

フィルタフリー蛍光検出センサの性能向上と応用

2017年 09月

博士（工学）

崔 容俊

豊橋技術科学大学

フィルタフリー蛍光検出センサの性能向上と応用

論文概要

蛍光検出は、高感度で高い選択性を持っているため、化学、生化学、医療分野など広い分野で使用されている。しかし、蛍光観測は光学顕微鏡に蛍光フィルタなどが必要であり、大規模、高価な装置になる。したがって、その場診断などのために小型化された蛍光検出装置の実現が求められている。最近、蛍光顕微鏡で使用されている干渉フィルタと吸収フィルタを集積されたオンチップ蛍光センサなどが報告されている。しかし、製作工程が複雑で測定される蛍光の波長が固定されており、蛍光試薬の変更に伴う対応が難しい問題がある。そこで、本研究室では光学フィルタなどを必要としないフィルタフリー蛍光センサに関する研究を行ってきた。しかし、励起光と蛍光の強度比は一般に数千：1以上であるため、蛍光検出にはその分離能力向上が必要となる。

そこで、波長分離能力の性能を向上するため、low pressure chemical vapor deposition (LPCVD)の成膜温度を変更してフォトゲートの材料であるPoly-Siの表面を平坦化することで、表面の粗さの実効値(RMS)は、16.3 nm から1.6 nmまで、10分の1程度に改善することができた。その結果、励起光と蛍光の波長分離能力が800：1から1250：1まで増加して、従来の性能と比較して1.5倍の向上を確認した。この結果から、Poly-Siの表面粗さを抑制することによって、Si内部での前方散乱を減少させることができ、波長分離能力が向上したと考えられる。

波長分離能力が1250：1まで性能向上したフィルタフリー蛍光センサを用いて、fluorescein-4-isothiocyanate (FITC)とsulforhodamine 101 acid chloride (Texas Red)の蛍光検出を行った。蛍光試薬を測定するため、吸収係数の影響を最小化した

光電流ベースを用いて、パラメータ法を提案した。その結果、蛍光試薬についてサブミクロンモーラの濃度まで検出することが可能になった。また、FITCとTexas Redの混合試薬から放出する3波長の光を同時に検出する事が可能になった。その結果から、光学フィルターを使用せずにfluorescence resonance energy transfer(FRET)分析等に応用 することが可能であると考えられる。

ラベリングされた細胞を測定するため、フィルターレス蛍光センサーを用いた細胞分析システムを提案した。蛍光ラベリングされた細胞からの励起光(λ : 488 nm)と蛍光(λ : 536 nm)を分離し、提案されたパラメータを適用して、同時に光強度を検出する事が可能になった。ラベリングされた細胞からの蛍光強度は従来の蛍光顕微鏡の測定結果に比べ、4%以内の範囲で、従来の蛍光顕微鏡で観察された蛍光強度とほぼ一致する結果が得られた。そして、小型化された蛍光検出システムをため、流体素子を作製し、フィルタフリー蛍光センサに適用して評価を行っており、FITC試薬に対して以前(ディスポセル)より少量の試薬3 μL でほぼ一致する結果を得られた。そして、蛍光ビーズの分布による蛍光強度と混合されたビーズについて蛍光成分の分離が可能であることが示された。

以上の結果より、これらの結果を踏まえ、今後の研究ではフィルタフリー蛍光センサを用いて細胞等の生体観察に応用することが期待される。

Performance improvement of a filter-free fluorescence sensor and its applications

Abstract

Fluorescence analysis is widely used in biochemical analysis and medical diagnosis procedures because it is easy to use and can provide large amounts of data. Fluorescence microscopes are often used to detect fluorescence. However, they consist of an optical filter and other parts, and are generally expensive and bulky. At same time, on-chip measurements of fluorescence are required for field diagnosis and point of care testing systems, which requires the development of miniature fluorescence detection devices. Recently, on-chip fluorescence sensors have been developed that consist of optical filters integrated on photodiodes. In addition, a fluorescence sensor using buried triple p-n junction photodiodes has also been developed. Although these devices exhibit high sensitivity, the fabrication processes required to integrate the optical filters are complicated. In addition, it is difficult to deal with changes in the fluorescent solution because the detectable fluorescence wavelength is fixed. A filter-free fluorescence sensor with a photo-gate structure has been developed that can measure a wide range of wavelengths without filters by considering the depth of the light absorption in the silicon. The separation ability of excitation light and fluorescence in this sensor was 800 : 1. However, fluorescence detection requires an intensity ratio of more than 1,000 : 1 between the excitation light and fluorescence.

In order to enhance the separation ability for a filter-free fluorescence sensor, we improved the planarization of its Poly-Si surface. For the surface planarization, deposition was performed by low pressure chemical vapor deposition (LPCVD) at a low temperature, which decreased the root mean square (RMS) roughness from 16.29 to 1.63 nm. The proposed Poly-Si surface with the smaller RMS roughness reduced the scattering of the incident light in the silicon substrate. As a result, the separation ability of the filter-free fluorescence sensor was increased from 800 : 1 to 1,250 : 1 by

planarization.

Then, we describe the detection of fluorescence from Fluorescein-4-isothiocyanate (FITC-I) and sulforhodamine 101 acid chloride (Texas Red) using the filter-free fluorescence sensor in which the separation ability of the sensor is 1,250 : 1. To measure the fluorescence solution, we proposed a parameter to minimize the effect of the interference introduced by each layer. The fluorescence of submicron-molar concentrations of solutions could be detected. we also describe the simultaneous detection of three wavelengths using the sensor for the measurement of mixed fluorescent solutions. We determined it was possible to use FRET analysis with the filter-free fluorescence sensor to simultaneously measure the intensities of three wavelengths without using an optical filter.

In order to measure the labeled cells, proposed a cell analysis system and 2D fluorescence imaging system without optical filters using a 1-pixel filter-free fluorescence sensor and a 32×32 -pixel filter-free fluorescence image sensor which used wavelength dependent absorption depth in a silicon substrate. Excitation light and emission light from fluorescently labeled cells and quantum dot were separated and their light intensities were detected at the same time by measuring the photo currents according the photo-gate voltage. The detected fluorescence of cells and light emission from quantum dot were good agreement with the light intensities observed by conventional fluorescence microscopy. Also, we propose a filter-free fluorescence analysis system using a filter-free fluorescence sensor applied to microfluidic for flowing fluorescent particles and fluorescent dyes. Based on these results, future research will be expected to be applied to living body observation of cells by using a filter-free fluorescence analysis system.

目次

| | |
|---------------------------------|----|
| 第1章 序論..... | 1 |
| 1.1 蛍光検出システム..... | 1 |
| 1.1.1 蛍光顕微鏡..... | 2 |
| 1.1.2 光学フィルタを用いたオンチップ蛍光センサ..... | 3 |
| 1.1.3 多段pn接合フォトダイオード..... | 6 |
| 1.1.4 フィルタフリー蛍光検出センサ..... | 7 |
| 1.2 本研究の目的..... | 8 |
| 参考文献..... | 9 |
| | |
| 第2章 蛍光検出の原理..... | 12 |
| 2.1 緒言..... | 12 |
| 2.2 蛍光の原理..... | 12 |
| 2.2.1 蛍光のメカニズム..... | 12 |
| 2.2.2 ストークスシフト..... | 12 |
| 2.2.3 蛍光の強度..... | 14 |
| 2.3 フィルタフリー蛍光検出センサ..... | 15 |
| 2.3.1 光吸収特性..... | 15 |
| 2.3.2 Siの光吸収特性..... | 18 |
| 2.3.4 フィルタフリー蛍光センサの構造及び動作..... | 20 |
| 2.3.3 フィルタフリー蛍光センサの製作..... | 23 |
| 参考文献..... | 25 |

| | |
|--------------------------------|----|
| 第3章 センサの性能向上に向けた表面の平坦化..... | 26 |
| 3.1 緒言..... | 26 |
| 3.2 フォトゲートの改善..... | 26 |
| 3.3 Poly-Si 成膜プロセスの検討..... | 29 |
| 3.4 従来条件における実験結果..... | 31 |
| 3.4.1 散乱率の測定..... | 31 |
| 3.4.2 表面の粗さによる光電流の特性..... | 33 |
| 3.4.3 単一波長に対するセンサの応答..... | 35 |
| 3.4.4 フィルタフリー蛍光センサの波長分離能力..... | 36 |
| 3.5 結言..... | 40 |
| 参考文献..... | 41 |
| | |
| 第4章 蛍光試薬の検出..... | 42 |
| 4.1 緒言..... | 42 |
| 4.2 蛍光試薬への適用..... | 42 |
| 4.2.1 蛍光試薬..... | 42 |
| 4.2.2 ゲート電圧ー光電流特性の波長依存性..... | 44 |
| 4.2.3 生物測定をに向けたパラメータの提案..... | 45 |
| 4.2.4 蛍光試薬の測定..... | 47 |
| 4.2.5 3波長の分離..... | 50 |
| 4.3 結言..... | 52 |
| 参考文献..... | 53 |
| | |
| 第5章 細胞の測定..... | 54 |
| 5.1 緒言..... | 54 |
| 5.2 細胞測定..... | 54 |
| 5.2.1 分析細胞..... | 54 |

| | | |
|-------|------------------------|----|
| 5.2.2 | 細胞の測定システム..... | 55 |
| 5.2.3 | パラメータ及び結果分析..... | 58 |
| 5.3 | フィルタフリー蛍光センサの応用..... | 60 |
| 5.3.1 | フィルタフリー蛍光イメージセンサ..... | 60 |
| 5.3.2 | センサと流路素子の一体化..... | 62 |
| 5.4 | 結言..... | 65 |
| | 参考文献..... | 66 |
| | 第6章 総括..... | 67 |
| | 謝辞..... | 68 |
| | 本研究に関する発表論文と学会発表等..... | 70 |

第1章 序論

1.1 蛍光検出システム

近年、抗原・抗体反応、酵素、核酸、細胞構造などを高い選択性で検出可能なバイオ検出システムの研究が注目されている[1-4]。高い選択性を実現するため、蛍光検出法、電気化学検出法、表面プラズモン法など様々な分析方法が利用されている。特に蛍光プローブを用いる蛍光検出法は低濃度においても高感度、高選択性、及び比較的容易に測定可能などの利点を持っており、化学、環境、医学及び生命科学など幅広い分野で使用されている。Deoxyribonucleic acid (DNA)、Ribonucleic acid (RNA)などの核酸及びAdenosine triphosphate (ATP)、Ca²⁺などの脳や神経系の形状やその変化、分布などを選択的に観察することを目的に、これまで数千の蛍光プローブが考案されている[5-7]。

従来の蛍光検出システムは極微量の目標物質について高感度分析と高い選択性を持って分析を行うことができるが、蛍光分析を行うためには、高価かつ大規模なシステム、並びに複雑で専門的な技術を要するため、熟練した技術が必要であった。従って、このような課題を克服すべく、既存の装置の小型化、低価格化、自動化などの取り組みが持続的に行われている。

これまで安定的かつ迅速に分析物を検出するため、Point-of-care testing (POCT)などの小型化された検出装置の実現を目指した化学分析装置を小型化しチップ上へ集積化するLab-on-a-chip (LOC)が注目をされており、様々な検討が進められている[9-16]。

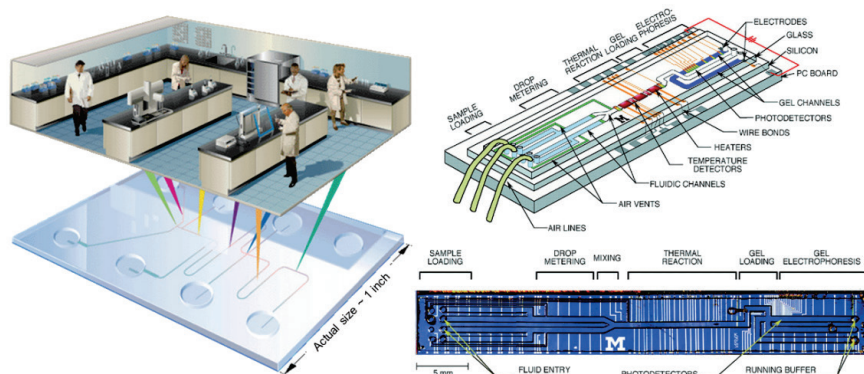


図 1.1 LOCの概念図と代表的な統合デバイス [8]

LOCはガラスやSi基板の上にDNAやタンパク質、その他の化学的・生物学的物質の反応系、分離形などを集積化したマイクロチップであり図1.1にLOCの概念図と代表的な統合デバイスを示す。LOCはマイクロ流路チップ(Microfluidics)技術を基に、微細なチャンネルを通じて流路を流して複雑な実験を一度に遂行するため、反応時間の短縮、測定の自動化、装置の小型化、低コスト化といった様々なメリットを有する。しかしながら、反応生成物に対する検出には蛍光顕微鏡が広く用いられるため、検出部分は大規模となり、折角のLOCの小型化による恩恵が小さくなるため、蛍光検出に関する小型化の検討がなされている。

1.1.1 蛍光顕微鏡

蛍光ラベルは測定する試料に対する高い選択性を持つため、それを観察するための蛍光顕微鏡は生物学分野で広く使われている[17-19]。図1.2(a)は、蛍光顕微鏡の内部に通過する光源の経路を示している。ランプから照射された光源は、励起フィルタを通過し、ダイクロイックミラーにより反射され、サンプルに照射される。蛍光物質がラベリングされたサンプルは、励起光を吸収して長波長の光を放出し、この光は再びダイクロイックミラーを通過して、蛍光フィルタ、集束レンズ、絞りを経て最終的に検出器に到達する。図1.2(b)は、特定の蛍光プローブによって設計された蛍光キューブとそれに伴うスペクトルを示している。このように、蛍光顕微鏡に使用される光学フィルタは蛍光の波長により決まるため、数千個以上開発されている蛍光プローブに対して、個別の光学蛍光フィルタが必要となるため、計測系は複雑かつ高価となる。

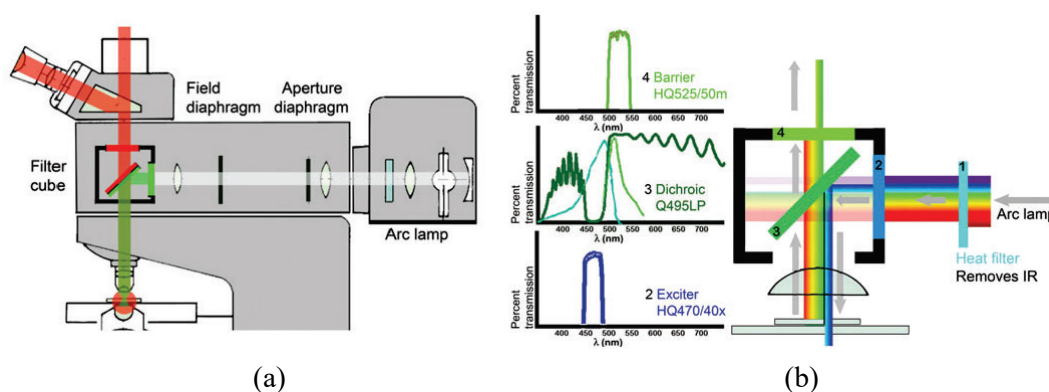


図 1.2 (a) 蛍光顕微鏡の構造と (b) フィルタキューブの模式図 [20]

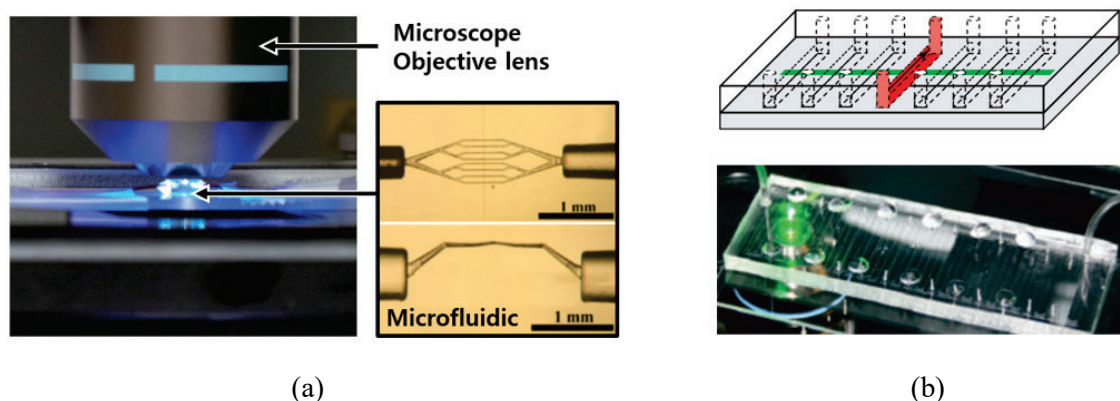


図 1.3 蛍光顕微鏡の応用分野の例 (a) 3D蛍光イメージング (b) 血小板の測定 [21,22]

図1.3(a)は浮遊細胞の3D蛍光イメージングのため、超高速レーザ刻印を用いてガラス中に作製された傾斜チャンネルマイクロ流路チップを示している。3D蛍光イメージングを収集するために、蛍光顕微鏡の焦点を調整することが必要である。図1.3(b)は、マウスから抽出された少量(100 μ L)の全血の流れを調節することによって血小板の沈着と安定性を測定するために製作されたマイクロ流路チップである。蛍光ラベルが貼付された抗体を使用して血流を連続的に照射することができる。このように、蛍光を測定するためには、光学フィルタやダイクロイックミラー、レンズなど多数の光学部品が必要であり、POCTなどに適用するためには、オンチッププロセッサの開発が求められている。

1.1.2 光学フィルタを用いたオンチップ蛍光センサ

1.1.2.1 干渉フィルタ

特定の波長を検出するために光学干渉フィルタをチップ上に集積化し、蛍光成分を検出した報告がある[23]。干渉フィルタは、薄い膜の上で起こる干渉現象を利用して特定の波長の波動を通過するフィルタである。蛍光検出には励起波長より長い波長領域の光を通過させる干渉フィルタが主に使用される。図1.4にCMOS(Complementary Metal-Oxide Semiconductor)イメージセンサ上へ $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ を積層した蛍光センサの模式図を示す。Fluorescein(λ_{ex} :494 nm、 λ_{em} :521 nm)から放射する光成分450 nmから520 nmの波長99%遮光し、85 μ Mの濃度までの検出に成功している。しかし、蛍光のピーク値から約20%の損失が発生する問題がある。また、T. Kameiら

の報告ではa-Si:Hフォトダイオード上へZnS/YF₃を積層し、マイクロチャネルおよび集光レンズと組み合わせて、キャピラリー電気泳動装置を実現している。Fluoresceinを蛍光試薬として、蛍光検出限界は17 nMである。そして、SiO₂/Ta₂O₅を積層した蛍光センサは7 nMまでFluoresceinを観測し、φ174 bacteriophage DNA (25 ng/μL)を11回連続分離する報告がある。

干渉フィルタは比較的に低温のプロセスで作製可能なため、オンチップで回路との一体化が可能である。しかし、干渉フィルタは所望の特性を得るには数十層の積層構造が必要であるため製作工程が複雑になる。そして、センサに入射される光の角度によって通過する波長が変わる可能性がある。また、検出可能な蛍光波長が固定であるため、蛍光試薬の変更に対応できないなどの問題がある。

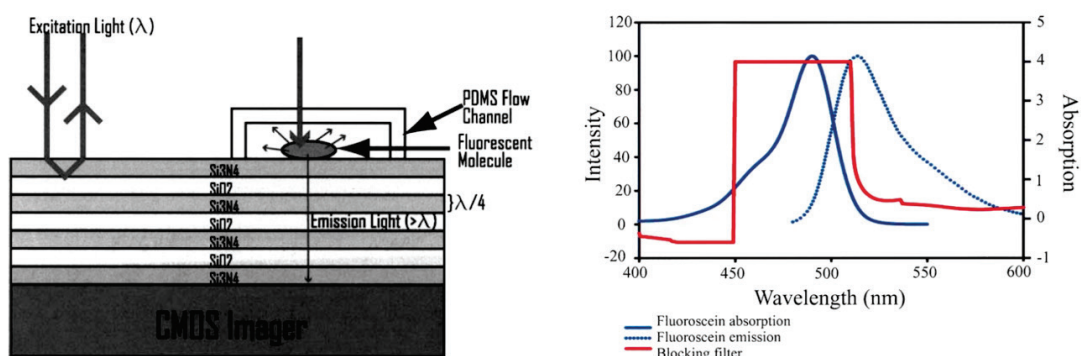


図 1.4 蛍光検出用CMOSイメージセンサ(SiO₂/Si₃N₄) [24]

