

Readout

HORIBA Technical Reports

特集 高機能分析

March 1999 ■ No.18

微小領域の化学量のイメージング 光走査型化学顕微鏡 ---イメージングにより広がる分析情報---

Imaging of minuscule amounts of chemicals,
Scanning Chemical Microscope
---Increasing analysis information through scanning---

野村 聡
Satoshi NOMURA

(Page22-27)

株式会社 堀場製作所

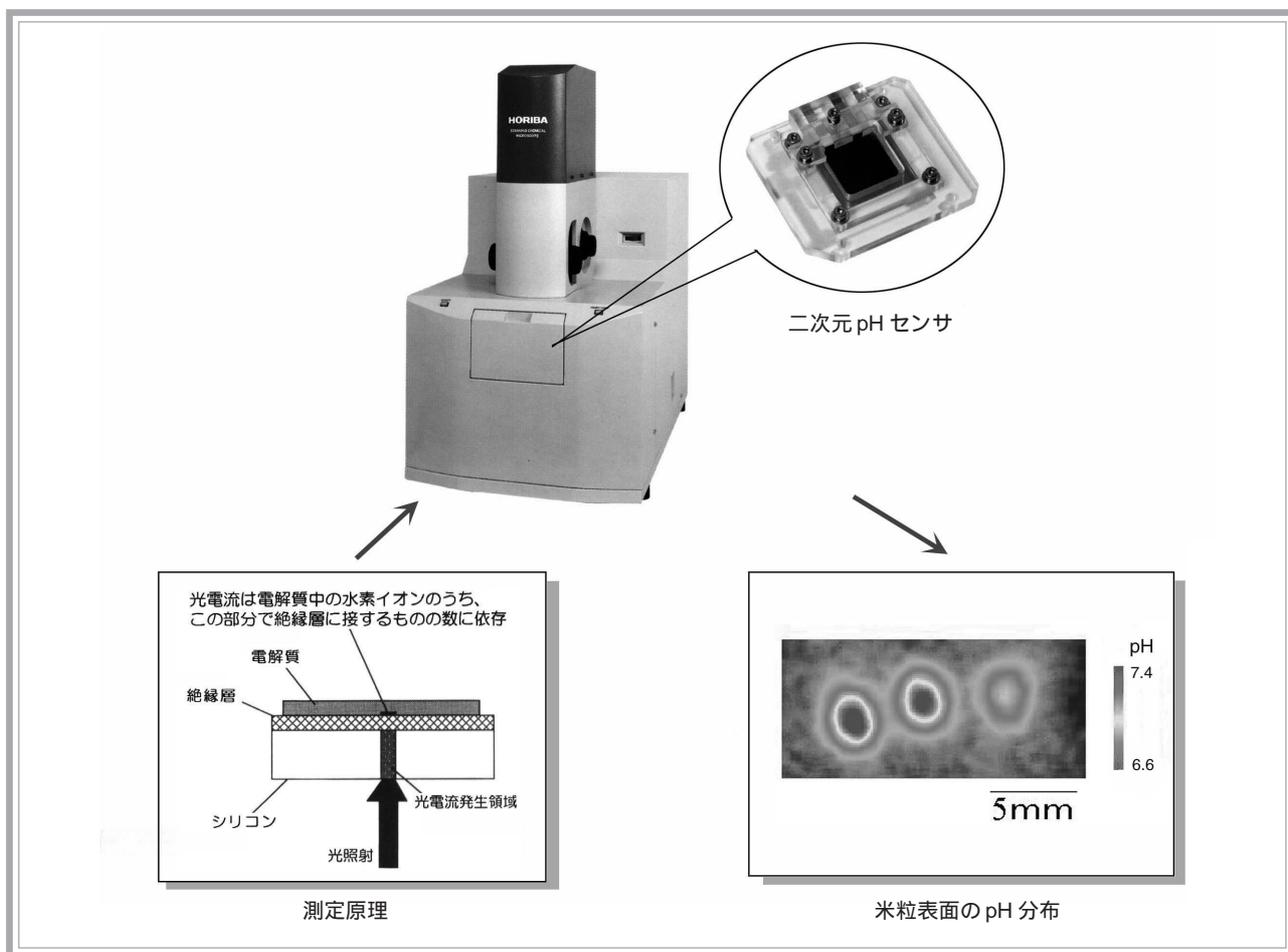
微小領域の化学量のイメージング 光走査型化学顕微鏡

--- イメージングにより広がる分析情報 ---

*Imaging of minuscule amounts of chemicals,
Scanning Chemical Microscope*

--- Increasing analysis information through imaging ---

野村 聡



要旨

半導体を利用した平面型のセンサを用いて、微小な複数の測定点での pH 値を独立して測定し、pH 画像として表示することができる光走査型化学顕微鏡を紹介する。この顕微鏡は pH 測定技術に微小部分分析の概念と、イメージング(画像化)の概念を導入したもので、化学量のイメージング技術として、これまで得られなかった情報を得ることができる技術である。本顕微鏡の測定原理や装置構成を解説するとともに、この顕微鏡によって行なった化学量イメージングの例を紹介する。

Abstract

We have developed a Scanning Chemical Microscope for observing microscopic pH distribution. This microscope employs a two-dimensional pH sensor based on an electrochemical-semiconductor principle, which functions as an array of sensing parts. Each pH value is measured, converted, and then displayed as a pH image. Chemical imaging