C C D カメラ 7 a ((株) キーエンス製、V H - 5 0 0 0) とモニタ用のディスプレイ 7 b とで構成されている。

40

【 0 0 5 2 】

圧電素子からなる振動子 3 と X Y Z テーブル 6 (シグマ光機 (株) 、 T S D - 8 0 5 S) との間にはスポンジ 8 が挿入されており、振動子 3 の振動を妨げないようにされている。以下の説明では、振動子 3 は圧電素子として説明する。

【 0 0 5 3 】

レーザードップラー振動計 5 a のスポット径は 4 0 μ m である。C C D カメラ 7 a で観察しながら X Y Z テーブル 6 の位置を調整することで、レーザードップラー振動計 5 a により振動体 2 の自由端の振動速度を計測するよう位置決めをした。

【 0 0 5 4 】

圧電素子 3 には、発振器 4 a (岩通計測 (株) 、 S G - 4 1 0 4) で交流電圧を印加し、圧電素子 3 を振動させた。圧電素子 3 の振動を受けることで、その上に置かれた梁状の

50

振動体 2 が共振する。つまり、圧電素子に梁状振動体 2 の固有周波数付近での交流電圧を加えると、振動体 2 は自らの固有周波数で共振する。この振動体 2 の振動速度特性をレーザードップラー振動計 5 a を用いて測定した。

【 0 0 5 5 】

オシロスコープ（岩通計測（株）製、DS - 5 1 2 0 B）により発振器 4 の出力信号とレーザードップラー振動計 5 a で測定した振動速度を観察した。

【 0 0 5 6 】

（共振型質量センサの周波数特性）

共振型質量センサ 1 の基本特性を評価するために、共振周波数と負荷質量の関係を測定した。振動体 2 の端に板おもり（景山産業（株）製、厚さ 0 . 1 m m）を負荷として接着固定し、周波数特性を測定した。測定条件を纏めて表 2 に示す。

【表 2】

印加電圧 (V)	7.07
振動体の共振周波数 (kHz)	142.5
振動体の質量 (mg)	2
板おもりの質量 (mg)	0.5,1.0, 1.5,2.0
振動体の速度変換係数 (m/sV)	0.02

【 0 0 5 7 】

図 1 4 は、振動体 2 の共振周波数と負荷質量の関係を示す図である。図の横軸は負荷質量（mg）を、縦軸は周波数を示している。測定値（印）に対する近似直線を実線で示している。表 3 に負荷質量に対する共振周波数の測定値を示す。

図 1 4 及び表 3 に示すように、負荷質量が無い場合の共振周波数は、1 4 2 . 5 k H z であり、負荷質量の増大に伴って共振周波数が低下することが分かった。

10

20

30

【表 3】

負荷質量 (mg)	共振周波数 (kHz)
0.0	142.5
0.5	124.0
1.0	113.0
1.5	108.0
2.0	86.0

10

【 0 0 5 8 】

(蛋白質を用いた質量測定)

ウシの血清から精製した蛋白質である B S A を、振動体 2 に付着させ、そのときの共振周波数変化を測定した。

20

B S A をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で希釈し、B S A 溶液とし、0 . 5 % B S A 溶液、3 . 0 % B S A 溶液、5 . 0 % B S A 溶液を調製した。B S A 溶液の総蛋白分析には、総蛋白質量キット (Bio - Rad 社製、DCプロテインアッセイ) とマイクロプレートリーダー (Perkin Elmer Inc. 社製、ARVO MX) を用いた。

図 1 5 は、B S A の付着工程を示す図である。図 1 5 に示すように、振動体 2 が試料台 4 1 上に載置され、次に、5 μ l の B S A 溶液 4 3 を振動体 2 に滴下した。振動体 2 に滴下した B S A 溶液 4 3 を、1 時間放置して乾燥することにより、B S A 4 4 が振動体 2 に付着する。試料台 4 1 から振動体 2 を剥離することにより B S A 4 4 を付着した振動体 2 が得られる。

【 0 0 5 9 】

30

図 1 6 は、振動体 2 の質量変化と共振周波数変化の関係を示す図である。図において、横軸は質量変化 m (m g)、縦軸は共振周波数変化 f (k H z) である。表 4 に、質量変化と共振周波数変化の関係を纏めて示す。