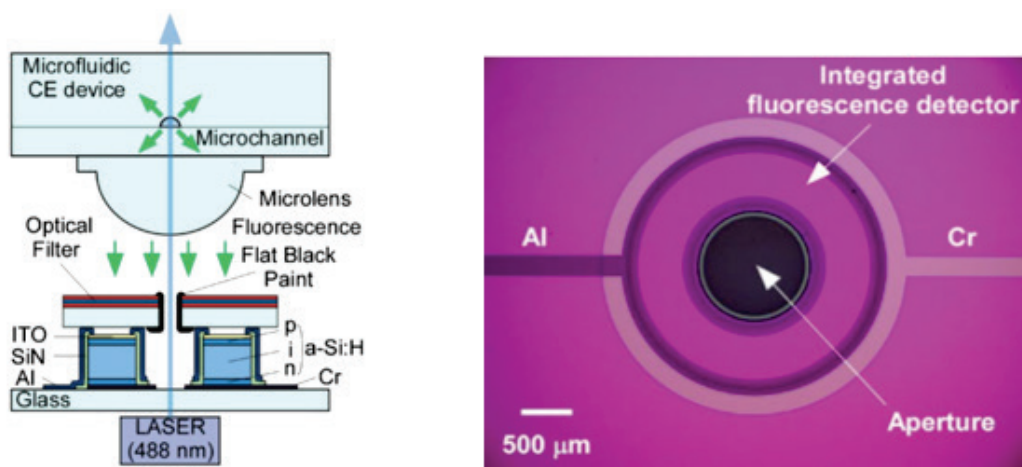


図 1.5 a-Si:Hの構造を用いた蛍光検出センサ(ZnS/YF₃) [25]

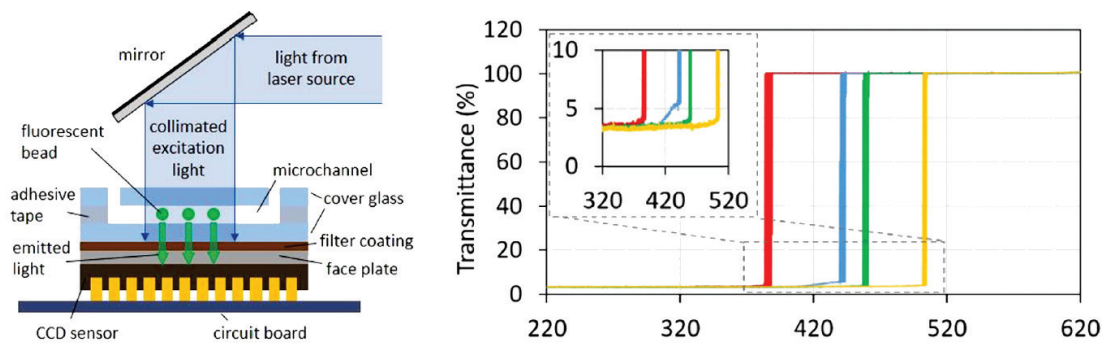


図 1.6 蛍光検出用CCDイメージセンサ [26]

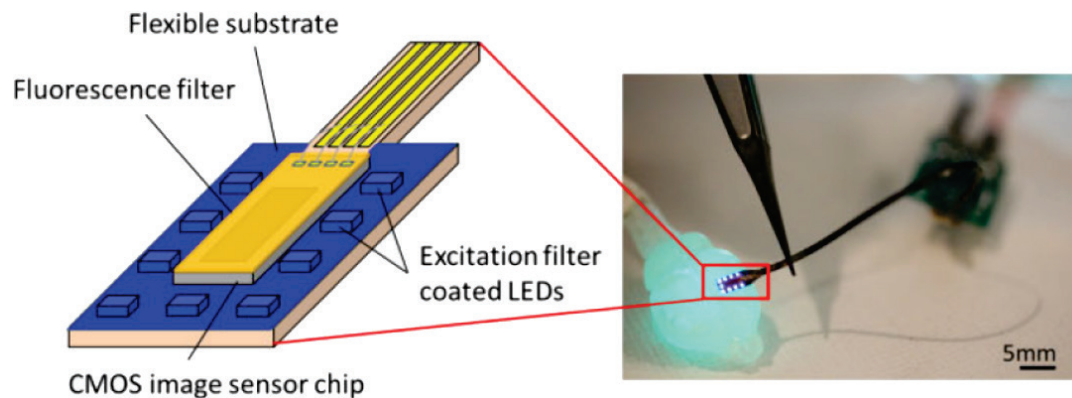


図 1.7 生体挿入用CMOS蛍光イメージセンサ [27]

1.1.2.2 吸収フィルタ

干渉フィルタとは異なり、吸収フィルタは、ある波長での光を選択的に吸収する物質を利用して、その吸収波長をカットし、他の波長の光を通過させる特性を持つ。したがって、吸収された光は干渉フィルタとは異なり、熱として放出され干渉フィルタに比べスペクトル特性は劣る。しかし、吸収フィルタは成膜された層が単層で成膜されるため、干渉フィルタに比べて作製工程が比較的容易である。また、干渉フィルタに比べて入射角度の許容値が広いため生体挿入用のデバイスなどによく用いられる[28]。

E. Yildirimらは、可溶化染料(2RLN)と紫外線硬化型フォトポリマー(NOA60)を混合して、高い波長帯域の選択性と透過率を持つ吸収フィルタの簡単な製造方法及び特性分析を提案した。386-504 nmの範囲で遮断帯域での光源の通過率は、最大3 %の性能を有する。CCD(Charge-coupled device)イメージセンサ上に接着される吸収フィルタは

カバーガラス上に成膜することができるが、検出試料との間隔が増加するため検出性能が低下する可能性がある。(図1.6 参照)

また、Y. Sunagaらは生体注入用(In vivo)の蛍光イメージングを行うためにCMOSイメージセンサとLEDチップ(λ :470 nm)を組み合わせたデバイスを研究している[16]。図1.7のデバイスでは、励起光を除去する吸収フィルタに加え、LEDからの励起光のスペクトル特性を急峻にし、デバイスの性能を向上させるために励起光フィルタを使用している。1 nMのFITC-I(Fluorescein-4-isothiocyanate)の濃度まで検出に成功している。しかし、干渉フィルタに比べて製作工程が容易であるが、干渉フィルタと同様にフィルタを使用するため複数種類の蛍光プローブの同時検出が不可能、蛍光試薬の変更に対応できないなどの問題がある。

1.1.3 多段pn接合フォトダイオード

これまで示した様に光学フィルタを用いた小型蛍光検出センサが研究されている一方で、光学フィルタを使用せず蛍光検出を行う方法が報告されている[29-30]。X. Fangらは、3つの埋め込みpn接合フォトダイオードを製作し、蛍光などのバイオセンサへの応用について報告を行っている[21]。図1.8にデバイスの断面模式図及び波長に対する光電流の流れを示す。本デバイスは3つのpn接合から形成されており、吸収係数の違いにより各pn接合から得られる光電流に違いが生じるため、各光電流を測定することで3つの波長まで検出可能となっている。図1.8(b)には各電流の比率を計算し、光成分の波長を分離して、検出することに成功している。しかし、光の成分の半値幅によって分離能力が低下する可能性がある。

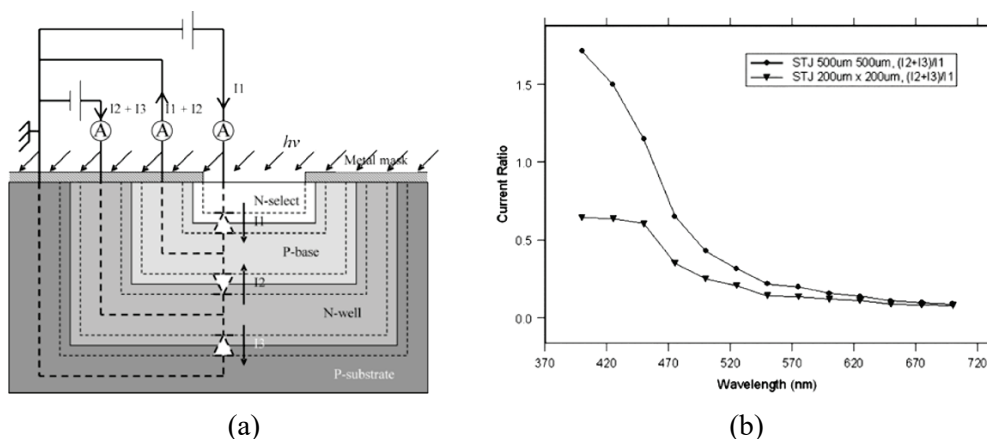
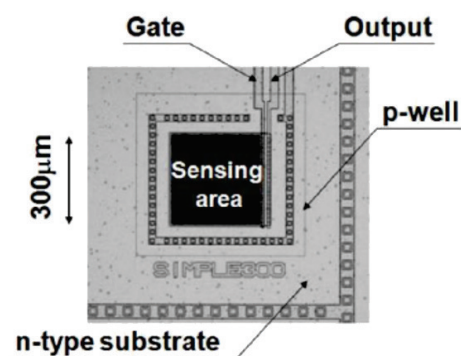


図 1.8 (a) デバイス断面模式図 (b) 波長分離グラフ [31]

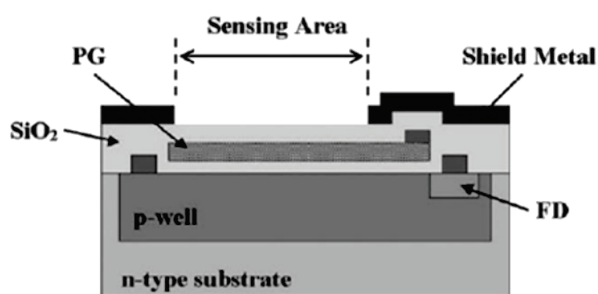
1.1.4 フィルタフリー蛍光検出センサ

上記のように、干渉フィルタや吸収フィルタ等の光学フィルタを用いた蛍光検出センサでは、蛍光検出能力が高い反面、蛍光試薬ごとの光学フィルタが必要なため、複数種類の蛍光を同時に検出することが不可能であり、また蛍光試薬を変更するとチップ上に集積化したフィルタでは対応できない問題があった。そこで、本研究室では光学フィルタを用いないフィルタフリー蛍光検出センサが丸山らにより提案されている[32]。本センサはフォトゲート型光センサを採用している。

図1.9にフィルタフリー蛍光検出センサの概観及び構造を示す。本センサでは、フォトゲートに印加する電圧により擬似的に多段pn接合フォトダイオード構造を再現できるため、原理上検出できる波長の数に制限はない。また検出したい蛍光波長に合わせてフォトゲート電圧を調整することで、高感度な蛍光検出が可能となる。そのため、従来の光学フィルタを用いた蛍光検出原理では実現不可能な用途への応用の可能性がある。製作には標準CMOS工程を用いることができ、回路との一体化も容易である。



(a) 顕微鏡画像



(b) 断面模式図

図 1.9 フィルタフリー蛍光センサ

1.2 本研究の目的

フィルタフリー蛍光センサでは通常の蛍光検出で用いられる光学フィルタやダイクロイックミラーなどの素子を用いずに蛍光検出が可能であり、小型で安価な蛍光検出器の実現が期待できる。しかし、比較的高い蛍光検出能力を持つ干渉フィルタタイプのオンチップ蛍光検出センサでも一般的に用いられる蛍光検出システムに比べると蛍光検出能力(励起光強度に対する蛍光検出光量比)は1000倍以上低い。生物分析など実用化に向けたフィルタフリー蛍光センサの蛍光検出能力の向上が重要であると考ええる。

そこで、第3章では、フィルタフリー蛍光センサの性能向上に向け、センサの製作プロセスにおける問題点を検討したのち、蛍光検出能力の改善方法を提案して、性能向上されたセンサを製作する。第4章では、性能が向上されたフィルタフリー蛍光センサを用いて、生物測定に向けたパラメータ法の提案する。そして、蛍光試薬に対する検出性能評価及び2種類の蛍光試薬から放出する3つの波長検出について記述する。第5章では、フィルタフリー蛍光センサを用いた細胞の検出法を提案する。細胞等の観察のために2次元蛍光イメージ取得を目指し、 32×32 画素のフィルタフリー蛍光イメージセンサの開発を行う。そして、POCT及びその場診断などで適用するため、流路素子とセンサを一体化し、小型化されたフィルタフリー蛍光検出システムを開発する。

参考文献

- [1] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich, Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase, *Science* 239 (1988) 487-491.
- [2] R. H. L. Deprez, A. C. Fijnvandraat, J. M. Ruijter, and A. F. M. Moorman, Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions, *Analytical Biochemistry* 307 (2002) 63-69.
- [3] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Research* 28 (2000) 899-901.
- [4] Y. Aoi, M. Hosogai, S. Tsunebe, Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria, *Journal of Biotechnology* 125 (2006) 484-491.
- [5] H. Kuba, T. N. Ishii, H. Ohmori, Axonal site of spike initiation enhances auditory coincidence detection, *Nature* 444 (2006) 1069-1072.
- [6] Y. Jaillais, I. Fobis-Loisy, C. Miege, C. Rollin, T. Gaude, AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in Arabidopsis, *Nature* 443 (2006) 106-109.
- [7] Gregor P. C. Drummen, Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques-Illuminating Biological and Biomedical Research, *Molecules* 17 (2012) 14067-14090.
- [8] M. A. Burns, B. N. Johnson, S. N. Brahmastrand, K. Handique, J. R. Webster, M. Krishnan, T. S. Sammarco, P. M. Man, D. Jones, D. Heldsinger, C. H. Mastrangelo, D. T. Burke, An Integrated Nanoliter DNA Analysis Device, *Science* 282 (1998) 484-487.
- [9] D. Mark, S. Haeberle, G. Roth, F. Stetten and R. Zengerle, Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications, *Chem. Soc. Rev* 39 (2010) 1153-1182.
- [10] K. B. Neeves, S. F. Maloney, K. P. Fong, A. A. Schemaier, M. L. Kahn, L. F. Brass, S. L. Diamond, Microfluidic focal thrombosis model for measuring murine platelet deposition and stability: PAR4 signaling enhances shear-resistance of platelet aggregates, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 6 (2008) 2193-2201.
- [11] J. Lee, H. Moon, J. Fowler, T. Schoellammer, C. Kim, Electrowetting and electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling, *Sensors and Actuators A* 95 (2002) 259-268.
- [12] D. F. Chen, H. Du, W. H. Li, Bioparticle separation and manipulation using dielectrophoresis, *Sensors and Actuators A* 133 (2007) 329-334.

- [13] J. Tsai, L. Lin, Active microfluidic mixer and gas bubble filter driven by thermal bubble micropump, *Sensors and Actuators A* 97-98 (2002) 665-671.
- [14] Y. Weiping, D. Liqun, W. Jing, M. Lingzhi, Z. Jianbo, Simulation and experimental study of PCR chip based on silicon, *Sensors and Actuators B* 108 (2005) 695-699.
- [15] C. W. Liu, C. Gau, H. S. Ko, C. S. Yang, B. T. Dai, Fabrication challenges for complicated micro-flow channel system at low temperature process, *Sensors and Actuators A* 130-131 (2006) 575-582.
- [16] J. L. M. Schulze, D. Verdoy, J. Berganza, G. Olabarria, J. Berganzo, J. Elizalde and J. M. Ruano-Lopez, Micro SU-8 chamber for PCR and fluorescent real-time detection of Salmonella spp. DNA, *proceedings of μ -TAS* (2005) 1425-11425.
- [17] Suhling K, French P.M, and Phillips D., Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4 (2005) 13–22.
- [18] Majzoub RN, Chan CL, Ewert KK, Silva BF, Liang KS, Safinya CR., Fluorescence microscopy colocalization of lipid–nucleic acid nanoparticles with wildtype and mutant Rab5-GFP: A platform for investigating early endosomal events, *Biochim Biophys Acta* 1848 (2015) 1308-1318.
- [19] Orr H. Shapiro, Esti Kramarsky-Winter, Assaf R. Gavish, Roman Stocker, and Assaf Vardi, Acoral-on-a-chip microfluidic platform enabling live-imaging microscopy of reef-building corals, *Nature communications* 7 (2016) 10860.
- [20] L. V. Johnson, M. L. Walsh, B. J. Bockus, L. B. Chen, Fluorescence microscopy, *The Journal of Cell Biology* 88 (2005) 526-535.
- [21] V. K. Jagannadh, M. D. Mackenzie, P. Pal, A. K. Kar, and S. S. Gorthi, Slanted channel microfluidic chip for 3D fluorescence imaging of cells in flow, *Optics Express* 24 (2016) 22144-22158.
- [22] Neeves, K. B, Maloney, S. F, Fong, K. P, Schmaier, A. A, Kahn, M. L, Brass, L. F, and Diamond, S. L, Microfluidic focal thrombosis model for measuring murine platelet deposition and stability: PAR4 signaling enhances shear-resistance of platelet aggregates. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 6 (2008) 2193-2201.
- [23] E. Thrush, O. Levi, W. Ha, K. Wang, S. J. Smith, and J. S. Harris, Integrated bio-fluorescence sensor, *Journal of Chromatography A* 1013 (2003) 103-110.
- [24] M. L. Adams, M. Enzelberger, S. Quake, A. Scherer, Microfluidic integration on detector arrays for absorption and fluorescence micro-spectrometers, *Sensors and Actuators A* 104 (2003) 25-31.

- [25] T. Kamei, K. Sumitomo, S. Ito, R. Takigawa, N. Tsujimura, H. Kato, T. Kobayashi and R. Maeda, Heterogeneously integrated laser-induced fluorescence detection devices: Integration of an excitation source, *Japanese Journal of Applied Physics* 53(2014) 06JL02.
- [26] E. Yıldırama, C. Arpalib, S. A. Arpalic, Implementation and characterization of an absorption filter for on-chip fluorescent imaging, *Sensors and Actuators B* 242 (2017) 318-323.
- [27] Y. Sunaga, H. Yamaura, M. Haruta, T. Yamaguchi, M. Motoyama, Y. Ohta, H. Takehara, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, Implantable imaging device for brain functional imaging system using flavoprotein Fluorescence, *Japanese Journal of Applied Physics* 55 (2016) 03DF02.
- [28] D. C. Ng, T. Tokuda, A. Yamamoto, M. Matsuo, M. Nunoshita, H. Tamura, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, J. Ohta, On-chip biofluorescence imaging inside a brain tissue phantom using a CMOS image sensor for in vivo brain imaging verification, *Sensors and Actuators B* 119 (2006) 262-274.
- [29] D. P. Poenar, T. M. Siu, T. O. Kiang, Colour sensor for (bio)chemical/biological discrimination and detection, *Materials Science in Semiconductor Processing* 5 (2002) 17-22.
- [30] C. Richard, T. Courcier, P. Pittet, S. Martel, L. Ouellet, G. N. Lu, V. Aimez, and P. G. Charette, CMOS buried Quad p-n junction photodetector for multi-wavelength analysis, *Optics express* 20 (2012) 2053-2061.
- [31] X. Fang, K. S. Hsiao, V. P. Chodavarapu, A. H. Titus, A. N. Cartwright, Colorimetric porous photonic bandgap sensors with integrated CMOS color detectors, *IEEE Sensors Journal* 6 (2006) 661-667.
- [32] Y. Maruyama, K. Sawada, H. Takao, M. Ishida, A Novel Filterless Fluorescence Detection Sensor for DNA Analysis, *IEEE Trans. Electron Devices* 53 (2006) 553-558.