using this new microscope is expected to contribute to various fields of research. Some examples of imaging are introduced together with a set-up of the instrument.

1. はじめに

光学顕微鏡に始まり、電子顕微鏡、プローブ顕微鏡に至る顕微鏡技術の進歩は、分子や原子のレベルまで微小な領域の形状や構造などを観察することを可能とした。一方で、形状や構造といった物理量の観察が満足されると、観察した領域の元素分布や組成などの化学量を知りたいという要求が生じ、種々の微小部分分析技術が開発されている¹⁾。さらに、複数点での測定結果を位置情報と併せて表示することで分析結果をイメージング（画像化）しようとする試みも行われている。例えば、生物学の分野では、細胞内のカルシウムの分布をイメージングする技術が、生体機能の解明に貢献している²⁾。このような化学量のイメージング技術は、形状観察のみでは得られない情報をわかりやすく、説得力のあるデータとして表示することができ、今後の大きな発展の可能性を秘めている。

当社は、創業以来培ってきた pH 測定技術に、微小部分分析とイメージングによる新たな化学分析の概念を導入することを試みている。そして、半導体を利用した平面型のセンサを用いて、微小領域の pH を複数点で独立して測定し、得られた pH 値を位置座標に対応させてグレースケールや擬似カラーに変換して化学画像として表示する光走査型化学顕微鏡を実用化した。従来、pH 測定は均一な溶液状のサンプルを対象とするものであったが、本稿で紹介する光走査型化学顕微鏡の開発により、pH 測定技術のみならず、化学イメージングと言う計測分野をさらに発展させることが期待できる。本顕微鏡の測定原理や装置構成を解説するとともに、この顕微鏡によって行った化学イメージングの例を紹介する。

2. 光走査型化学顕微鏡

2.1 動作原理

光走査型化学顕微鏡の装置構成を図 1 に示す。本顕微鏡では、平面型の半導体 pH センサを複数の独立したアレイセンサとして機能させ、溶液の pH 値に依存する信号を各測定点で検出する。各測定点の信号強度を位置に対応させて並べるとともに、これらの値をカラースケールに変換し pH の分布を画像として表示する。複数点での測定が可能であるため、溶液中に pH の不均質な偏りが生じている場合には、その分布を観察できる。