表 4 に示すように、P B S 溶液を付着した場合の質量変化は 0 . 0 3 m g であり、周波数変化は、1 . 2 7 k H z であった。

0 . 5 % B S A 溶液 4 3 を付着した場合の質量変化は 0 . 0 4 m g であり、共振周波数変化は、1 . 5 9 k H z であった。

3 . 0 % B S A 溶液 4 3 を付着した場合の質量変化は 0 . 0 7 m g であり、共振周波数変化は、2 . 8 8 k H z であった。

5 . % B S A 溶液 4 3 を付着した場合の質量変化は 0 . 0 9 m g であり、共振周波数変化は、3 . 4 2 k H z であった。

40

【表 4】

	PBS 溶液	0.5% BSA溶液	3.0% BSA溶液	5.0% BSA溶液
質量変化 $\Delta m(\text{mg})$	0.03	0.04	0.07	0.09
共振周波数 変化 $\Delta f(\text{kHz})$	1.27	1.59	2.88	3.42

10

【0060】

上記の測定結果から、BSA溶液43を付着したときの質量の計測感度は、 31.25 ng/Hz と求まった。なお、振動体2の両端にそれぞれ同じ質量のおもりを載置させて測定した質量の計測感度は、 38.88 ng/Hz であった。

【0061】

図17は、振動体2を示す断面図であり、(a)は、おもり45が載置された振動体2、(b)は、BSA溶液43を付着した振動体である。

20

図17に示すように、BSA溶液43を付着したときの質量感度が、おもり45を載置した場合よりも小さいのは、BSA溶液43が振動体2の全体面に付着し、この付着範囲が振動体2全体に広まったことから振動体2の振動時の断面二次モーメントが異なったためと考えられる。

【0062】

(唾液に含まれる総蛋白質の濃度測定)

次に、唾液に含まれる総蛋白質の濃度測定について説明する。

唾液の採取は、以下のように行った。

(1) 4名の被検者から、唾液を採取した。

30

(2) 採取した唾液を遠心分離し、上澄み $300 \mu\text{l}$ を取り出した。

(3) 総蛋白分析には、総蛋白質量キット(Bio-Rad社製、DCプロテインアッセイ)とマイクロプレートリーダー(Perkin Elmer Inc.社製、ARVO MX)を用いた。最も濃度の高い唾液を選択し、以下の実験に用いた。

図18は、別途測定しておいた総蛋白濃度とマイクロプレートリーダーの吸光度の関係を示す検量線である。

図18に示す相関関係を用いて、吸光度を総蛋白濃度に換算した。

(4) 選択した唾液(サンプル溶液)は、遠心エバポレータを用いて濃縮し(37、15~30分)、2倍濃縮、4倍濃縮のサンプル溶液を作った。

【0063】

40

(5) サンプル溶液 $5 \mu\text{l}$ を水晶からなる振動体2に滴下し、25で1時間乾燥させた。

(6) 図13に示す共振型質量センサ1を用いて、唾液を付着させた振動体2の共振スペクトルを、以下の条件においてスペクトラムアナライザで測定した。

印加電圧： 7.07 [V]

測定範囲：共振周波数の前後 5 [kHz]

(7) 洗剤を用いて水晶からなる振動体2に付着しているサンプルを洗浄した。

(8) 水晶からなる振動体2を乾燥させた。

(9) (1)~(8)の手順を各サンプルで行った。

【0064】

50

図19は、総蛋白濃度0.2(mg/μl)の唾液を用いた時の振動体2の共振スペクトルを、スペクトラムアナライザで測定した結果を示す図である。図の横軸は周波数(kHz)、左縦軸は振幅($\times 10^{-5}$ m/s)、右縦軸は位相(°)である。振動体2の共振周波数は、付着物が無い時の143kHzから145.7kHzに2.7kHz変化したことが分かる。

【0065】

図20は、サンプル溶液の総蛋白濃度と振動体2の共振周波数の関係を示す図である。図の縦軸は共振周波数変化(kHz)、横軸は総蛋白濃度(g/ml)である。図20に示すように、共振周波数変化 f (kHz)は、下記(4)式で表される。

【0066】

【数4】

$$f = 13.127 \times TP \quad (4)$$

【0067】

ここで、 TP は、総蛋白濃度(g/ml)である。

【0068】

図20に示すように、総蛋白濃度が0.1(g/ml)における共振周波数変化が1.3172kHzであるので、総蛋白濃度の計測感度は、76.2(μ g/ml)/Hzと求まる。共振周波数変化の測定に用いたレーザードップラー振動計5aの周波数分解能は1mHz(10^{-3} Hz)であるので、計測可能な総蛋白濃度は、76.2(ng/ml)と推定される。