第2章 蛍光検出の原理

2.1 緒言

この章ではフィルタフリー蛍光センサの原理について説明する。まず、フィルタフリー蛍光センサの検出原理の基本となる蛍光の原理について述べ、次にSiの光吸収特性について説明を行う。最後に、フィルタフリー蛍光センサの構造とその構造を用いた蛍光の検出方法及び製作について述べる。

2.2 蛍光の原理

2.2.1 蛍光のメカニズム

蛍光とは、電子が可視・紫外光を吸収して励起状態となった後、基底状態へ戻る過程で放射される光である。図2.1に示すジャブロンスキー図(Jablonski diagram)を用いて励起光と蛍光の関係を説明する。

- (1) 可視・紫外光を吸収して分子が励起状態になる。分子は高いエネルギーをもった不安定な状態になる。この状態を励起一重項状態 S_1' と言う。
- (2) 過剰なエネルギーを振動エネルギーとして失い、励起一重項状態 S_1 の最もエネルギーの低い準位となる。
- (3) 励起一重項状態 S_1 からエネルギーを蛍光として放射し、基底状態 S_0 に戻る。

2.2.2 ストークスシフト

蛍光のスペクトルは、励起スペクトルよりも長波長側にシフトする。蛍光スペクトルが長波長側に移ることはエネルギーレベルが励起状態よりも低くなることを意味している[3,4]。これは先に述べたとおり過剰なエネルギーが基底状態に戻る際に、過剰な振動エネルギーが熱エネルギーに変換されるためである。図2.2に励起スペクトルと蛍光スペクトルの関係を示す。

図2.2の E_x (Excitation)は励起光、 E_m (Emission)は蛍光である。破線は励起スペクトルで、蛍光物質の吸光度を示している。励起スペクトルはなだらかな曲線となる、これは蛍光物質の電子状態を反映したもので、多数の電子の様々な状態がそれぞれのエネルギーを吸収するためになだらかな曲線となる。励起スペクトルの最大値を励起極大波長とよぶ。蛍光スペクトルも多数のエネルギー状態間の遷移のためになだらかな曲線となる。この時、励起波長を変化させても蛍光スペクトルのピーク高さ(光強度)は変わるが、蛍光ピーク波長は変化しない。

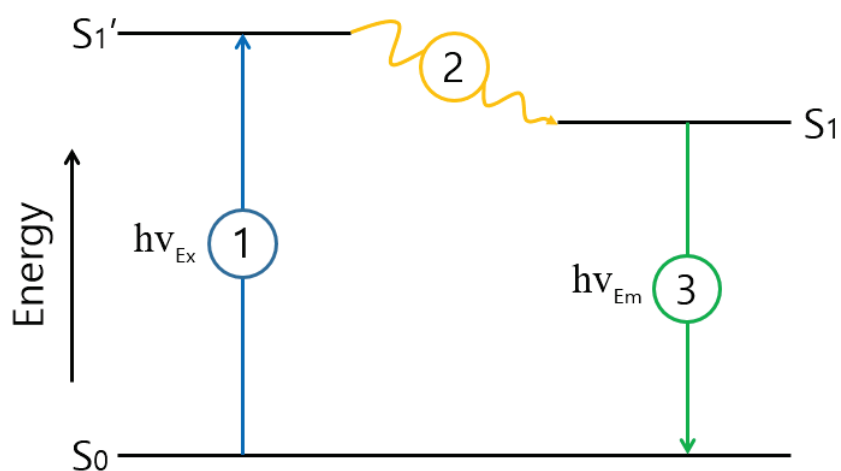


図 2.1 ヤブロンスキーダイアグラム [1,2]

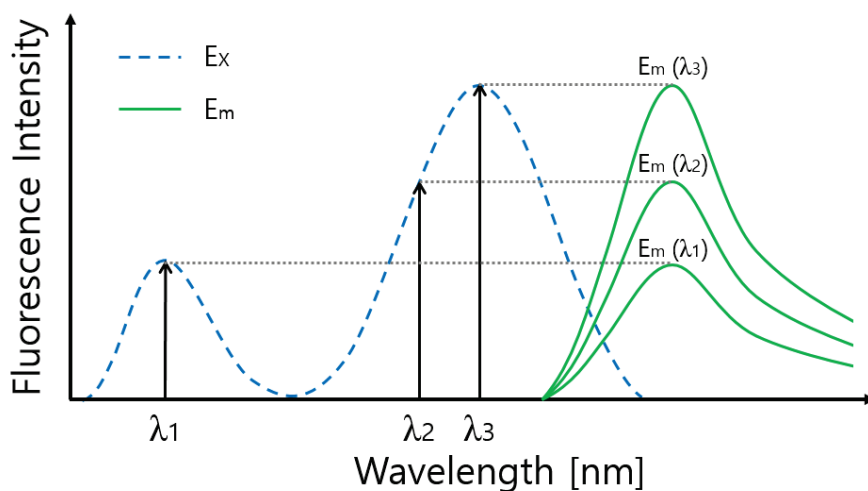


図 2.2 蛍光スペクトルと励起スペクトルの関係[2]

2.2.3 蛍光の強度

蛍光の強度は次の5つの要素によって決定される。

- (1) 蛍光の強度 ϕ_{em} は励起光 ϕ_{ex} の強度に比例する
- (2) 蛍光物質の吸光係数 α は経路1 cmあたりの1 M蛍光試薬の光学濃度として定義される
- (3) 蛍光物質の量子収率 β は吸収された光子数と放出された光子数の比で示され、最大1である。量子収率は放出された光子数と吸収された光子数である
- (4) サンプル中の蛍光物質の濃度 C で表す。蛍光強度と濃度は、低濃度範囲において比例関係がある。図2.3示したように、高濃度領域では濃度消光や蛍光の再吸収などにより、比例関係が成り立たなくなるため、通常は比例関係のある低濃度範囲で使用する
- (5) サンプルの厚みまたは励起光の入射の深さ T である

以上より、蛍光の強度 ϕ_{em} は次式で表される

$$\phi_{em} \propto \phi_{ex} \cdot \alpha \cdot \beta \cdot C \cdot T \quad (2.1)$$

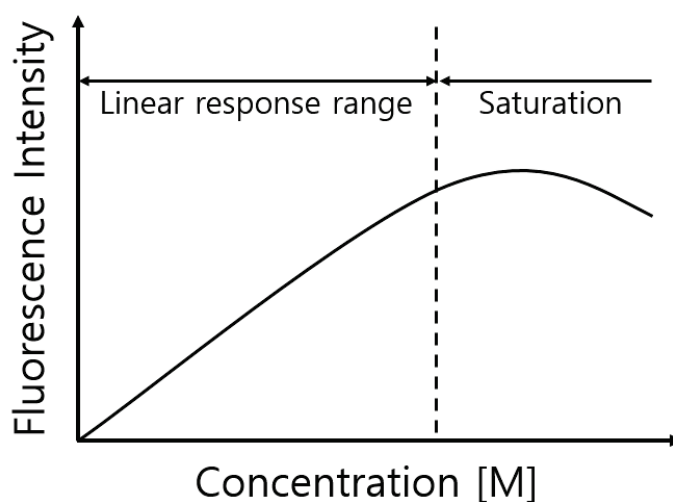


図 2.3 蛍光物質の濃度と蛍光強度の関係

2.3 フィルタフリー蛍光検出センサ

2.3.1 光吸収特性

ある物体に光が入射すると、物体表面で光の一部は反射され、また内部に入り込んだ光はその物質によって吸収される[5]。図 2.4において反射光の強度 ϕ_r 、深さ W での光強度 ϕ_w は、反射率 R 、深さ W 、吸収係数 α 、入射光の強度 ϕ_i 、入射光の強度 ϕ_0 を用いて次式のように定義される。

$$\phi_r = R\phi_i \quad (2.2)$$

$$\phi_w = \phi_0 e^{-\alpha W} \quad (2.3)$$

この吸収係数 α の値は光吸収機構に依存する。半導体内における主な光吸収機構は次の4つがある。

- (1) 内核電子による吸収
- (2) 自由電子（正孔）による吸収
- (3) 価電子による吸収
- (4) 局在する不純物や欠陥準位による吸収

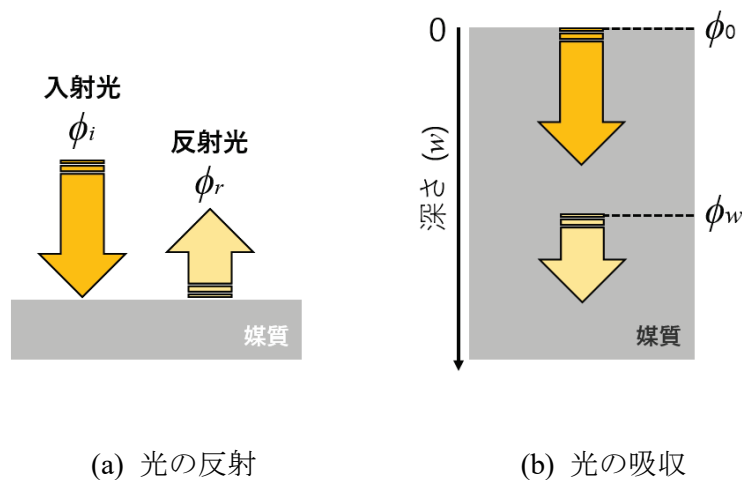


図 2.4 光が媒質に照射された際の動き

これらの光吸収機構と光の波長の関係を図2.5に示す。このうち撮像素子に用いられる吸収機構は可視光領域の機構である(3)及び(4)である。よって以下では(3)及び(4)について述べる。(3)は電子が光のエネルギーを受けることで価電子帯から伝導帯に励起され電子—正孔対を生む過程に伴う吸収である。この吸収機構を真性吸収と呼ぶ。

また、真性吸収帯の長波長側の端を真性吸収端という。真性吸収は半導体のエネルギー帯構造と深い関係がある。真性吸収においては直接遷移型と間接遷移型がある。図2.6にエネルギー帯の構造と直接遷移、間接遷移の相違を示す。(a)はエネルギー帯の極大と極小が $k=0$ で一致している場合は直接遷移型のエネルギー帯構造である。(b)は一致しない場合で間接遷移型のエネルギー帯構造を示すものである。電子の遷移に対しては運動量が保存される必要があるが、直接遷移では電子の運動量は保存されているが、間接遷移では運動量は保存されていない。この場合には電子は結晶の格子振動との相互作用をもち、全体としての運動量が保存される。直接遷移型と間接遷移型で遷移過程の違いにより吸収端付近での光吸収特性に違いが生じる。例として図2.7に種々の半導体の光吸収係数を示している。直接遷移型のGaAsに比べて間接遷移型のSiでは吸収端での立ち上がりが鈍い。真性吸収が生じるのは、その禁止帯幅のエネルギー E_g に関する遮断波長 λ_c より短い波長範囲である。 λ_c は次式で表される。

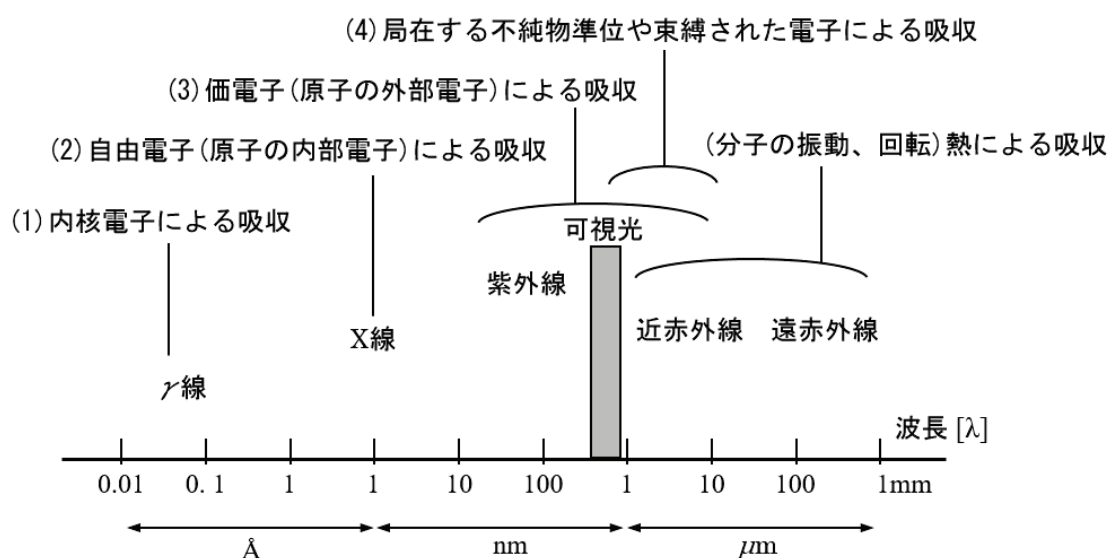


図 2.5 光の波長と吸収機構 [6]

$$\lambda_c = \frac{hc}{E_g} = \frac{1.24}{E_g [eV]} \quad (2.4)$$

フィルタフリー蛍光検出センサに用いられるSiの真性吸収範囲は400~1100 nmであり、式(2.4)にSiのエネルギーギャップ1.11[eV]を代入し得られる値とよく一致する。また、蛍光プローブの波長(420~875 nm)はSi半導体の吸収特性の真性吸収範囲内であることから、Si半導体は蛍光検出にも有用であるといえる。

(4)は外因性吸収といい、価電子帯にある正孔あるいは伝導帯に電子と片方の極性のキャリアだけを発生するので、外因性吸収と呼ばれる。この吸収は、Si半導体では赤外光検出分野等の比較的長波長側で利用されている。図2.6に真性吸収と外因性吸収の相違を示す。フィルタフリー蛍光検出センサでは可視光領域を扱っているため真性吸収のみを考慮する。

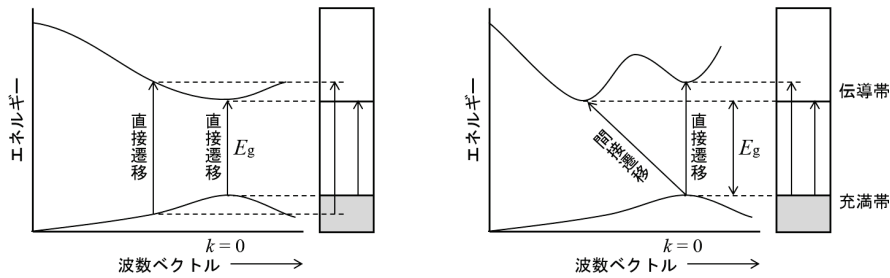


図 2.6 直接遷移と間接遷移の違い [6]

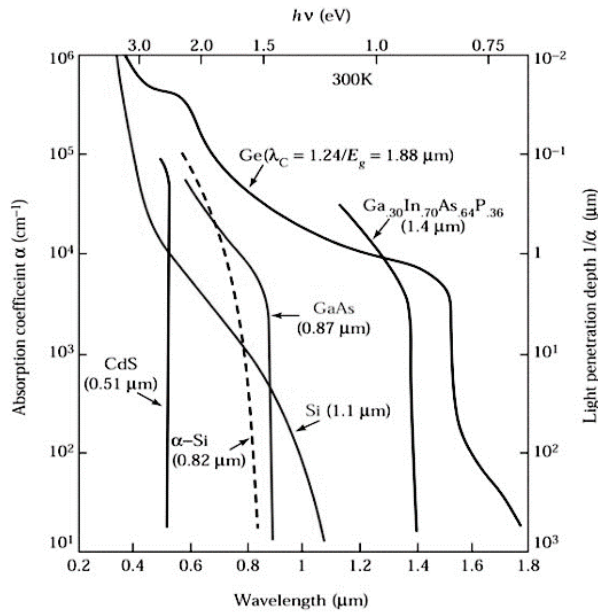


図 2.7 半導体の光吸収係数 [7]

2.3.2 Siの光吸収特性

フィルタフリー蛍光センサは光の波長による吸収特性の違いに着目している。Siの吸収係数と式(2.3)より、Siに光を照射した際の減衰率を求めることができる[8]。図2.8にSiに光を照射した際の波長による吸収深さの違いを示す。短波長の光は表面付近で多く吸収され、長波長の光はSiの表面から深くまで侵入していくことがわかる。

次に、ある深さ W までに光が吸収されることによって発生する電子数について検討する。例えば470 nmの励起光は図2.8によると1 μm まで進入すると表面での光強度に対して18 %まで減衰している。言い換えると1 μm までに82 %の励起光が吸収されたことになる。この考えを元に式(2.3)をある深さ W までに吸収された光量 g_W に書き換えると式(2.5)となる。そして、式(2.5)を光子の持つエネルギー E_p で割ると深さ W までに吸収した光により発生する単位面積あたりの電子数となる。これに素電荷 q と光を吸収する面積 S を乗ずることで深さ W までに吸収した光により発生する電流 I が得られる。これを式(2.7)に示す。

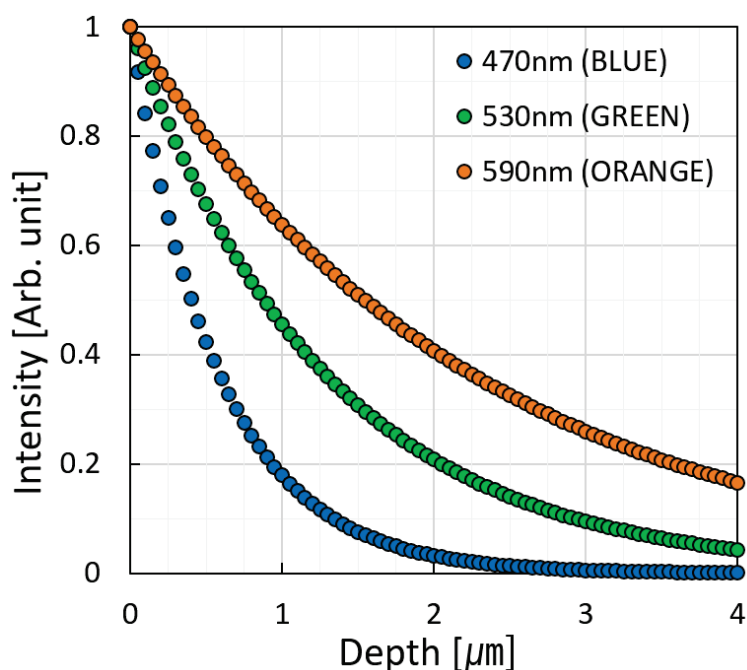


図 2.8 光波長を変化させた時のSiの吸収深さ

$$g_W = \phi_0 (1 - e^{-\alpha W}) \quad (2.5)$$

$$E_p = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (2.6)$$

$$I = -\frac{\phi_0 q S \lambda}{hc} (1 - e^{-\alpha W}) \quad (2.7)$$

ここで、 g_W ：深さ W における光量、 ϕ_0 ：Si表面での光強度、 α ：吸収係数、 h ：プランク定数(6.626×10^{-34} J·s)、 c ：真空における光速(2.998×10^8 m/s)、 ν ：振動数、 λ ：光の波長、 q ：電気素量(1.602×10^{-19} C)、 S ：受光面積である。入射光の波長 λ のみがわかっている場合、表面から W までで発生する電流が測定できれば式(2.7)において未知のパラメータは光強度 ϕ_0 のみとなり、測定した電流値から光強度 ϕ_0 を算出することができる。次にこの考えを拡張して、波長の異なる2種類の光(蛍光、励起光)が入射した場合を考える。表面から深さ W_1 までで発生する電流 I_1 は式(2.8)より次式として表される。

$$I_1 = \frac{qS\lambda_1}{hc} (1 - e^{-\alpha_1 W_1}) \phi_{ex} + \frac{qS\lambda_2}{hc} (1 - e^{-\alpha_2 W_1}) \phi_{em} \quad (2.8)$$

ここで、 I_1 ：表面から深さ W_1 までで発生する電流、 ϕ_{ex} ：励起光強度、 ϕ_{em} ：蛍光強度、 α_1 ：励起光の吸収係数、 α_2 ：蛍光の吸収係数、 λ_1 ：励起光波長、 λ_2 ：蛍光波長である。さらに、電流を測定する表面からの深さを W_2 に変更して得られる電流 I_2 は式(2.9)として表される。

$$I_2 = \frac{qS\lambda_1}{hc} (1 - e^{-\alpha_1 W_2}) \phi_{ex} + \frac{qS\lambda_2}{hc} (1 - e^{-\alpha_2 W_2}) \phi_{em} \quad (2.9)$$