平面型 pH センサは、1988 年に Hafeman らによって報告された LAPS (Light Addressable Potentiometric

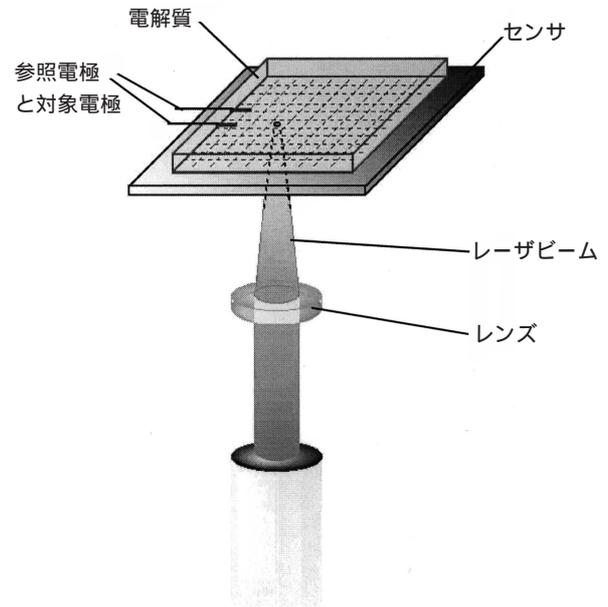


図 1 光走査型化学顕微鏡の構成

Set-up of the scanning chemical microscope

Sensor)³⁾と呼ばれる新規のポテンシオメトリックセンサを用いる。LAPSは絶縁体(SiO₂/Si₃N₄)/半導体(Si)からなる構造で、Si₃N₄ 面上に測定対象の電解質を載せ、Si₃N₄ 面と電解質の接触面で pH 測定を行う。このセンサを動作させるためには、シリコンと電解質間にバイアス電圧を印加した状態でシリコン面に光照射を行う。この時シリコン内に発生する光電流の特性は、Si₃N₄ 面で接する電解質中の pH に依存して定量的に変動することから pH の測定が可能となる。ところでこの光電流は、光を照射された部分のみで発生するため、光照射のスポットを小さく絞れば、照射点での pH のみを反映した信号を得ることができる。この照射スポットを走査すれば、1 個の平面センサを複数の pH の測定点に分割しアレイセンサとして機能させることができる^{4,5)}。

2.2 装置構成

本顕微鏡の装置本体は、顕微鏡筐体にレーザー光源と XY ステージを取り付け、ステージに LAPS (以下センサと呼ぶ) を装着できるような構造をとる。レーザー光は個々の測定点を微小にするために対物レンズで集光されて、センサ下部に照射される。センサをステージに載せて走査しながらレーザー光の変調周波数と同期させて光電流を測定すると、複数点での光電流が順に検出できる。

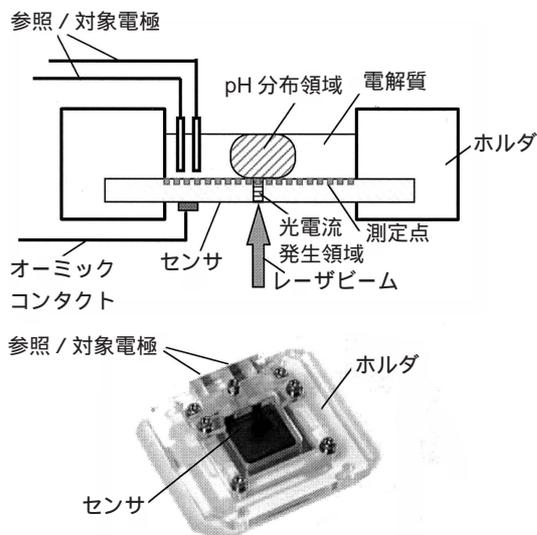


図2 光走査型化学顕微鏡で用いる二次元pHセンサ
 Sensor part for scanning chemical microscope
 センサーは各々の測定点()に分割されたのと等価な機能を果たす。