【0069】

上記結果から、本発明の共振型質量センサ1によれば、唾液中に含有される微量な蛋白質の濃度を測定できる計測感度を有していることが分かった。

【0070】

本発明は、上記実施例に限定されることなく、特許請求の範囲に記載した発明の範囲内で種々の変形が可能であり、それらも本発明の範囲内に含まれることはいうまでもない。

【符号の説明】

【0071】

1, 10, 20 : 共振型質量センサ

2, 12, 22, 23 : 振動体

3 : 振動子

4 : 電源

4a : 発振器

5 : 検出部

5a : レーザードップラー振動計

5b : オシロスコープ

6 : XYZテーブル

7 : 観察部

7a : CCDカメラ

7b : モニタ用のディスプレイ

8 : スポンジ

12 : 抗体固定化振動体

16 : 分子認識素子

16a : 抗体

16b : 抗原

22, 23 : 強磁性振動体

24 : 磁気粒子

26 : 磁気ビーズ

28 : 永久磁石

10

20

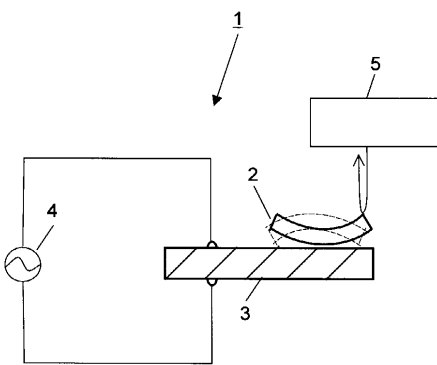
30

40

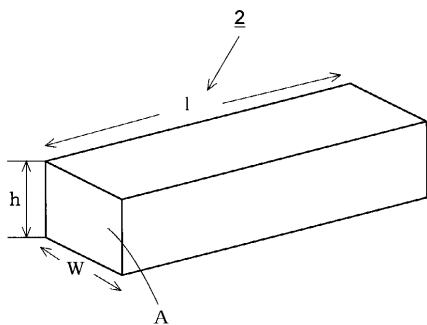
50

- 2 9 : 磁性薄膜
- 3 1 : 磁性を帯びた被測定サンプル溶液
- 3 2 : 磁気ビーズ溶液
- 3 3 : サンプル溶液
- 4 1 : 試料台
- 4 3 : B S A 溶液
- 4 4 : B S A
- 4 5 : おもり