式(2.8)及び式(2.9)において、波長 λ_1 、 λ_2 、吸収係数 α_1 、 α_2 、電位のピークの位置 W_1 、 W_2 が既知であれば、未知のパラメータは入射光の強度 ϕ_{ex} 、 ϕ_{em} のみとなる。そこで、式(2.8)及び式(2.9)を連立方程式として解くことで入射したそれぞれの波長の光強度 ϕ_{ex} 、 ϕ_{em} を算出することが可能である。補足として式(2.8)と式(2.9)の連立方程式の解を式(2.10)と式(2.11)に示す。

$$\phi_{ex} = \frac{I_1(1 - e^{-\alpha_2 W_2}) - I_2(1 - e^{-\alpha_2 W_1})}{\frac{qS\lambda_1}{hc} \left\{ (1 - e^{-\alpha_1 W_1})(1 - e^{-\alpha_2 W_2}) - (1 - e^{-\alpha_1 W_2})(1 - e^{-\alpha_2 W_1}) \right\}} \quad (2.10)$$

$$\phi_{em} = \frac{-I_1(1 - e^{-\alpha_1 W_2}) + I_2(1 - e^{-\alpha_1 W_1})}{\frac{qS\lambda_2}{hc} \left\{ (1 - e^{-\alpha_1 W_1})(1 - e^{-\alpha_2 W_2}) - (1 - e^{-\alpha_1 W_2})(1 - e^{-\alpha_2 W_1}) \right\}} \quad (2.11)$$

このように、次の二つの特徴を実現できればフィルタフリーで波長の異なる光のそれぞれの光強度を同時に得ることができる。

2.3.4 フィルタフリー蛍光センサの構造及び動作

フィルタフリー蛍光センサはフォトゲート構造を採用しており、図2.9にフィルタフリー蛍光センサの基本構成を示す。フィルタフリー蛍光センサはn型Si基板上にp-well層を形成し、検出領域にフォトゲートを配置している。読み出し端子としてフォトゲートに隣接してn⁺拡散層を配置した構造となる。この時、フォトゲートに印加する電圧によってSi表面のポテンシャルを変化させることができる。また、p-wellはGNDレベルとし、n基板には正のバイアスを印加することでpn接合によるポテンシャルの曲がり方がpn接合近傍に形成される。このバイアス条件により山型のポテンシャルが形成される。

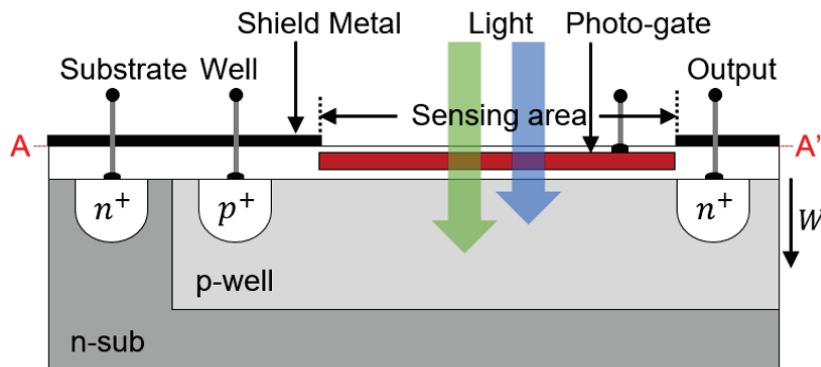


図 2.9 フィルタフリー蛍光センサの基本構成

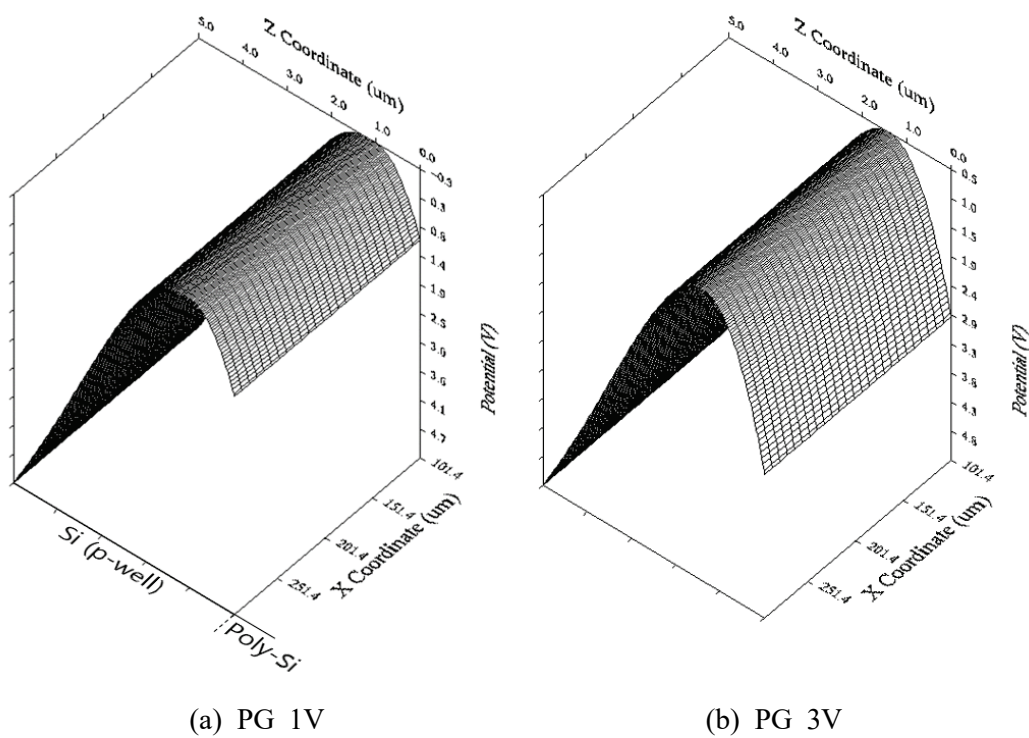


図 2.10 フォトゲート電圧によるポテンシャルの分布 (PG: Photo-gate)

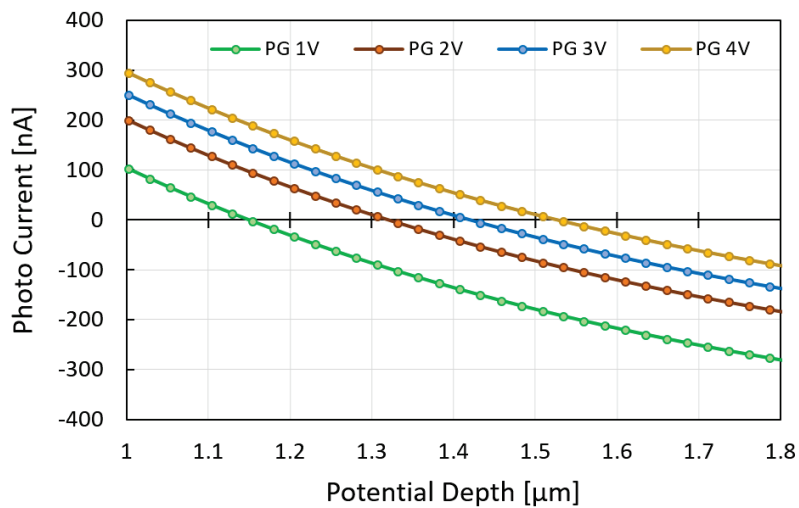


図 2.11 フォトゲート電圧に依存する出力光電流及びポテンシャル深さ

ポテンシャルピークの深さ W よりも表面側で吸収された光電子は、山型のポテンシャルにより表面に集められ、読み出し電極から電流として検出される。電流を読み出す時のポテンシャル分布のシミュレーション結果を図2.10に示している。ポテンシャル分布は、実際の不純物プロファイルを用いてCCD及びCMOSイメージ

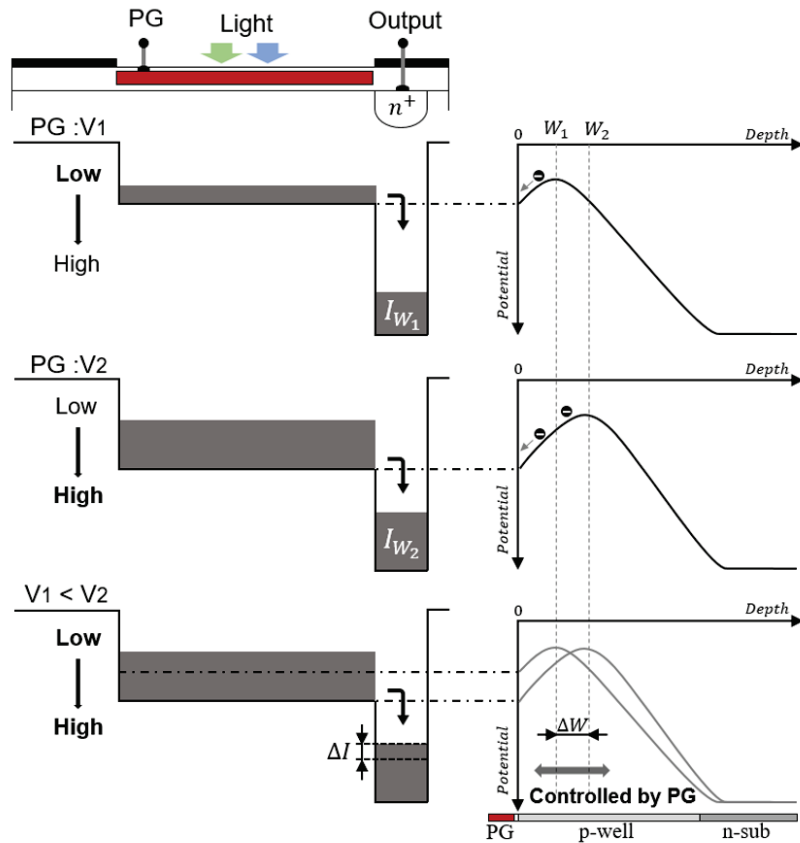


図 2.12 センサの動作によるポテンシャル分布

センサの3次元電気過渡解析デバイスシミュレーションプログラムである SPECTRA(simulation program for electric transient analysis)によって計算された[9,10]。図2.11は、入射光源の 波長470 nmを10 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 強度で照射する際に、フォトゲート電圧に依存するSi基板の 垂直の方向における出力光電流を示す。そこで、光電流値が正から負に変化する区間でポテンシャルピーク W を推定することができる。ポテンシャル深さ W は、1~4 Vの フォトゲート電圧によって1.15~1.52 μm と予測される。

図2.12はフィルタフリー蛍光センサの動作原理を異なる電圧を印加することによって発生するポテンシャル分布を示している。まず、フォトゲートに0 V、 n 型基板に正のバイアスを印加する。この時励起光及び蛍光を照射しており、この状態が初期状態となる。フォトゲートに正電圧 V_1 を印加すると、センシングエリアのポテンシャル分布は山形になり、光電流を読みだす深さ W_1 が決定される。この状態でセンシングエリアに励起光及び蛍光が照射されると、光電効果によって光電子が

発生する。発生した光電子は、ポテンシャルピーク W_1 を境にして Si 表面側に流れる。そして、Si の表面側に流れて来た光電子を測定することで光電流 I_1 が求まる。次に、電圧 V_1 を印加する状態より大きな正電圧 V_2 を印加すると、フォトゲートポテンシャルピーク位置は W_1 より深い位置 W_2 になる。この状態で、同様の測定を行うと光電流 I_2 が求まる。光電流 I_1 、 I_2 を式(2.8)、(2.9)に代入して、それぞれの式を連立方程式で解くことにより入射されたそれぞれの光強度 ϕ_{ex} 、 ϕ_{em} を算出される。

2.3.3 フィルタフリー蛍光センサの製作

フィルタフリー蛍光検出センサは、CMOS 5 μm 、1-poly 2-metal プロセスを用いて、豊橋技術科学大学内固体機能デバイス研究施設において製作される[11]。製作したフィルタフリー蛍光検出センサの顕微鏡画像及び製作手順を図2.13、2.14に示す。フォトゲートの面積は $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ であり、フォトゲート印加電圧によって受光深さを $0 \sim 2 \mu\text{m}$ の範囲で調整可能である。フォトゲートに隣接して n^+ 拡散層を配置して、光電子の取り出し口としている。またフォトゲート及び拡散層の周りを p-well contact で囲み、p-well 電位の設定及び p-well 中で発生したホールの排出口としている。p-well の周りに substrate contact を配置し、基板電位の設定及び電位の鞍より深い位置で発生した光電子の排出口としている。さらに、フォトゲート部以外を2層目 Al で遮光することにより、フォトゲート部以外で光電子の発生を抑制している。

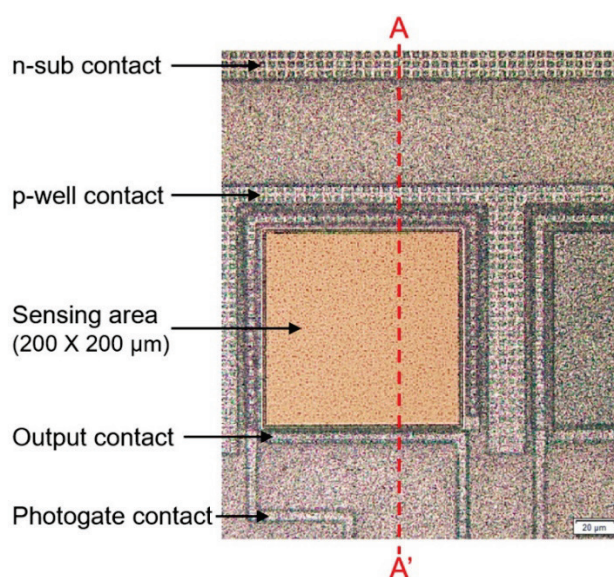


図 2.13 フィルタフリー蛍光センサの顕微鏡画像

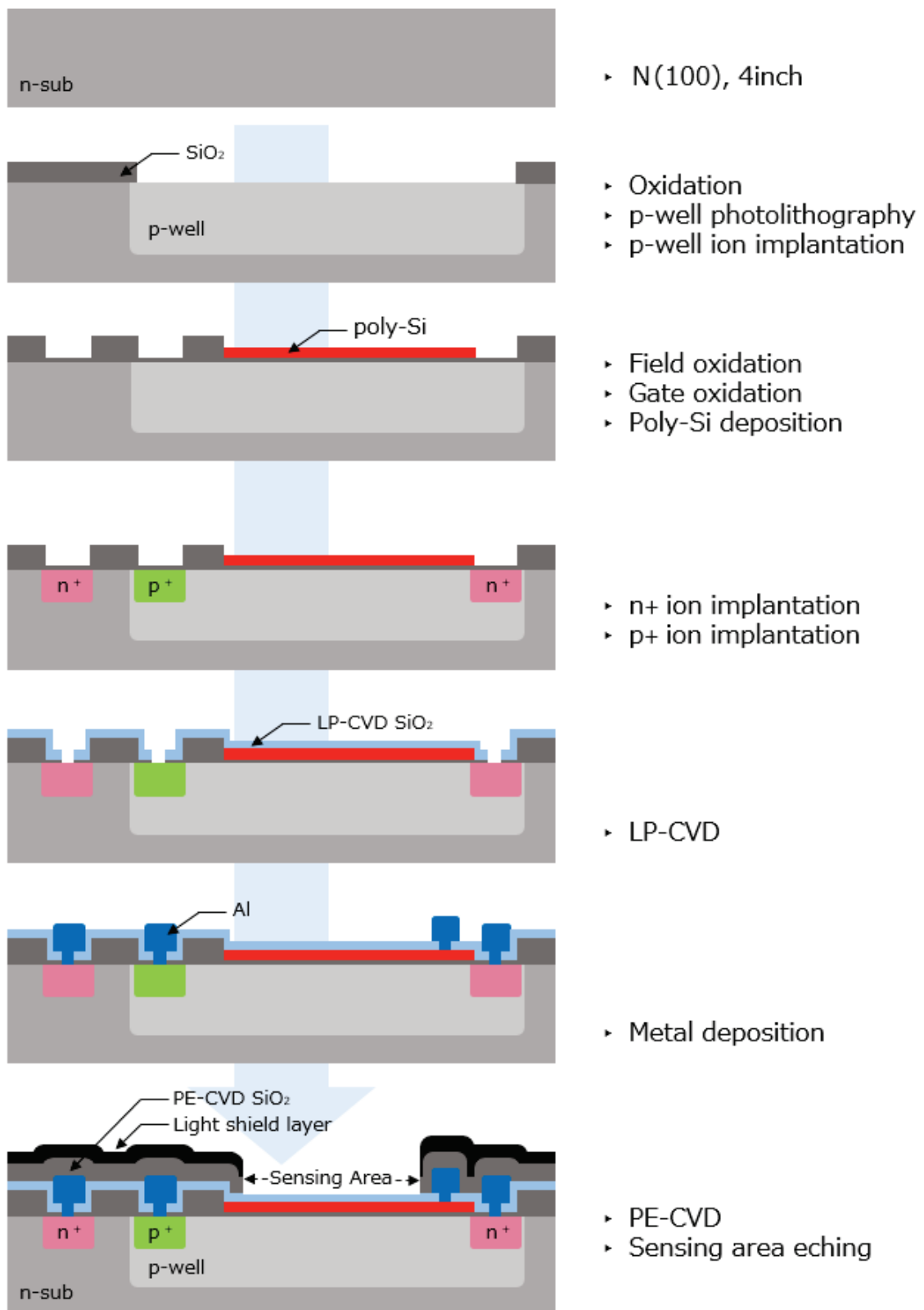


図 2.14 フィルタフリー蛍光センサのプロセス

参考文献

- [1] A. Jablonski, The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy, *Nature* 131 (1933) 839-840.
- [2] M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi, R. K. Pandey, The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy, *Chemical Society Reviews* 40 (2011) 340-362.
- [3] 三浦研二、長島眞喜子、今井千織, Application Note No.1 基礎編 : 蛍光についての基礎知識, *FUJIFILM Co. Ltd.*, 1998.
- [4] X. Peng, F. Song, E. Lu, Y. Wang, W. Zhou, J. Fan, and Y. Gao, Heptamethine Cyanine Dyes with a Large Stokes Shift and Strong Fluorescence: A Paradigm for Excited-State Intramolecular Charge Transfer, *J. Am. Chem. Soc* 127 (2005) 4170–4171.
- [5] A. Samanta, Dynamic Stokes Shift and Excitation Wavelength Dependent Fluorescence of Dipolar Molecules in Room Temperature Ionic Liquids, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 13704–13716.
- [6] 米本和也, CCD/CMOSイメージセンサの基礎と応用, CQ出版, 2003.
- [7] 安藤隆男, 菰淵寛仁, 固体撮像素子の基礎, 日本理工出版会, 1999.
- [8] S. M. Sze, 半導体デバイス、産業図書, 1987.
- [9] G. E. Jellison Jr. and F. A. Modine, Optical absorption of silicon between 1.6 and 4.7 eV at elevated temperatures, *Appl. Phys. Lett.* 41 (1982) 180.
- [10] H. Mutoh, Simulation for 3-D optical and electrical analysis of CCD, *IEEE Trans. Electron Devices* 44 (1997).
- [11] Link-Research Corporation, SPECTRA 3-dimensional device simulator.
- [12] Y. Maruyama, K. Sawada, H. Takao, M. Ishida, A Novel Filterless Fluorescence Detection Sensor for DNA Analysis, *IEEE Trans. Electron Devices* 53 (2006) 553-558.