センサ部分を図2に示す。センサとホルダがそれぞれ、pHが測定される電解質溶液槽の底面と壁を形成するような構造をとる。センサの測定面サイズは2.5cm四方で、この範囲内であれば任意の四角形の領域を設定し、100 μm以上の任意の間隔で複数点測定できる。センサを動作させるためのバイアス電位は、センサ裏面と電解質溶液に挿入された銀/塩化銀の参照電極の間に、装置本体のポテンショスタットで印加される。光照射で発生した光電流は、白金対極とオーミックコンタクトによって検出される。

光電流値のpH値への変換は、pH既知の複数の溶液での光電流測定から、1pH当たりの信号値の変化量を算出し、その変化量を用いて行われる。

2.3 分析能力

本装置の性能として、pH分解能として0.1pH、また、位置分解能としては100 μmが達成されている。さらに、6.4 mm × 6.4 mmの領域を100 μmの分解能で測定するのに要する時間は約30 sである。なお、特定ライン上のpH分布のみを1次元像を得る場合には、1cm/s程度での測定が可能である。⁶⁾

3. 光走査型化学顕微鏡の応用例

3.1 pH分布が形成される現象の解析

電解質中に種々の化学反応によってpH分布が形成される簡単な実験を行い、その時形成されたpH分布を光走査型化学顕微鏡にて観察した例を紹介する。

3.1.1 酸溶液によって形成されたpH分布の観察

3.0%の寒天と0.1Mの塩化カリウム溶液からなる厚さ2mmの寒天ゲルの層(以下ゲル層と表記)をセンサ上に形成し、0.1Mの塩酸10 μlをゲル層上部に滴下した(図3a)。また、同様の実験として、直径0.4mmガラスビーズをセンサホルダに充填し、0.1Mの塩化カリウム1mlを満たした状態で、1Mの乳酸溶液30 μlを滴下した(図3b)。酸溶液滴下後、センサ上の複数点にて3分間隔で測定を行い、その結果を画像化して表示した(図4)。

いずれの場合もpHが低下した領域(酸性化領域)が、時間とともに拡散する様子が観察できた。寒天フィルムの場合には、この領域は円形であり拡散方向も均等であった。一方、ガラスビーズ層の場合には形状が崩れており、広がり方も当局的でない。ここで観察したpH分布は、寒天層やビーズ層の最下面でのものであるが、その観察によって寒天がマトリクスとしては均質であるのに対して、ビーズ層ではマトリクスとしての性質が寒天と異なるため、酸溶液の拡散に違いが出たということを示唆している。このような違いを観察できたことが、イメージングの大きな特徴であるといえる。類似の応用例として酸滴のかわりに、カ

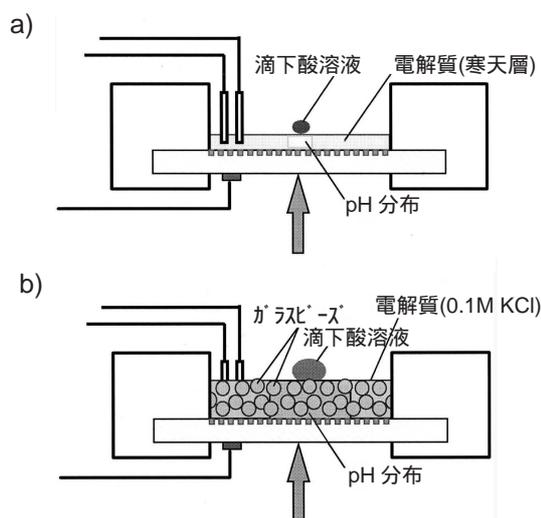


図3 酸溶液によって形成されたpH分布の観察

Imaging of pH distribution formed on the agar film by the addition of an acid solution