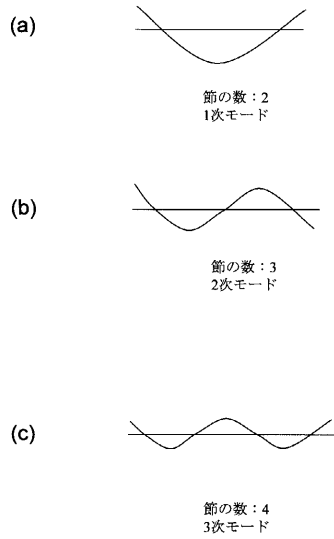
【 図 1 】



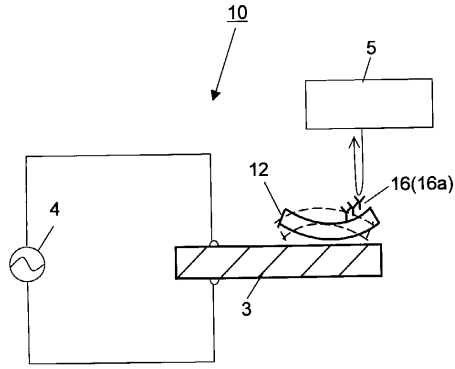
【 図 2 】



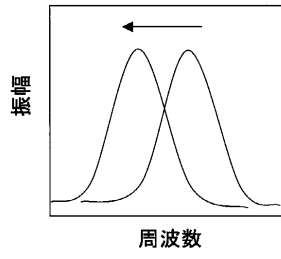
【 図 3 】



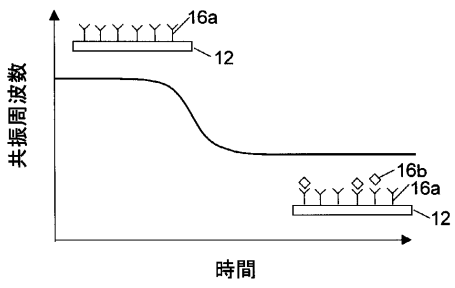
【図4】



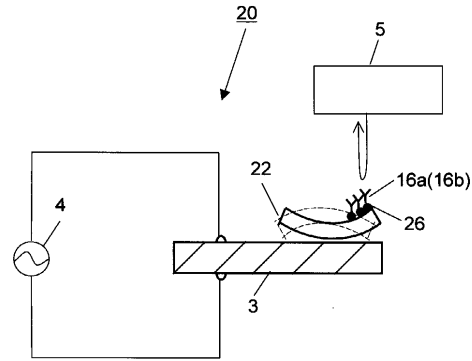
【図6】



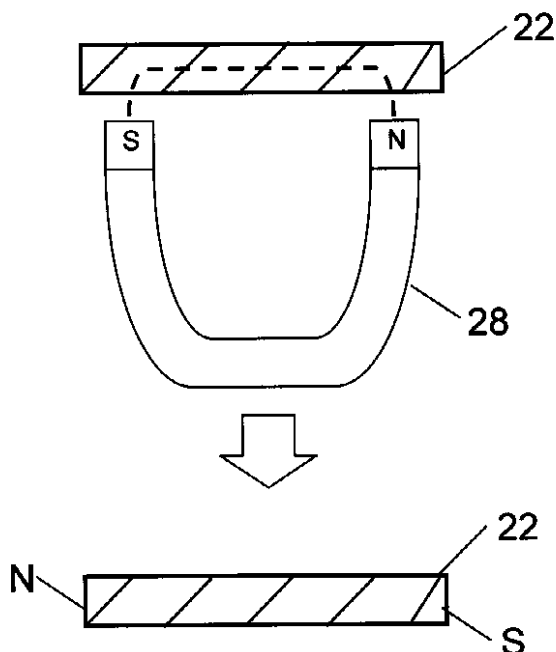
【図5】



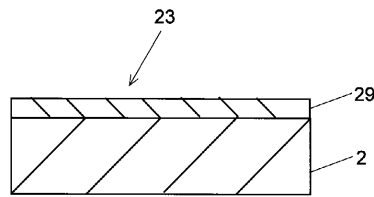
【図7】



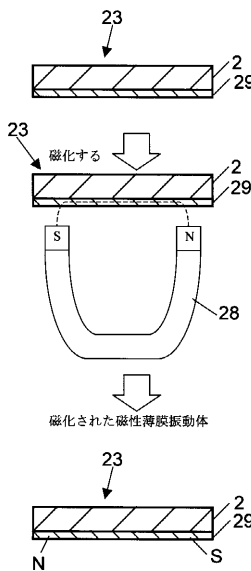
【図8】



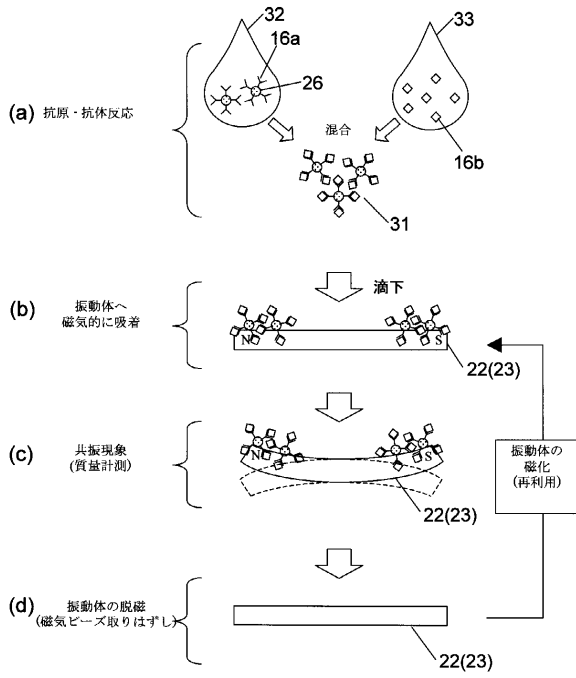
【図9】



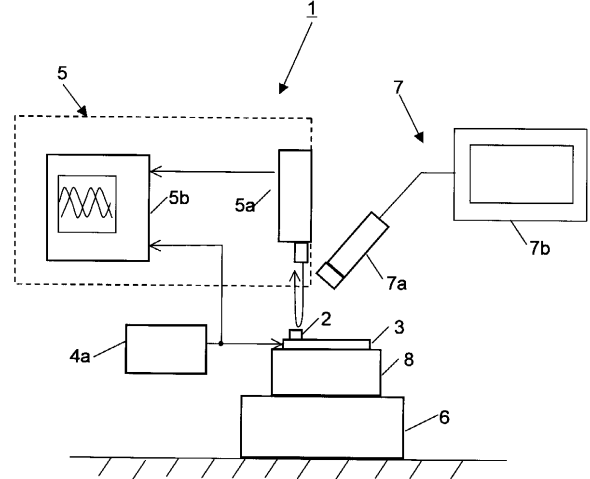
【図10】



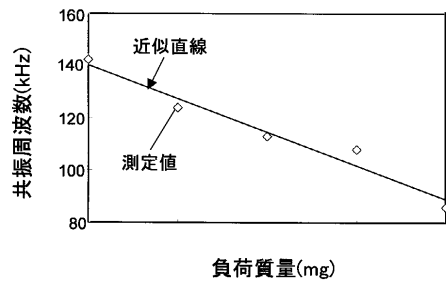
【図11】



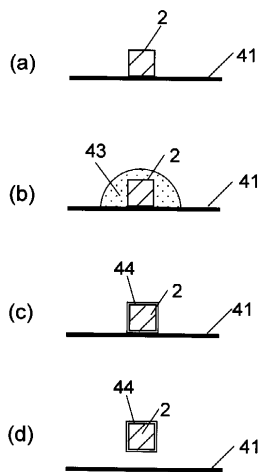