第3章 センサの性能向上に向けた表面の平坦化

3.1 緒言

これまで本研究室で製作されたフィルタフリー蛍光センサにおける波長分離能力は励起光：蛍光の強度比で800:1であり、実用化のためには更なる波長分離能力の向上が必要であった。そこで、既存のフィルタフリー蛍光センサの評価を行い、波長分離能力を向上させるため、フォトゲートの材料であるPoly-Siの表面を平坦化することで、Poly-Siを通過した光の前方散乱を抑制し、波長分離能力の向上させたフィルタフリー蛍光センサを開発し、波長分離能力の評価を行った。

3.2 フォトゲートの改善

フィルタフリー蛍光センサではフォトゲート構造を採用しており、材料としてPoly-Siを用いている。フィルタフリー蛍光センサではセンシングエリア上部のPoly-Siフォトゲート電極を用いてポテンシャル深さを調節することができ、ポテンシャルの山型の鞍の位置よりSi表面側で発生した光電子のみを検出することができる。この特徴を用いて波長の異なる光の基板内での吸収特性の違いを読み取り、励起光と蛍光の光強度を算出している。センシングエリアに光が照射される際、光はPoly-Siゲート電極を通過して基板へと侵入してくる。この時にPoly-Si電極表面の平坦性が与える光の散乱の影響について検討を行った[1,2]。

フィルタフリー蛍光センサの検出領域に光源が照射されるとPoly-Siのゲートを通過してSi基板に浸透する。この時、2章で述べたように波長に応じてSi基板に吸収される光源の深さ W は、式(2.3)によって図2.8に示した。そしてフォトゲートの電位深さを調節して、その深さまで吸収された光電子を検出する。この時、図3.1(a)に示したようにPoly-Siの表面の粗さが粗い場合、光源の前方散乱の影響でSiの表面から深さ W まで到達する光が減少することを仮定することができる。その結果、深さ W まで浸透される光強度が減少するにより波長分離能力も低下が予想される。図3.1(b)は表面が平坦の場合を示しており、光がポテンシャル深さ W まで十分に侵入するので、性能の改善が予想される。

図3.2は、530 nmの光源をSiに照射したときに入射角度による光源の吸収深さを

示している。光の強度が10%となる深さを基準にして、光源の入射角度が増加するほど、光がSi基板に侵入される深さが減少する。したがって、Poly-Siの表面粗さを平坦化することにより、入射される光源の前方散乱を抑制すれば、ポテンシャルの深さ W までの光源が十分に吸収される。そこで、より高い波長分離能力を得られる。

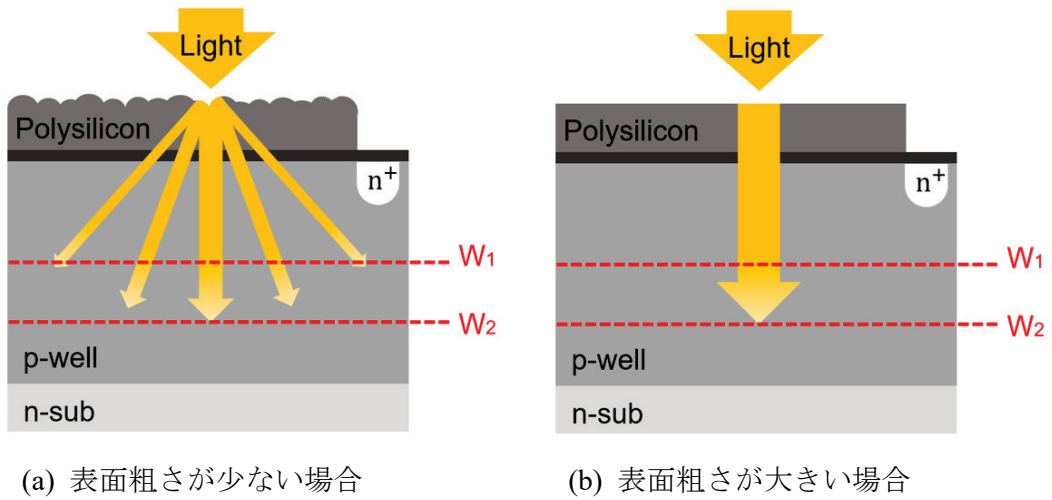


図 3.1 表面粗さによる光散乱の模式図

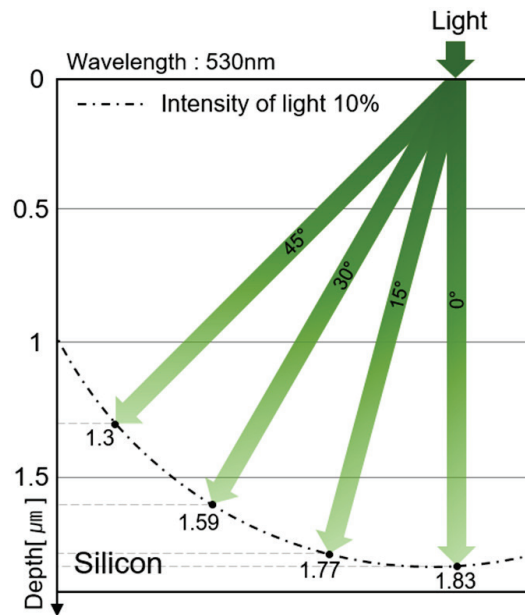


図 3.2 光源の入射角に応じた吸収深さ(λ :530 nm)

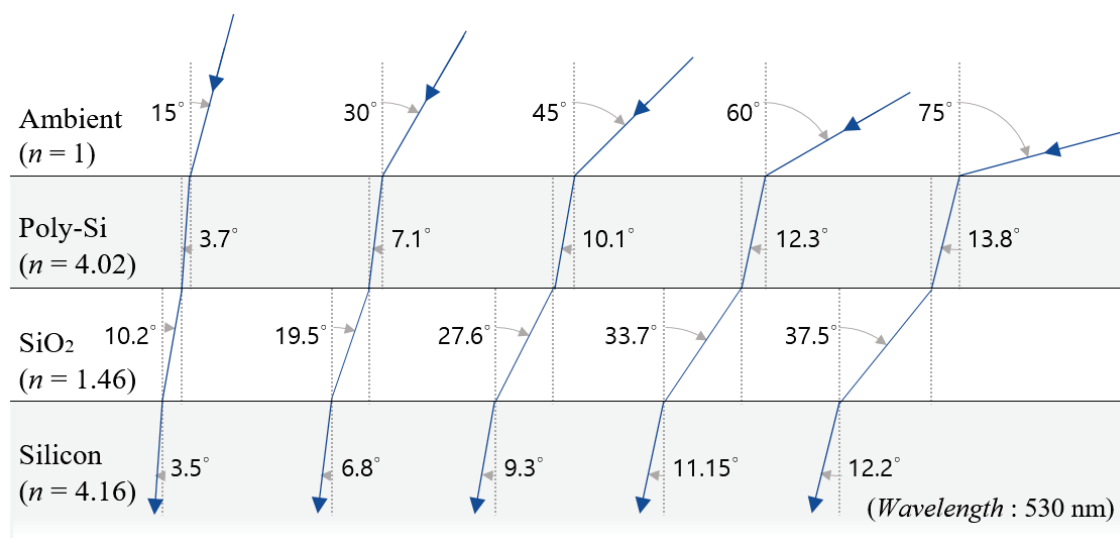


図 3.3 センサの多層膜による屈折率

次は、表面の粗さによって光の前方散乱の影響を屈折率モデルで解析する。屈折率 n_1 と n_2 の異なる二つの媒質が接しているときに媒質を通過する光の経路は、媒質に光束が違っているので歪めされるが、その曲がった程度を光の入射面上での角度で表示すると、 θ_1 と θ_2 となる。この時、次(3.1)のようにスネルの法則(Snell's law–Descartes law)に基づいて定義される。

$$\sin \theta_2 = \sin \theta_1 \cdot \frac{n_1}{n_2} \quad (3.1)$$

図3.3は多層膜で構成されているセンシングエリアに照射する光の角度に依存する屈折率を示している。今回解析では、Siに浸透される光成分の角度を計算するため、反射光は無視する。解析する媒質はアンビエント(空気)そして、Poly-Si、SiO₂、Siで構成されており、各層の屈折率 n はそれぞれ1、4.02、1.46、4.16である[3,4]。光がセンシングエリアに照射する際、表面の角度が15、75° の場合には約18.5、87.2° の屈折が発生する。この結果から、表面入射角に比べ、センサ内部ではより大きく屈折し、影響が大きくなると考える。

3.3 Poly-Si 成膜プロセスの検討

フィルタフリー蛍光センサは本学の固体機能デバイス施設で製作を行い、Poly-Si(Polycrystalline Silicon、多結晶Si)はLPCVD(Low Pressure Chemical-Vapor Deposition)装置を用いて堆積を行った。LPCVDを用いた成膜では、成膜温度を下げることで表面粗さが低減することが報告されている[5,6]。そこで今回新たに製作を行うフィルタフリー蛍光センサでは成膜条件を変更することで、表面粗さを低減させることを検討した。

これまでの本学の固体機能デバイス施設のLPCVD装置を用いて、成膜温度は620 °C、ガス圧力は67 PaでPoly-Siの堆積を行ってきた。図3.4にSEM(Scanning Electron Microscope : 走査型電子顕微鏡)による表面観察写真を用いた評価結果を示す。AFM(Atomic force microscopy)で評価したところ従来のセンサでは16.29 nmの表面粗さ(Peak-to-Valley : 91.29 nm)があり、基板に侵入していく光散乱の影響を受けていることが予想された。

今回は新たに成膜温度を下げた状態でPoly-Si成膜を行い、SEMやAFMで表面状態を観察し、表面粗さが低減されているか確認を行った。今回は新たに以下の2つの条件で成膜を行った(ここからは以下の条件を条件①、条件②として説明を行う)。

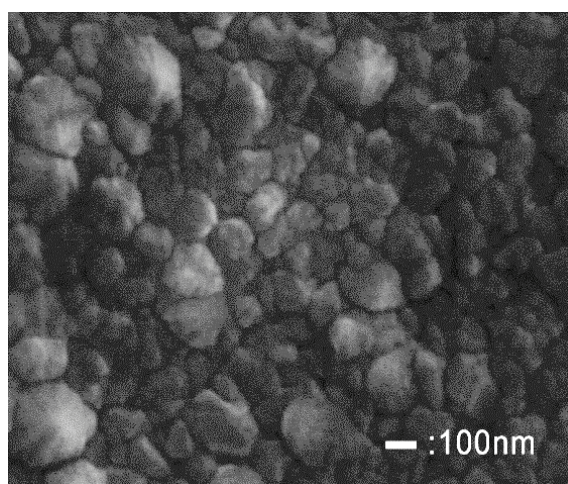


図 3.4 SEMを用いたPoly-Si表面の画像

- ・条件①：成膜温度= 550 °C、ガス圧力= 100 Pa
- ・条件②：成膜温度= 550 °C、ガス圧力= 70 Pa

図3.5(a)に条件①での観察結果を、図3.5(b)に条件②での観察結果を示す。表面SEMでの観察結果を従来条件である図3.4と比べると、堆積温度を低下させたことで明らかにグレインサイズが小さくなっていることが確認できる。また、条件①、条件②それぞれのAFM観察で求めた表面粗さは以下の値となった。

- ・条件①：RMS = 2.22 nm、Peak-to-Valley = 12.26 nm、成膜レート= 9.56 Å/min
- ・条件②：RMS = 1.63 nm、Peak-to-Valley = 9.499 nm、成膜レート= 8.01 Å/min

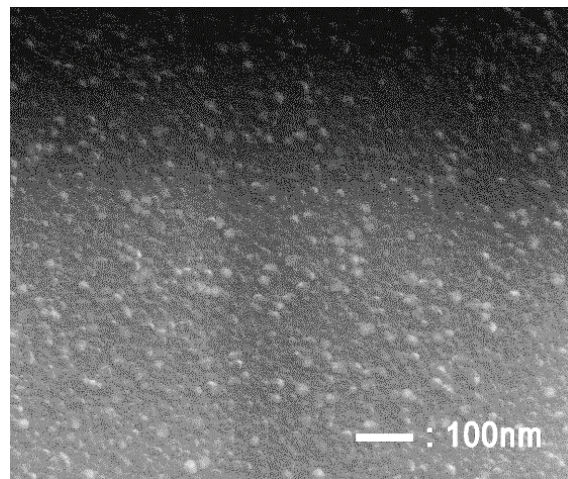
上記の結果より堆積温度を低下させたことで表面の粗さの実効値であるRMS(Root Mean Square)を低減できることを確認した。しかし、従来条件では成膜レートが58.2 Å/minであったのが上記の結果から分かるように大きく低下した。

また、このデバイスでイオン注入・アニール処理を行い、抵抗率の比較を行った。従来条件・条件①・条件②の抵抗率はそれぞれ 4.46×10^{-5} 、 7.48×10^{-6} 、 $1.13 \times 10^{-5} \Omega\text{m}$ となった。成膜条件を変更したPoly-Siの方が抵抗率は低い結果となり、文献で報告されている内容と一致した[6]。

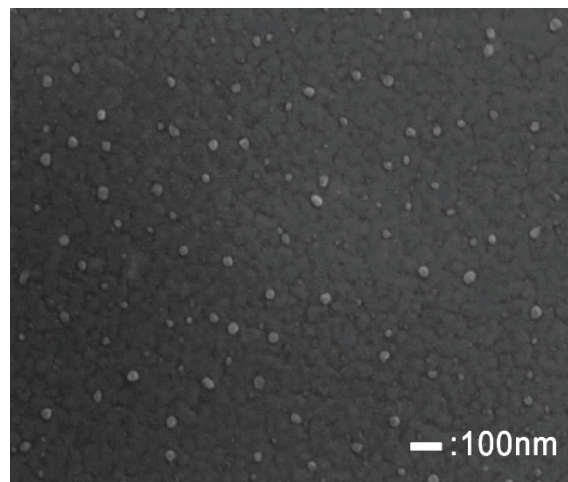
従来条件で成膜したPoly-Siと新たな条件で成膜したものの比較を表3.1に示す。この結果が示すように、従来と異なる条件でPoly-Siを成膜した結果、表面粗さを低減させることを実現した。そこで今回新たに製作するフィルタフリー蛍光センサでは堆積温度を低下させた条件①、条件②でPoly-Si成膜を行う。また、従来条件での堆積も行い、最終的にこの3条件で特性の比較を行った。

表 3.1 従来条件との比較

| | Temperature [°C] | Pressure [Pa] | RMS [nm] | Deposition Rate [Å/min] | Resistivity [Ωm] |
|------|---------------------|------------------|-------------|----------------------------|-----------------------|
| 従来条件 | 620 | 67 | 16.29 | 58.2 | 4.46×10^{-5} |
| 条件① | 550 | 100 | 2.22 | 9.56 | 7.46×10^{-5} |
| 条件② | 550 | 70 | 1.63 | 8.01 | 1.13×10^{-5} |



(a)



(b)

図 3.5 SEMを用いたPoly-Siの表面粗さ (a) 条件① (b) 条件②

3.4 従来条件における実験結果

3.4.1 散乱率の測定

成膜されたPoly-Siの表面粗さに応じた前方散乱率の測定を行うため、2インチ石英ウエハの片面にPoly-Siを成膜した。図3.6に散乱率の測定システムを示しており、顕微鏡の下部のハロゲン光源からPoly-Siが成膜された石英ウエハに550 nmの光源を照射した。Poly-Siを透過した光は対物レンズのNA(Numerical aperture)値を変更することによって、測定する角度の範囲を決めることができる。対物レンズを通過した

光はエボルランチフォトダイオードに検出される光電流によって光の強度が得られる。石英ウエハを透過する光とPoly-Siの表面によって透過する光の割合を計算した結果を図3.7に示す。測定角度 θ が増加するほど散乱の影響によって光の透過量が増加する。また、8.6と53°での測定値の差を計算して比較した場合、表面の粗さに応じて、約6%程度の散乱差が発生した。その結果、Poly-Siの表面平坦化によって光散乱の影響が減少するのが予測される。

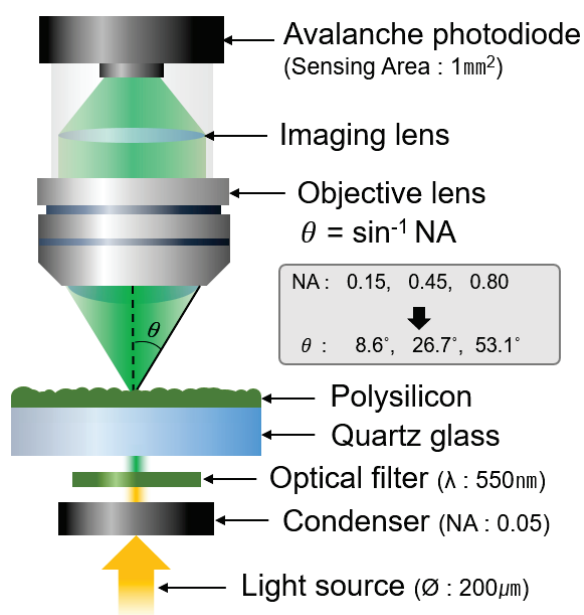


図 3.6 光散乱の測定システム

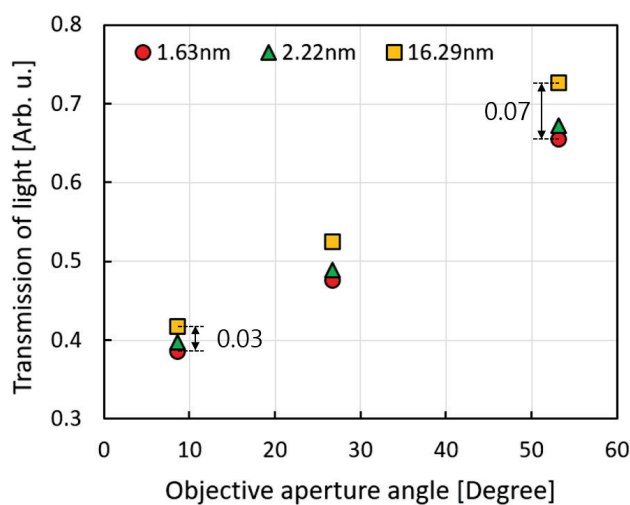


図 3.7 測定角度による光透過率

3.4.2 表面の粗さによる光電流の特性

表面の平坦化によるフィルタフリー蛍光センサの前方散乱の影響を光電流の測定により検証を行った。図3.8には表面の粗さによる光の侵入長の変化モデルを示す。Poly-Siが平坦で光散乱の影響が十分に小さいと仮定することができる場合には、フィルタフリー蛍光センサに入ってくる光は、図3.8(a)のように、直進成分だけで表すことができる。しかし、表面が粗い場合には光散乱の影響が発生するため、図3.8(b)のように基板内に侵入する光は様々な方向に散乱することになる。このとき、光電流はフォトゲートの電圧によって決定される空乏領域に照射された光源によって発生し、検出された光電流を I_{w1} とする。そしてフォトゲートに印加する電圧を増加させると、空乏領域が拡張されて発生する光量が増加し、光電流も増加する。このとき検出される光電流を I_{w2} とする。そのため、表面が粗いPoly-Siの光電流量は、 I_{w2} より I_{w1} が大きく、表面を平坦化したPoly-Siでの I_{w2} より I_{w1} が小さくなる関係が成立することになる。

図3.9は、検出領域に光源を照射するとき、フォトゲートの電圧を0.1 V間隔で1 Vから 3 Vまで印加する際に出た電流差の累積量を示している。フォトゲートの電圧が増加することによって、電位のピークが深くなる。したがって、フォトゲートの電圧による光電流の増加はSiの電位のピークまでに光が十分に吸収されていることを意味する。そこで、光電流の累積量を計算することにより、光の吸収深さを予測することができる。光源は直径200 μm の光ファイバを顕微鏡の上部にマウントされ照射する。そして、顕微鏡の対物レンズ(NA:0.15)を通過し、直径80 μm で照射した。