電解質: a) 寒天ゲル層
 b) ガラスビーズ分散層

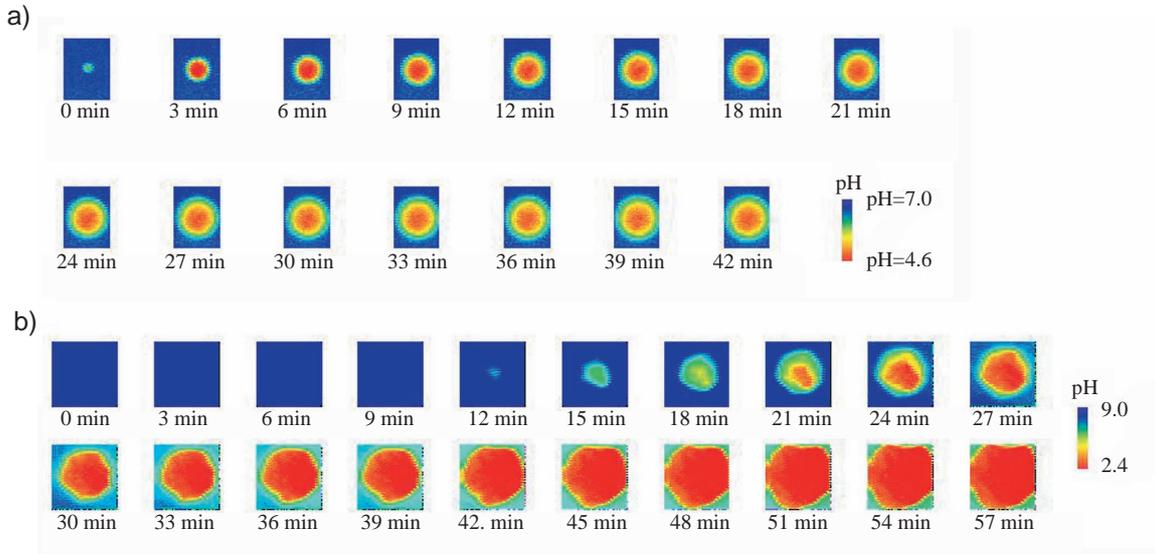


図4 酸溶液によって形成された pH 分布

pH distributions formed on the agar film by the addition of an acid solution

a) 塩酸溶液の寒天ゲル層透過によって形成された pH 分布

測定領域：19.2mm × 14.0mm，測定点数：48点 × 45点

b) 乳酸溶液のビーズ充填層透過によって形成された pH 分布

測定領域：20.0mm × 20.0mm，測定点数：50点 × 50点

(測定・実験データ提供：東北大学大学院工学研究科 千田教授，井上助教授，楊氏)

チオン交換樹脂一粒を寒天層の上に設置する，微生物コロニーを培養する，あるいは寒天層に挿入した白金電極により電気分解を行い，形成された pH 分布を観察して，イオン交換樹脂のイオン交換反応や交換容量の解析^{6,7)}，微生物コロニーの代謝状態の評価⁸⁾，電気分解過程の解析⁹⁾等を行った例がある。

3.1.2 金属腐食現象の解析

1.5%の寒天と生理食塩水からなる厚さ1mmのゲル層をセンサ上に形成し，この上に縦 10mm × 横 5mm × 厚さ 2mmの磁性ステンレス (19Cr-2Mo) と非磁性ステンレス (16Cr-13Ni-2Mo) を接合させたサンプルを載せた。その結果ゲル中に金属の接合面の形状に準じた酸性化領域とアルカリ化領域が形成され，その分布が変化する様子が観察できた。(図5)

1.5%の寒天と0.1Mの塩化カリウムからなる厚さ1mmのゲル層をセンサ上に形成し，その上に，半分が銅をめっきされた長さ 1mm の鉄くぎ 2 本を設置した。くぎサンプルは，一方は頭の部分に，また，もう一方は先端部分に銅がメッキされたものを用いた。塩化アンモニウム銅(II)二水和物の溶液にくぎを浸してメッキした¹⁰⁾。

くぎは頭の部分と先端の 2 点でゲルに接触するように設置したが，接触部分に pH 分布が形成され，時間とともに変化する過程が観察された。(図6)