【図13】



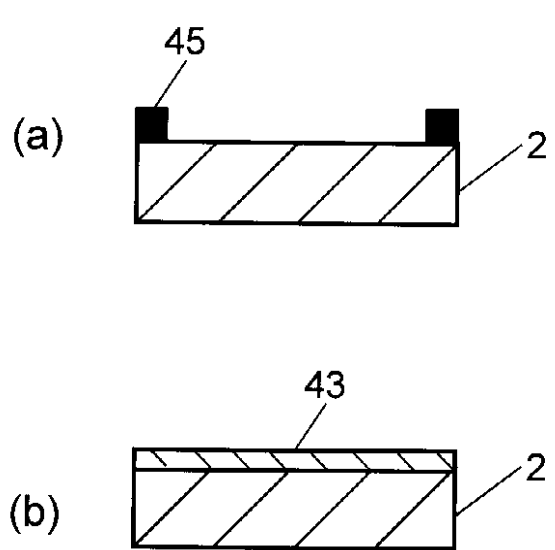
【図14】



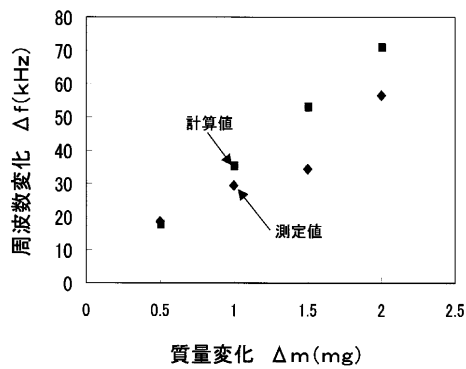
【図15】



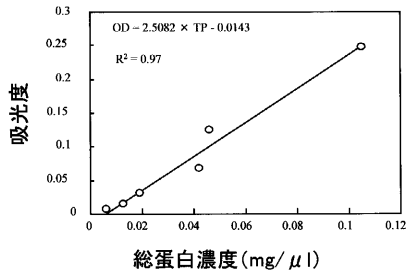
【図17】



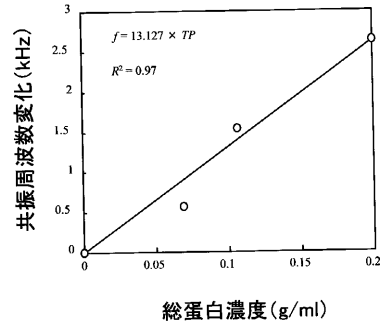
【図16】



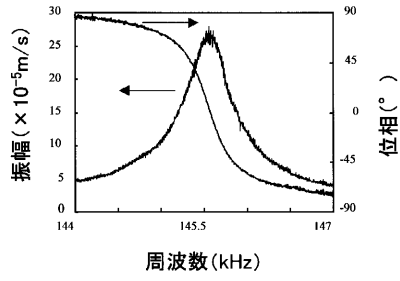
【 図 1 8 】



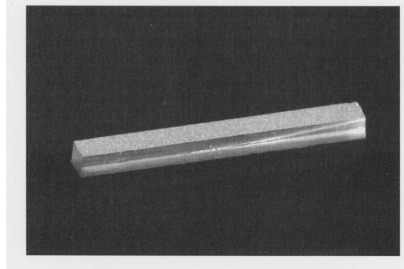
【 図 2 0 】



【 図 1 9 】



【 図 1 2 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開2008-026099(JP,A)
特表2009-531678(JP,A)
特開2008-261838(JP,A)
特開2007-093239(JP,A)
特開2007-010518(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 5/02
G01N 33/48 - 33/98