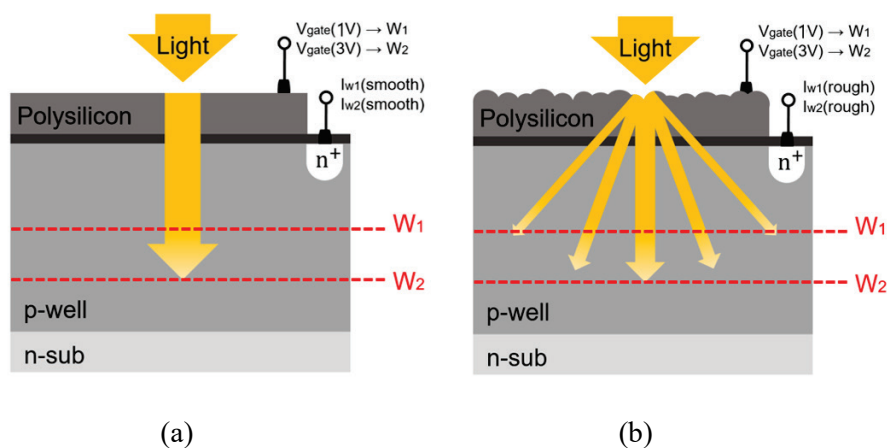
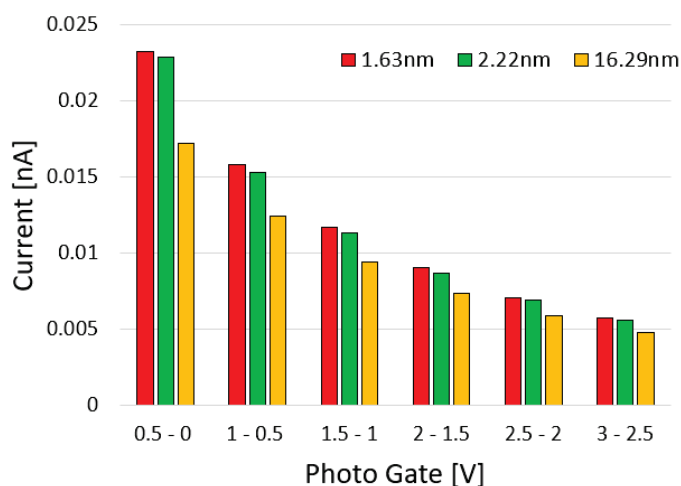
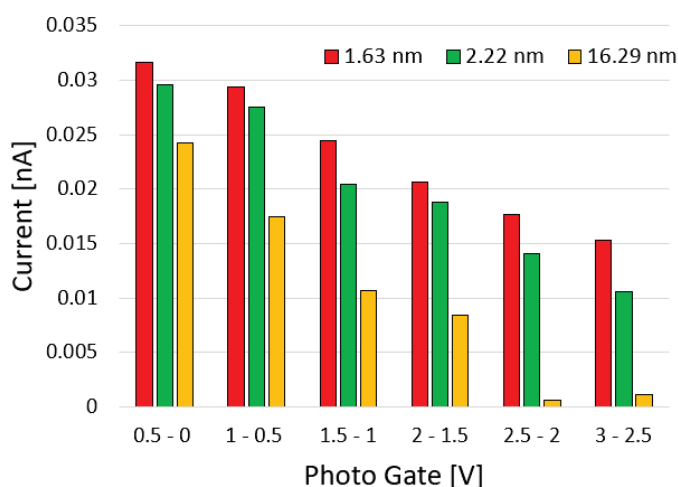


図 3.8 表面の粗さによる光の侵入長の変化モデル

図3.9(a)は470 nmの光源を照射した時のフォトゲートの電圧による出力電流の差分を示している。光源の90%は、0.8 μm の深さでSi基板に吸収され、光の散乱効果は微弱になる(図2.8参照)。図3.9(b)は、530 nmの光源を照射する時のフォトゲート電圧による出力電流の差分を示す。530 nmでの光源の90%は、1.83 μm の深さでSi基板に吸収される。吸収される深さは470 nmの吸収の深さよりも大きくなり、光を散乱させる効果が大きくなる。粗い表面(RMS : 16.9 nm)の場合、2 Vから電流が減少する。対照的に、平坦な表面(RMS : 1.63 nm)の場合には電流の変化量が粗い表面より大きくなる。これらの結果から、平坦な表面に入射する光はポテンシャル深さまで十分侵入され、粗い表面より電流量が向上する。



(a) $\lambda : 470 \text{ nm}$



(b) $\lambda : 530 \text{ nm}$

図 3.9 Poly-Siの表面による電流差の累積量

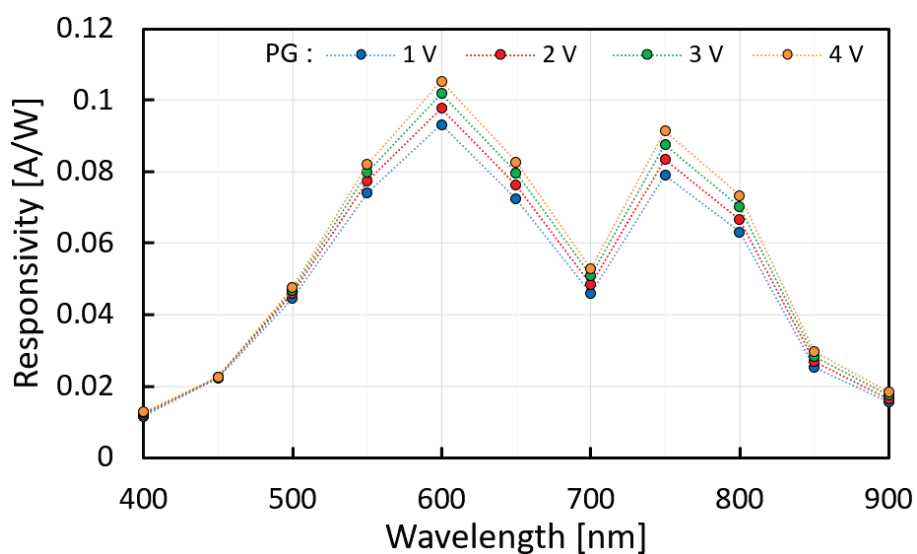


図 3.10 センサのスペクトル応答

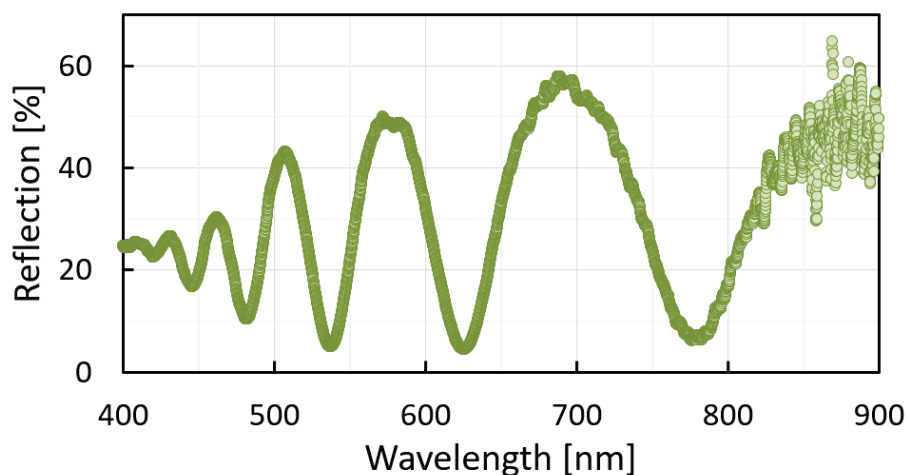


図 3.11 センシングエリアの反射率

3.4.3 単一波長に対するセンサの応答

フィルタフリー蛍光センサは、フォトゲートの構造でSiliconの吸収係数により約400から900 nmの波長を検出することが可能あり、単一波長によるセンサの応答について評価を行った。図3.10にセンサのスペクトル応答を示し、レーザ駆動光源 (Energetiq、EQ-99)を用いて測定を行った。各光源の半値幅は10 nm、 \varnothing 80 μm の直径、波長は400から900 nmまで50 nmの単位で測定した。各波長に対して400、700、900 nmの応答性が比較的に低いことがみられる。400 nmの場合には、一般的に短波長の方が

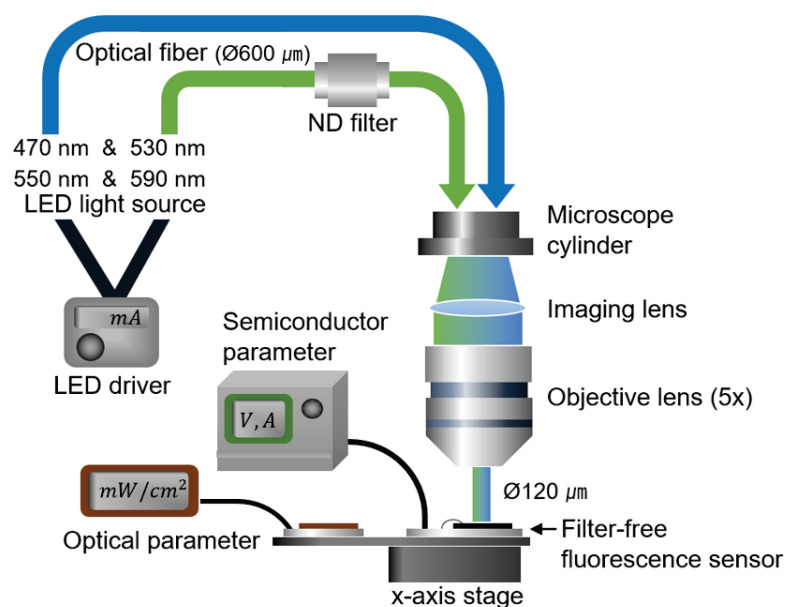


図 3.12 波長分離能力の測定システム

高い吸収係数を持っているため、大きな光電流の出力が予測されるが、フォトゲートによりほとんど吸収され、応答性は比較的低いと考えられる。フィルタフリー蛍光センサは、多層(Poly-Si、SiO₂、Si)で構成されており、干渉の影響により検出領域に入射する光の割合が変わる。したがって、700 nmの波長は図3.11に示しているセンシングエリアの反射率によって、吸収される光成分の減少の影響でセンサの応答性が低下されたと予想される。そして、750 nmを超える波長は電位の深さより深い領域に吸収され、応答性を低下されたと考えられる。この問題点は、p-well層及びポテンシャル深さを調整することによって解決できると考えられ、長波長において高い応答が期待される。一般的に使用されている蛍光試薬の発光範囲は、約420~875 nmの範囲にあると報告されている(ex. DyLight 405、DyLight 830)。その結果から、フィルタフリー蛍光センサを用いて、ほとんどの蛍光試薬に適用することが可能であると考えられる。

3.4.4 フィルタフリー蛍光センサの波長分離能力

図3.12は、センサの波長分離能力を測定するために構築された測定系を示している。波長分離能力を正確に測定するためには、照射される光の強度の均一性、繰り返し測定による誤差の最小化が必要である[7]。顕微鏡の上部には二つの光ファイバが

マウントされ同時に光を照射する。励起光は470 nmの波長、蛍光530 nmの波長を利用し、光源は対物レンズを通過させてセンサの検出領域に照射される。光源の強度は、光パワーメータ(ADCMT 8230)を利用して測定を行う。自動x軸ステージを用いて、光源が照射される領域にフィルタフリー蛍光センサと光パワーメータを移動する。半導体パラメータアナライザ(Agilent 4155A)を用いて、センサの電気的特性を測る。

図3.13に、測定回路を示す。本センサは強い励起光と微弱な蛍光が同時に照射される。そのため、励起光のみを照射したときの出力電流が大きくばらつく場合、微弱な蛍光による電流変化は埋もれてしまい検出不可能となる。そこで励起光のみを照射したときの出力電流のばらつきを検討した。今回の測定はフォトゲート電圧を1、3 Vで印加し、光源(530nm)を $10\mu\text{W}/\text{cm}^2$ で照射した。光電流は各フォトゲート電圧に対して100回測定されており、図3.14に結果を示す。フォトゲートに1 Vと3 Vの電圧を印加した場合、光電流の最小範囲と最大範囲はそれぞれ7 pAと4 pAである。表3.1は、光電流の平均値及び標準偏差を示す。

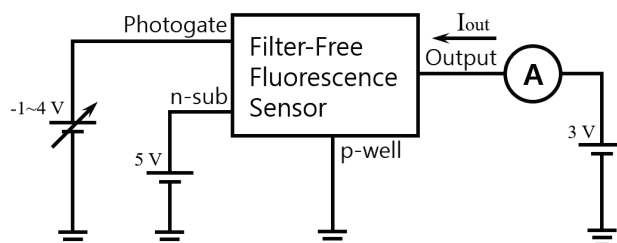


図 3.13 測定回路

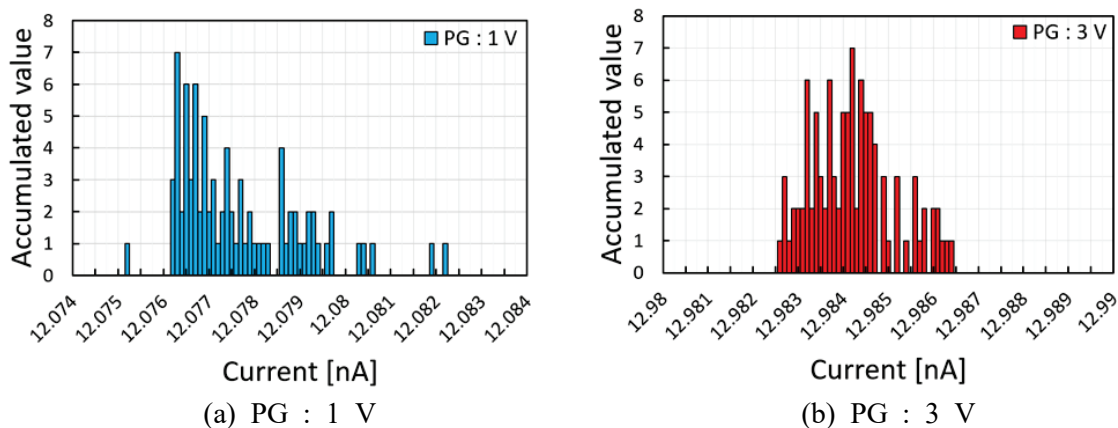


図 3.14 フォトゲート電圧におけるヒストグラム

表 3.1 光電流の平均値とその標準偏差。

| | PG : 1 V | PG : 3 V |
|-----------|-----------------------|-----------------------|
| 平均電流値[nA] | 12.08 | 12.98 |
| 標準偏差 | 1.48×10^{-3} | 0.94×10^{-3} |

フィルタフリー蛍光センサの波長分離能力を測定するために、470 nmの光を均一な強度で照射し、530 nmの光の強度のみを調整する。そして、光を照射した後のフォトゲート電圧を制御することによって電位深さを調整する。波長分離能力は、470 nmの光強度の感度を均一にした場合に530 nmの光強度の感度を徐々に低下させ、変化しない最低領域として定義する。フォトゲートに1から4 Vまでの電圧を印加することによって、電位の深さ W_1 および W_2 を調整する。センサに入射する 470、530 nmの光源の最大強度を5000 nW/cm²と設定し、530 nmの光強度のみを5000から0.1 nW/cm²まで徐々に減少させながら出力電流を測定する。さらに、入射光の強度に対する波長分離能力の依存性を検討するため、最大光度の強度を2000、5000、7000 nW/cm²に設定し530 nmの光強度のみを徐々に減少させた。

測定した電流を式(2.10)と式(2.11)に代入して、連立方程式を解くことにより、470、530 nmの光の強度 ϕ_{ex} と ϕ_{em} を得られる。図3.15は、測定光強度 ϕ_{ex} 、 ϕ_{em} に吸収比を適用することにより、波長分離能力が推定値に近づくことを示す。表面の粗さ(RMS : 16.29 nm)の波長分離能力は800 : 1であったが、平坦面(RMS : 1.63 nm)による分離能力は1250 : 1を得られた[8,9]。図 3.16は、入射光の強度に対する分離能力の依存性を示している。入射光の最大強度が2000、5000、7000 nW/cm²の場合、3 %以下の誤差が確認される。この結果から、波長分離能力は入射光の強度に依存しないことを意味する。つまり、光の強度を大きくしても、波長分離能力の限界が存在することで説明ができ、暗電流に依存しない事が分かる。表面の平坦化による前方散乱光の抑制により、フィルタフリー蛍光センサの分離能が2倍以上に向上することが確認された。

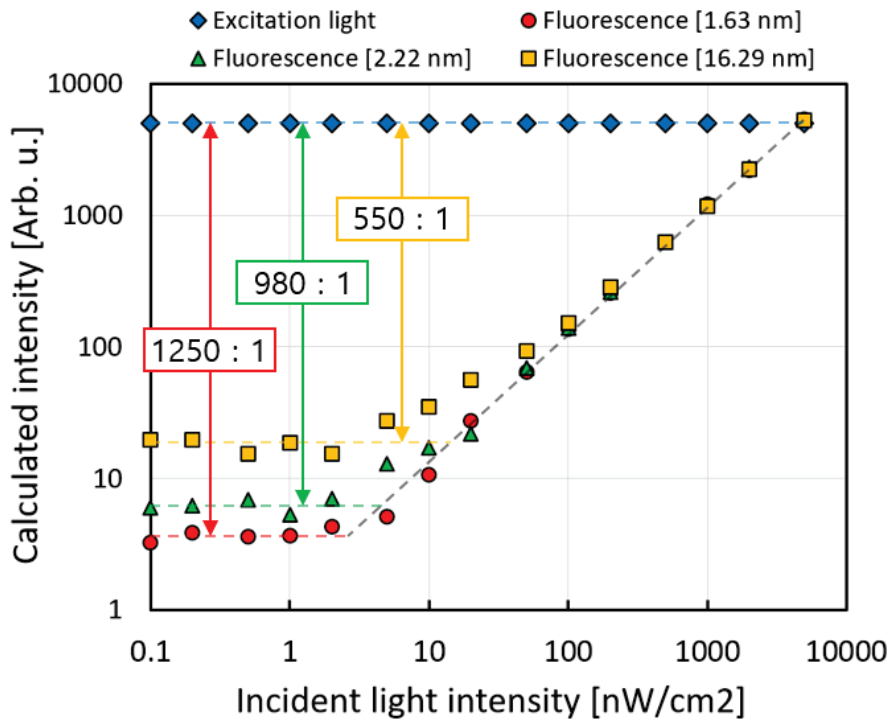


図 3.15 フィルタフリー蛍光センサの波長分離能力

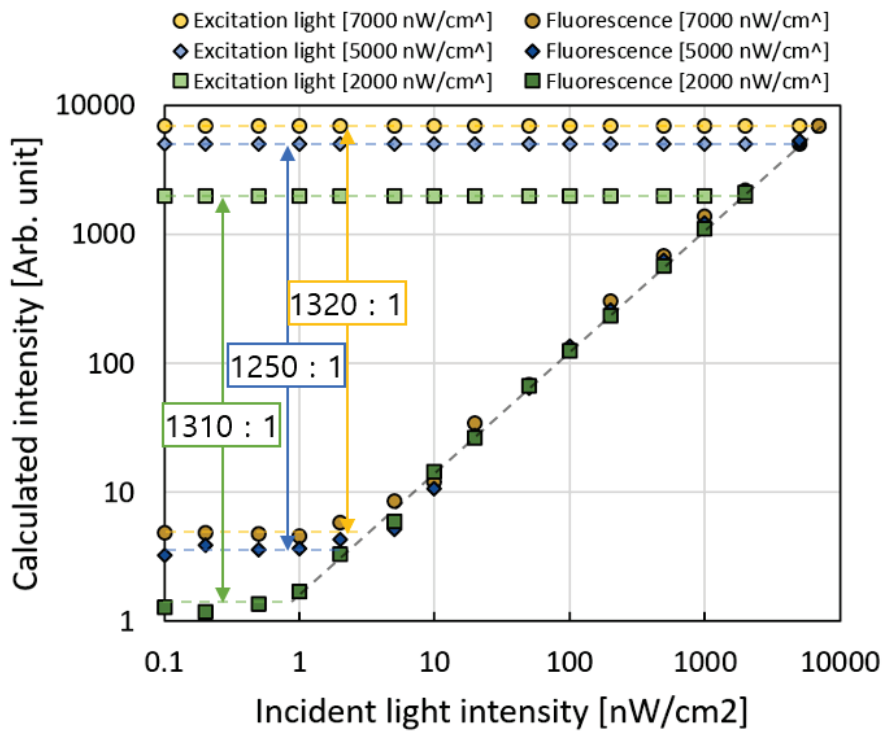


図 3.16 光強度による波長分離能力

3.5 結言

フィルタフリー蛍光センサの分離能力を向上するために、Poly-Si表面の平坦化を改良した。光の散乱の影響について、表面粗さによる光散乱モデル及び入射角度による吸収深さを提示した。フォトゲート材料であるPoly-Siの平坦化のため、低温でのLPCVDを行い、表面粗さを16.29から1.63 nmに減少した。提案したより表面粗さを有するPoly-Si表面は、Si基板内の入射光の散乱を減少させ、電位ピーク W の深さとゲート電極との間に発生する光電流が増加した。成膜されたPoly-Siの表面粗さに応じた前方散乱率の測定をするため、フォトゲートの電圧に対する光電流の差を算出した。そして、波長分離能力の誤差を減らすため、自動測定システムを構築した。入射光の強度に対する依存性の実験を行い、波長分離能力は入射光の強度に依存しないことを確認した。平坦化により、フィルタフリー蛍光センサの波長分離能力は800 : 1から1250 : 1まで増加した。