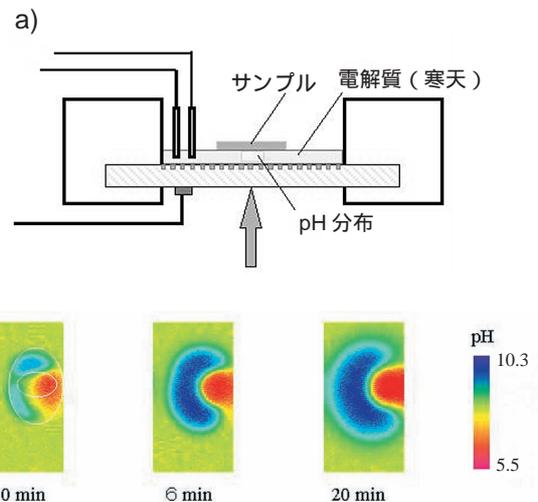


図5 pH 分布画像を用いた異種金属の接合部の評価

Evaluation of metal sample (ferromagnetic stainless steel)

a) 実験系：センサ部の構成は図2と同じ。

電解質は0.9%塩化ナトリウム溶液をゲル化。

b) 得られた pH 分布

測定領域：15.0mm × 7.5mm，測定点数：150点 × 75点

白丸はサンプル設置場所を示す。

(サンプル提供：愛知学院大学 歯科理工学教室 伴先生)

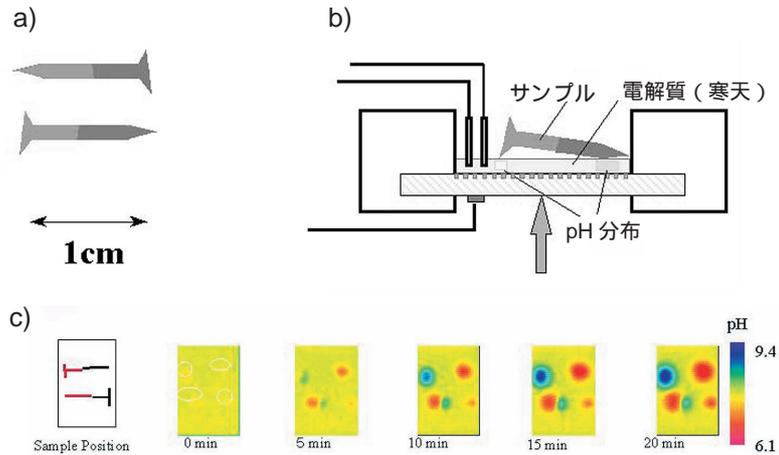


図6 pH分布画像を用いためっき層の評価

Evaluation of metal coating using pH imaging

a) サンプル：銅がコーティングされた鉄くぎ

b) 実験系：センサ部の構成は図2と同じ。

電解質は0.1M塩化カリウム溶液をゲル化。

c) 得られたpH分布

測定領域：15.0mm × 10.0mm

測定点数：150点 × 100点

白丸はサンプルがゲルに接触した場所を示す。

これらの実験で得られた結果は、金属が溶液に接した時に生じる腐食反応を経時的にかつ、ビジュアルに捕らえたもので、金属の局部を観察する手段として、化学イメージングの利点を示すものである。

3.2 固体表面の分析 米粒の鮮度評価

上述の化学反応の解析ツールとしての展開と平行して、我々は本顕微鏡の固体表面分析技術としての可能性の検討をこころみている。

例えば、ゲル層をセンサ上に置き、この層の上に収穫年度の異なる米粒を置くことによって形成されたpH分布を図7に示す。米粒表面の酸性物質の量が粒

の鮮度に依存することが知られているが⁽¹¹⁾、光走査型化学顕微鏡を用いたこの実験では米粒の鮮度に応じたpH分布の形成が確認できた。

この実験で可視化したものは、あくまでもゲル中の酸性化領域であるが、得られた情報は米粒の表面状態を強く反映している。我々は、米粒のほかにも、セラミクス、布、フィルムなど種々の固体サンプルについて本顕微鏡でpH分布を可視化し表面状態と密接な関係があることを確認している。このことから、本顕微鏡が種々の固体表面の評価に適用できる高い可能性を秘めているといえることができる。

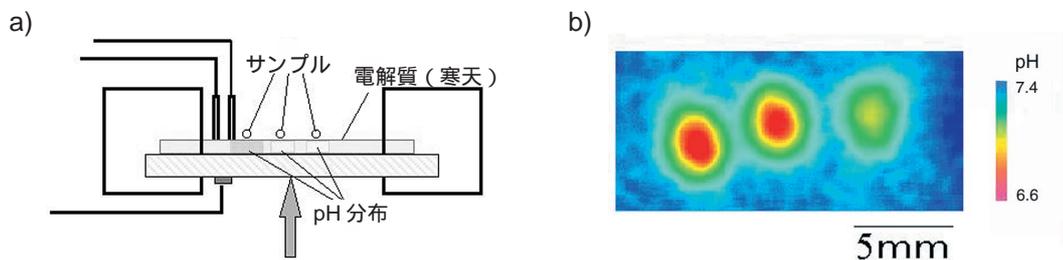


図7 pH分布画像を用いた米粒の新鮮度評価

Evaluation of rice grains using pH imaging

a) 実験系：センサ部の構成は図2と同じ。

電解質は0.1M塩化カリウム溶液をゲル化。

b) 得られたpH分布

測定領域：7.1mm × 16.8mm, 測定点数：71点 × 168点

(サンプル提供：京都女子大学 八田助教授)

4. おわりに

以上、光走査型化学顕微鏡と本顕微鏡を用いた化学イメージングの例を紹介した。化学反応を起こしてその結果を観察した実験からは、他の技術では容易に観察できない現象を、説得力のある一連の化学画像として示すことができた。また、米粒など身近な固体サンプルへの適用も可能であることを確認できた。

本顕微鏡は、数値データだけでは理解しにくい化学的情報を説得力ある画像として表現することにより、これまで得られなかった新たな知見を引き出せることが期待される。今後も本顕微鏡の新たなアプリケーション開拓を行って化学イメージングのニーズ拡大と、より効果的な化学イメージング技術の開発に取り組んでいきたい。

参考文献

- 1) 蛋白質・核酸・酵素, 1997年5月増刊 見る技術: 分子・細胞のバイオイメーキング(1987)
- 2) 宮川厚夫, 『バイオリアルタイム』, 蛋白質・核酸分子の in situ 同定法, pp189-199, 羊土社 1994
- 3) Hafeman, D. G., Parce, W. J., and McConnell, H. M.: Science 240,1182-5 (1988)
- 4) Nokao, M., T. Yoshinobu, T. and Iwasaki, H.: Sensor and Actuators, B20,119 (1994)
- 5) Nokao, M., Inoue, S., T. Yoshinobu, T. and Iwasaki, H.: Sensor and Actuators, B34, 234 (1996)
- 6) Nomura, S., Nakao, M., Nakanishi, T., Takamatsu, S. and Tomita, K., Anal. Chem., 69, 977-981 (1997)
- 7) 野村 聡, 中尾 基, 高松修司, 中西剛, 富田勝彦, 岩崎裕, 吉信達夫, 分析化学 47, 369-373(1998)
- 8) Yoshinobu, T., Iwasaki, H., Nomura, S., Nakao, M., Nakanishi, T., Takamatsu, S. and Tomita, K., Bioimages, 5, 143-147(1997).
- 9) Yoshinobu, T., Iwasaki, H., Nomura, S., Nakao, M., Nakanishi, T., Takamatsu, S. and Tomita, K., Jpn. J. Appl. Phys., 37, L353-355 (1998)
- 10) Trethewey, K. R. and Chamberlain J., Corrosion for Science and Engineering, Loughman, 1995, England.
- 11) 食品鑑別・検査法ハンドブック, 食品鑑別・検査法研究会編集, (株) 建帛社



野村 聡

Satoshi NOMURA

基礎技術開発部
ケミカルセンサープロジェクト
チームリーダー