参考文献

- [1] H. E. BENNETT and J. O. PORTEUS, Relation Between Surface Roughness and Specular Reflectance at Normal Incidence, *Journal of the Optical Society of America* 51 (1961) 123.
- [2] J. E. Harvey, S. Schröder, N. Choi, and A. Duparré, Total integrated scatter from surfaces with arbitrary roughness, correlation widths, and incident angles, *Optical Engineering* 51 (2012) 013402.
- [3] D. E. Aspnes and A. A. Studna. Dielectric functions and optical parameters of Si, Ge, GaP, GaAs, GaSb, InP, InAs, and InSb from 1.5 to 6.0 eV, *Phys. Rev. B* 27 (1983) 985-1009.
- [4] I. H. Malitson. Interspecimen comparison of the refractive index of fused silica, *J. Opt. Soc. Am.* 55 (1965)1205-1208.
- [5] T. I. Kamins, Structure and Properties of LPCVD Silicon Films, *J. Electrochem. Soc.* 127 (1980) 705–713.
- [6] E. Irene, E. Tierney, and D. W. Dong, Silicon Oxidation Studies: Morphological Aspects of the Oxidation of Polycrystalline Silicon, *J. Electrochem. Soc.* 127 (1980) 705–713.
- [7] H. Ishii, Y. Maruyama, H. Takao, M. Ishida, and K. Sawada, Improvement in filter-less fluorescence sensor capability by optimization of potential distribution, 4th Asia Pacific Conf. *Transducers Micro/Nano Distrib.*, (2008) .
- [8] Y. J. Choi, K. Takahashi, M. Matsuda, T. Hizawa, Y. Moriwaki, F. Dasai, Y. Kimura, I. Akita, T. Iwata, M. Ishida, and K. Sawada, Filter-less fluorescence sensor with high separation ability achieved by the suppression of forward-scattered light in silicon, *Japanese Journal of Applied Physics* 55 (2016) 04EM10.
- [9] Y. J. Choi, K. Takahashi, M. Matsuda, T. Hizawa, Y. Moriwaki, F. Dasai, Y. Kimura, I. Akita, T. Iwata, M. Ishida, and K. Sawada, Improvement of filter-less fluorescence sensor by the surface planarization of polysilicon photogate, *Solid State Devices and Materials (SSDM 2015)*, Hokkaido, Japan, (2015) 398-399.

第4章 蛍光試薬の検出

4.1 緒言

第4章では、表面平坦化により性能向上されたフィルタフリー蛍光センサを用いて、DNAや抗原抗体反応、タンパク質などの検出に広く使用されているFITC-I(Fluorescein-4-isothiocyanate)及びTexas Red(Sulforhodamine 101 acid chloride)に対する励起光と蛍光を検出する方法で性能評価を行った結果を述べる。実用化を向け蛍光物質から放出される2つ以上の光成分を同時に測定する。そして、波長に対する光電流を用いてパラメータ計算法を提案し、センサの検出能力を向上させる。また、FITC-IとTexas Redの混合試薬から放出する3つの波長に対する、同時検出法について検討を行う。

4.2 蛍光試薬への適用

4.2.1 蛍光試薬

フィルタフリー蛍光センサの検出性能を評価するため、蛍光試薬として広く使われているFITC-IとTexas Redを用いて定量的な評価を行う。FITCは蛍光試薬Fluoresceinにアミノ基反応性であり、水に溶解して強い黄緑色蛍光を放出(λ_{ex} :495 nm、 λ_{em} :520 nm)する。アミノ基と容易に反応するため、アミノ酸、酵素、ホルモン、ペプチド、ウイルスなどの蛍光標識に適用する[1,2]。Texas Redは、タンパク質とアミノ酸に結合し、強い赤色の蛍光を放出(λ_{ex} :568 nm、 λ_{em} :590-630 nm)する[3]。酵素の活性を維持しながら、標識することができるという利点を有する。図4.1にはFITC-IとTexas Redの化学式及びモル濃度を示す。

蛍光試薬から放出する光成分の検出を行うため、サンプルとして50 %のエタノールで希釈して、50 μ Mの蛍光試薬を準備した。以前の研究では0.5 μ MのTexas Redからの蛍光を検出してきた。そこで、性能が向上したフィルタフリー蛍光センサで低濃度の試薬を検出するため最低0.01 μ Mを用意した。図4.2には、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50 μ MのFITC-IとTexas Redの試薬を示しており、蛍光試薬はディスポセルに3.0 mL入れて角型フタを利用し気化を防止する。

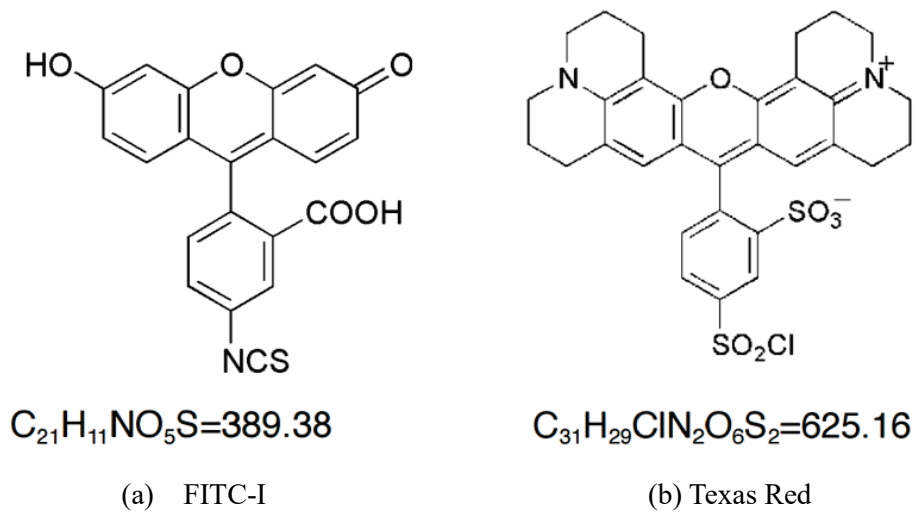


図 4.1 FITC-IとTexas Redの化学式

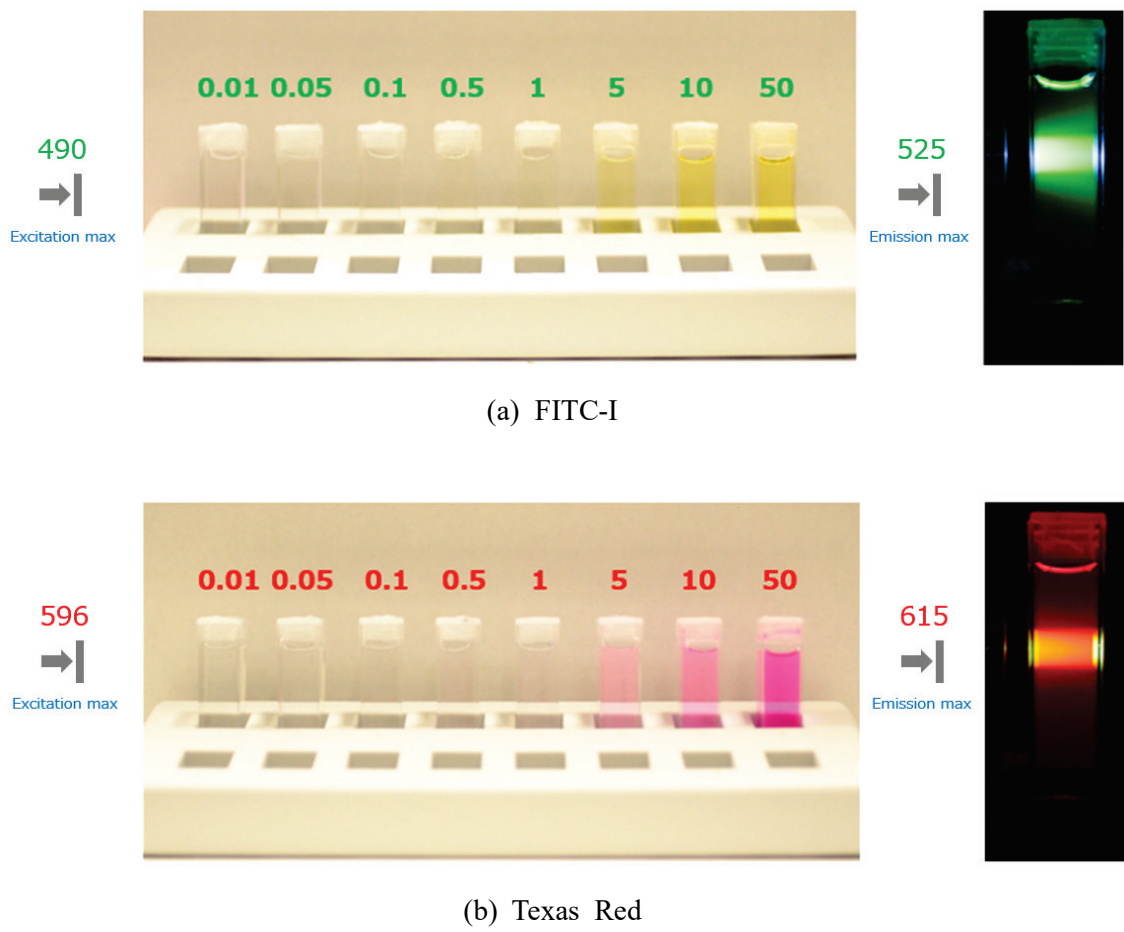


図 4.2 濃度による蛍光試薬

4.2.2 ゲート電圧－光電流特性の波長依存性

フィルタフリー蛍光センサの波長に対するゲート電圧－光電流特性を検討した。光源の波長は、バンドパスフィルタ(半値幅：10~20 nm)を通過させることにより調整できる。光源は、 $\varnothing 150 \mu\text{m}$ の直径、 $5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の強度で検出領域に照射した。フォトゲートとn型Si基板の電圧は-1~4 Vと5 Vを印加し、半導体パラメータアナライザから出力する光電流を測定した。図4.3は、波長を変化させたときのゲート電圧－光電流－電圧特性を示す。450 nmの波長は、光の90%が深さ $0.7 \mu\text{m}$ でSi基板に吸収される。入射光が浅いSi表面側に吸収され、フォトゲート電圧が増加する際にも光電流の差は比較的小さくなる。対照的に625 nmの波長は $1.9 \mu\text{m}$ まで浸透し、フォトゲート電圧によって80 nAの電流差が発生する。その結果から、波長の成分はSiの吸収係数に基づいてフォトゲート電圧を変化させることによって導出することができる。その結果から、出力電流の差を計算することによって、ある光源の波長を決定することも可能である。

図4.4は、フィルタフリー蛍光センサの検出領域及び遮光膜の反射率を示す。検出領域の外部に蒸着された遮光膜(Al)は約20~28%の反射率であることが分かる。しかし、検出領域は光の干渉の影響ため、605 nmの波長で最大の反射率を見ることが出来る。一般的に、Siの吸収係数 α が波長550 nmよりも小さい625 nmの波長では大電流が期待されるが、干渉により反射率が増加し、出力電流は波長550 nmよりも小さくなった。

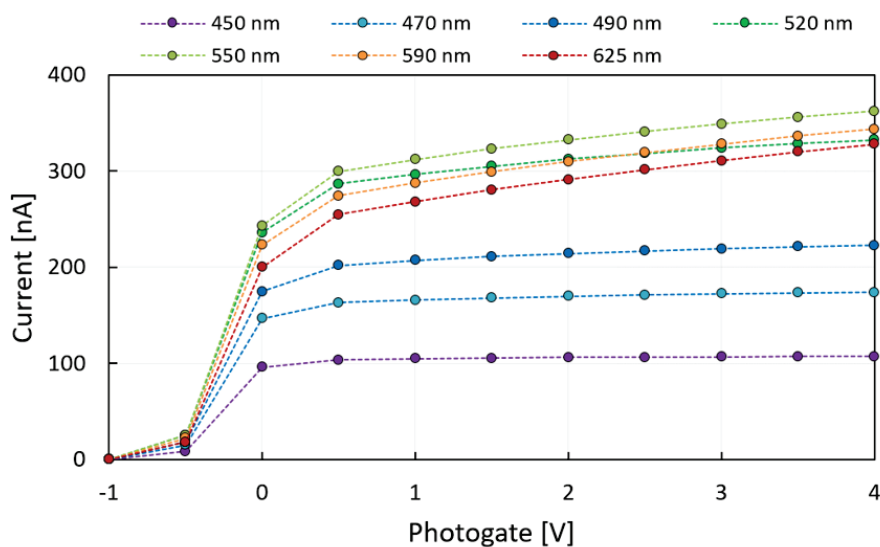


図 4.3 単一波長に対する電流特性

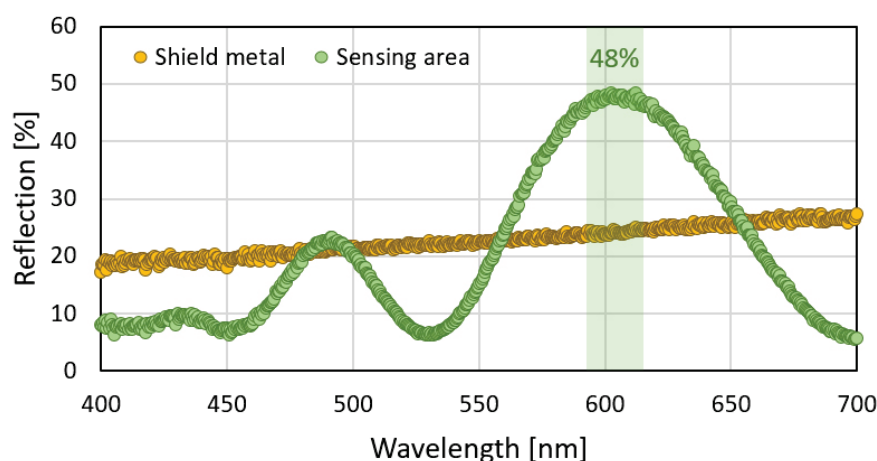


図 4.4 検出領域と遮光膜の反射率

表 4.1 波長によるSiの吸収係数と蛍光分析に用いた励起光(λ :490 nm)の強度

| λ (nm) | α (cm ⁻¹) | Intensity of excitation light (Arb. unit) |
|----------------|------------------------------|---|
| 470 | 1.72×10^4 | 18.02 |
| 480 | 1.48×10^4 | 78.82 |
| 490 | 1.27×10^4 | 94.69 |
| 500 | 1.11×10^4 | 6.11 |

4.2.3 生物測定を向けたパラメータの提案

蛍光試薬から放出する微弱な蛍光を測定するため、光強度の正確な計算が要求される。表4.1に、Siの吸収係数と蛍光分析に用いた励起光の強度を示す。蛍光分析に用いた励起光の半値幅(FWHM)が比較的広いため、波長 λ とSi吸収係数 α も比較的広い範囲を持っており、光強度の計算式(2.10)には限界がある。この問題を解決するために、センサの出力電流と波長に基づくパラメータを用いた光強度を算出する方法を提案した[7]。

センサの出力電流と波長に基づいたパラメータを用いて光強度を算出する方法を提案する。式(2.6)に電流 I と光強度 ϕ を除いた残りの成分は、式(2.8)及び式(2.9)のそれぞれを以下のようにパラメータA、B、C、Dで表すことができる。

$$A = \frac{qS\lambda_1}{hc}(1 - e^{-a_1W_1}) \quad (4.1)$$

$$B = \frac{qS\lambda_2}{hc}(1 - e^{-a_2W_1}) \quad (4.2)$$

$$C = \frac{qS\lambda_1}{hc}(1 - e^{-a_1W_2}) \quad (4.3)$$

$$D = \frac{qS\lambda_2}{hc}(1 - e^{-a_2W_2}) \quad (4.4)$$

出力電流の成分は、それぞれの電流の和で表すことができる。

$$I_{w_1} = A \cdot \phi_1 + B \cdot \phi_2 \quad (4.5)$$

$$I_{w_2} = C \cdot \phi_1 + D \cdot \phi_2 \quad (4.6)$$

光強度 ϕ_1 、 ϕ_2 は、式(4.7)の逆行列によって算出することができる。

$$\begin{bmatrix} \phi_1 \\ \phi_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} I_{w_1} \\ I_{w_2} \end{bmatrix} \quad (4.7)$$

同様に、3つの波長の強度の式は、パラメータA~Iを式(4.8)に代入することによって計算することができる。

$$\begin{bmatrix} \phi_1 \\ \phi_2 \\ \phi_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A & B & C \\ D & E & F \\ G & H & I \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} I_{w_1} \\ I_{w_2} \\ I_{w_3} \end{bmatrix} \quad (4.8)$$

図 4.5にFITC及びTexas Redの計算されたパラメータ及びスペクトルを示す。FITCのパラメータ値は、励起光(470 nm)および蛍光(520 nm)のピークに位置する2 Vと4 Vのフォトゲート電圧の接点によって表すことができ、Texas Redは励起光(550 nm)および蛍光(610 nm)のピークで得られる。

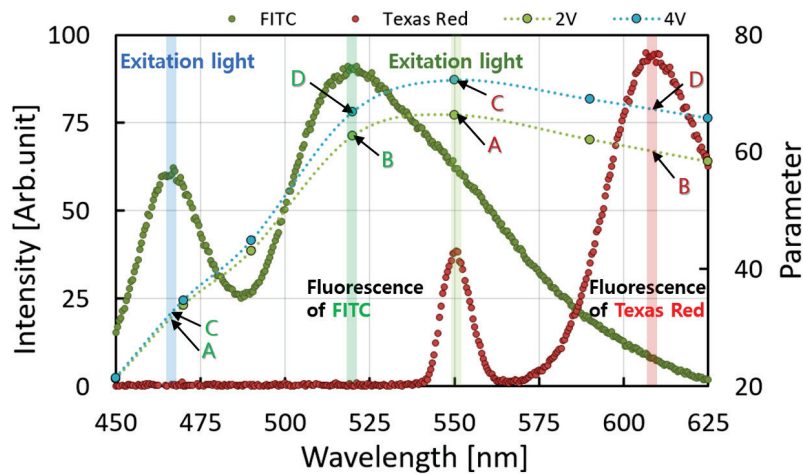
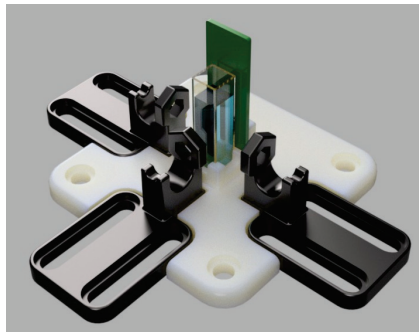
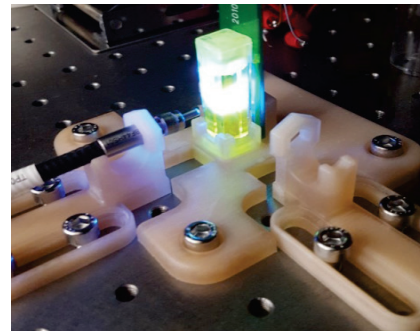


図 4.5 FITCとTexas Redのスペクトルとセンサのパラメータ



(a) 3次元モデル



(b) 測定ジグ

図 4.6 3Dを用いた測定システム

4.2.4 蛍光試薬の測定

蛍光センサには励起光の1:1000以下の蛍光検出能力が必要である。そして、測定時に誤差を最小にするため、3Dプリンタを用いてジグを設計・作製した。センサ・励起光源・ディスプレイを固定することで、測定システムを最適化した。図4.6に3Dを用いた測定システムのジグを示す。図4.7に半導体パラメータアナライザを用いた、フィルタフリー蛍光センサによる蛍光試薬の評価系を示す。FITC及びTexas Redを評価するために、ディスプレイの側面に、波長470、550 nmの励起光を照射する。半導体パラメータアナライザを用いてセンサを制御し、蛍光試薬から放出する蛍光の光電流を測定する。450、550 nmの波長の励起光をそれぞれ10、4 mW/cm²の強度で照射し、溶液中のFITC及びTexas Redの濃度は0.01から50 μMまで変更する。

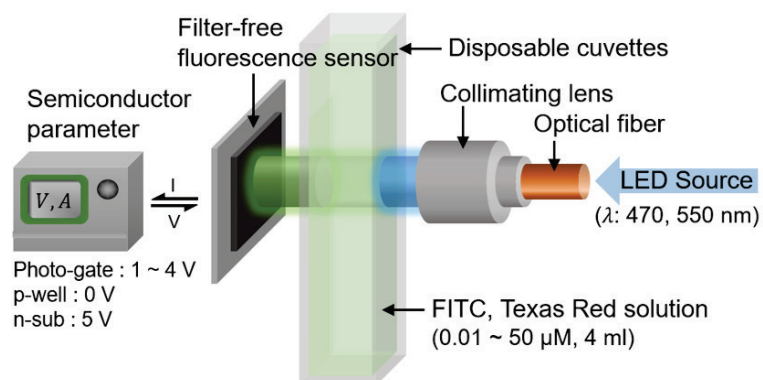
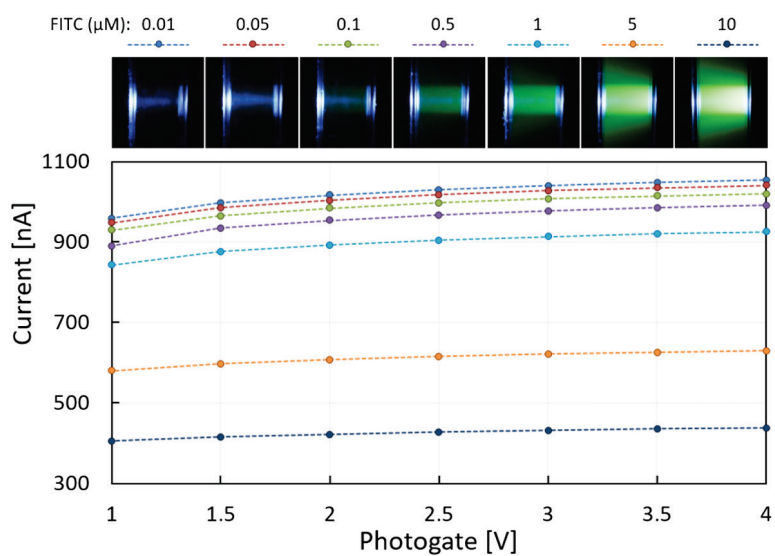
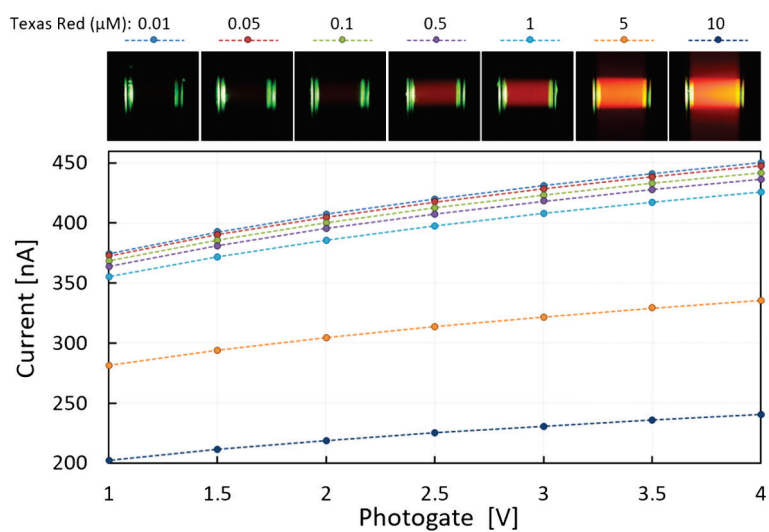


図 4.7 蛍光試薬の測定システムの概略図

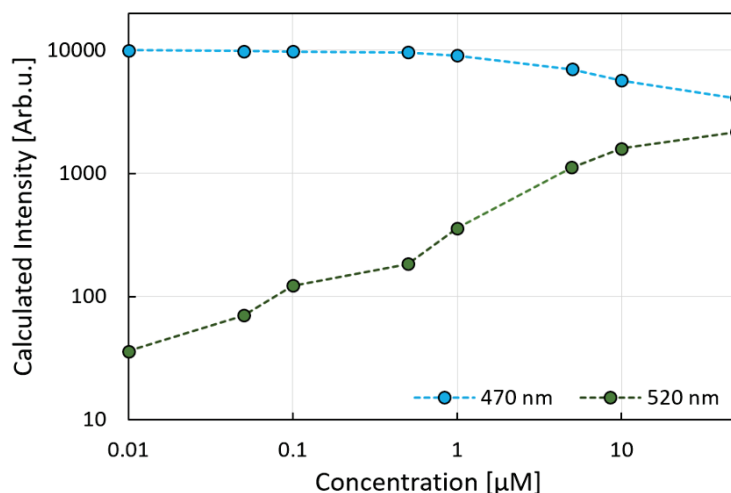


(a) FITC

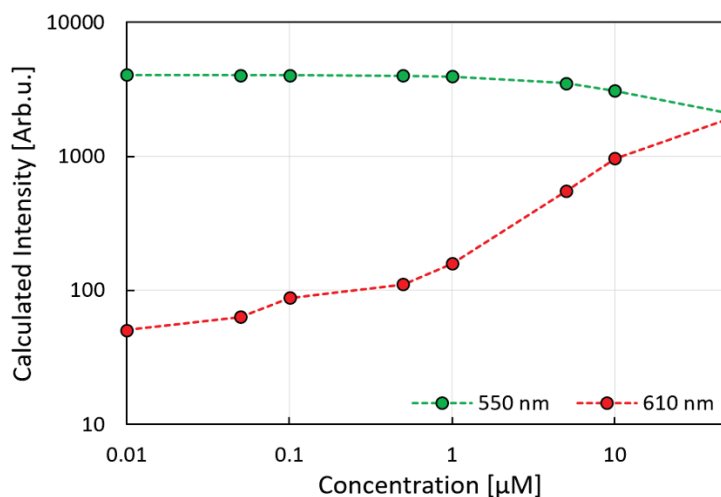


(b) Texas Red

図 4.8 蛍光試薬による光電流



(a) FITC



(b) Texas Red

図 4.9 励起光と蛍光の強度 (ディスプレイセル)

図4.8に1~4 Vの電圧をフォトゲートに印加する際のセンサの光電流を示す。励起光と比較して蛍光は非常に弱いため、FITC及びTexas Redの濃度が増えると光電流は減少する。470、570nmの励起光を用いた場合、光の90 %が深さ0.8、1.8 μmのSi基板に吸収される。また、50 μM以上の濃度は、FITC及びTexas Redが飽和する。

FITC及びTexas Redの濃度光強度計算結果を図4.9に示す。励起光と蛍光の強度は、フォトゲート電圧が1、4 Vのパラメータを用いて、式(4.7)を解くことによって算出する。FITC溶液の計算結果を図4.9(a)に示しており、0.01 μMの濃度まで検出可能であった。また、Texas Redの計算結果を図4.9(b)に示しており、610 nmでの蛍光は

0.01 μM の濃度まで検出した。その結果、提案したパラメータを用いて、サブミクロン

表 4.2 蛍光センサの性能比較

| | [10] | [11] | 本研究 |
|------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| フィルタの種類 | 吸収フィルタ (Absorption) | 干渉フィルタ (Interference) | フィルタフリー Filter-free |
| 励起範囲 | < 520 nm | 488 nm | 400 - 900 nm |
| 検出範囲 | > 490 nm | 510 - 600 nm | |
| LOD (FITC) | 1 - 10 nM | 1 nM | 10 nM |

濃度まで観測された。表4.1は、最近報告されている蛍光センサとのスペックを比較している。フィルタフリー蛍光センサは干渉フィルタや吸収フィルタを採用している蛍光センサと検出限界(LOD)が似ている。そして、フィルタを採用しているセンサは、様々な蛍光試薬への対応が困難になる。しかし、フィルタフリー蛍光センサは様々な蛍光試薬からの励起光と蛍光強度を分離して、同時に測定することが可能である[8]。

4.2.5 3波長の分離

フィルタフリー蛍光センサは、フィルタを使用せずに光強度を測定することから、理論的に二つ以上の波長を同時に検出することが可能である特徴を有する。そこで、提案したパラメータ法を用いてFITCとTexas Redの混合溶液から放出する2波長と励起光の同時検出について検討した。図4.10は溶液の濃度に対するスペクトルを示しており、励起光は90度の角度で照射する際に放出する光を分光計(USB4000)で測定した結果を示す。FITC(1 μM)及びTexas Red(1 μM)の場合、低濃度の蛍光溶液によって470 nmの励起光のみ放出する。FITC(10 μM)及びTexas Red(10 μM)の場合、470、520、610 nmの波長が放出された。470 nmでの光強度は、10 μM 濃度のFITC試薬によって減少し、520 nmで放出する。FRET(Fluorescence resonance energy transfer)という蛍光エネルギー移動のため、FITCの蛍光(520 nm)を励起光としてTexas Redの試薬に吸収され、610 nmの波長が放出する[4-7]。FITC(1 μM)及びTexas Red(10 μM)の場合、470、520 nmの波長は励起光としてTexas Redに吸収され、610 nmで微量の蛍光を放出

する。3つの波長の検出するため、1、5、10 μM の濃度のFITC及びTexas Redを混合(4 mL)して放出する光成分を測定した。入力光源の波長は470 nm、強度は1 mW/cm^2 であり、フォトゲートの入力電圧はそれぞれ2、3、4 Vである。電流の平均値を各溶液について5回測定し、その結果を図4.11に示す。測定された電流値は、FITC濃度による励起光の強度に大きく依存している。同じFITC濃度の場合、光電流はTexas Redの濃度によって変化した。

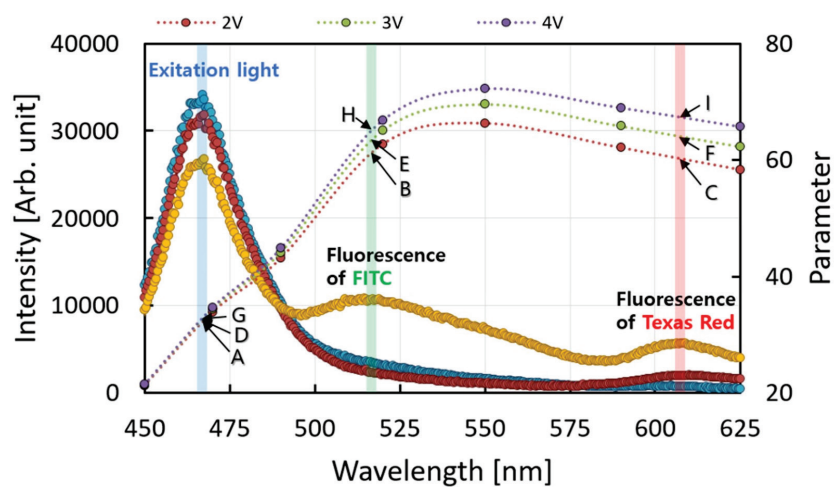


図 4.10 FITCとTexas Redの混合溶液のスペクトル

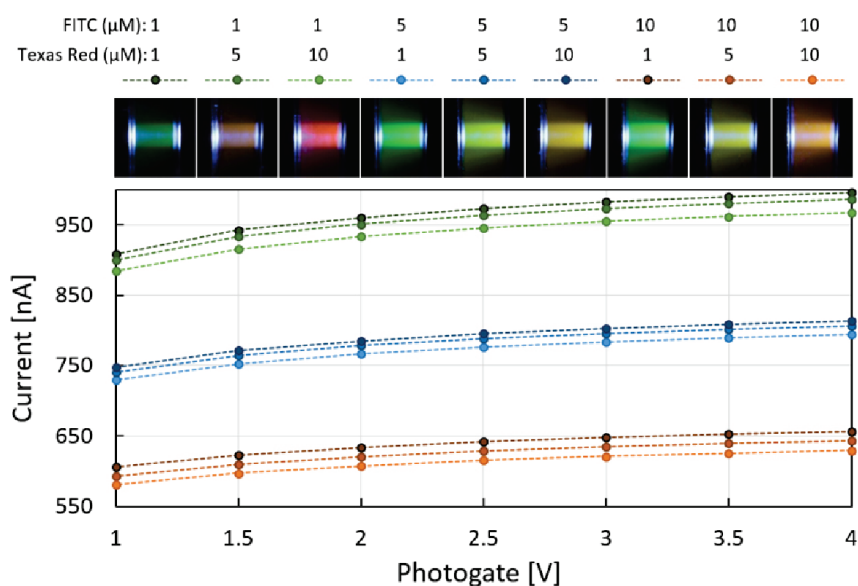


図 4.11 混合溶液によるフィルタフリー蛍光センサの出力電流

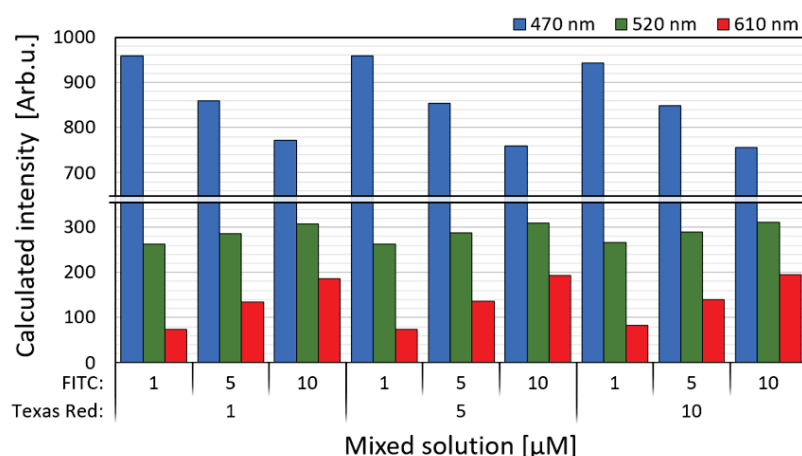


図 4.12 3波長測定結果

図4.12に式(4.8)に代入して計算した光の強度を示す。FITC濃度が増加すると、470 nmでの強度は減少し、520、610 nmでの強度は増加した。ほとんどの励起光はFITCによって吸収され、520、610 nmの光強度は470 nmの光強度よりも変化が小さくなる。これは、放出された蛍光はセンサに直接入射する励起光の強度に比べて非常に弱く、スペクトルを同時に測定する能力には限界があるためである。さらに、FITCから放出された蛍光は、比較的広い半値幅(FWHM)パラメータを有し、これは610 nmの波長と重複し、正確な強度を計算することを困難になる。したがって、半値幅の決定に基づいて光強度の計算に対する検討する必要がある。FITCの濃度が10 μMである場合、620 nmでの光強度は、Texas Redの濃度につれて増加した。この結果から、提案されたパラメータを適用して3つの波長を分離し、同時検出に成功した[8,9]。

4.3 結言

本章では、生化学分野などで広く使われている蛍光試薬を用いて、フィルタフリー蛍光センサの性能解析を行った。蛍光試薬によって放出する弱い蛍光の強度を測るためパラメータ法を提案し、広い半値幅を持つ励起光と蛍光の影響を最小化した。FITCとTexas Redによって放射する励起光と蛍光の成分を分離して同時に光の強度を測定し、サブマイクロモルの濃度まで検出することを確認した。また、FITCとTexas Redの混合溶液から放出する3波長の検出に成功した。この結果から、光学フィルタを使用せずにフィルタフリー蛍光センサを用いて、FRET分析などに応用が可能であると考えられる。

参考文献

- [1] H. Maeda, N. Ishida, H. Kawauchi, K. Tsujimura, Reaction of fluorescein-isothiocyanate with proteins and amino acids. I. Covalent and non-covalent binding of fluorescein-isothiocyanate and fluorescein to proteins, *J. Biochem.* 65 (1969) 777–783.
- [2] J. Casanovas, D. Jacquemin, E. A. Perpète, C. Alemán, Fluorescein isothiocyanate: Molecular characterization by theoretical calculations, *Chem. Phys.* 354 (2008) 155–161.
- [3] C. Lefevre, H. C. Kang, R. P. Haugland, N. Malekzadeh, S. Arttamangkul, R. P. Haugland, Texas Red-X and rhodamine Red-X, new derivatives of sulforhodamine 101 and lissamine rhodamine B with improved labeling and fluorescence properties, *Bioconjug. Chem.* 7 (1996) 482–489.
- [4] E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin, FRET imaging, *Nat. Biotechnol.* 21 (2003) 1387–1395.
- [5] M. A. Rizzo, G. H. Springer, B. Granada, D. W. Piston, An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 445–449.
- [6] W. A. S. Wiemann, J. Stegemann, D. Grothues, A. Bosch, X. Estivill, C. Schwager, J. Zimmermann, H. Voss, Simultaneous On-Line DNA Sequencing on Both Strands with Two Fluorescent Dyes, *Analytical biochemistry* (1994) 117–121.
- [7] R. B. Sekar, A. Periasamy, Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of cell biology*, 160 (2003) 629-633.
- [8] Y. J. Choi, K. Takahashi, F. Dasai, N. Misawa, Y. Kimura, T. Iwata, K. Sawada, Fluorescence detection of submicromolar concentration using a filter-free fluorescence sensor, *BioMedical Circuits and Systems Conference (BioCAS 2016)* 459-462, Shanghai, China, Oct (2016).
- [9] Y. J. Choi, K. Takahashi, F. Dasai, N. Misawa, T. Iwata, K. Sawada, Multi-wavelength fluorescence detection of submicromolar concentrations using a filter-free fluorescence sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2017).
- [10] Y. Sunaga, H. Yamaura, M. Haruta, T. Yamaguchi, M. Motoyama, Y. Ohta, H. Takehara, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, Y. Yoshimura, J. Ohta, Implantable imaging device for brain functional imaging system using flavoprotein fluorescence, *Jpn. J. Appl. Phys.* 55 (2016) 03DF02.
- [11] T. Kamei, K. Sumitomo, S. Ito, R. Takigawa, N. Tsujimura, H. Kato, T. Kobayashi and R. Maeda, Heterogeneously integrated laser-induced fluorescence detection devices: Integration of an excitation source, *Jpn. J. Appl. Phys.* 53(2014) 06JL02.

第5章 細胞の測定

5.1 緒言

第5章は、フィルタフリー蛍光センサを用いて蛍光染色した細胞の測定結果を述べる。光の波長に対するセンサの光電流からパラメータ法を用いて、ラベリングされた細胞から発生する励起光(470 nm)と蛍光(535 nm)を分離し、光強度を同時に測定する。同じ細胞に対する蛍光顕微鏡から観測した蛍光強度値をフィルタフリー蛍光センサの計算結果を比較することでセンサの有用性を検討する。そして、生物化学分野での2次元蛍光イメージ取得を目指し、フィルタフリー蛍光イメージングセンサについて述べる。そして、小型化された蛍光検出システムを製作するため、流路素子を作製し、センサと一体化して蛍光試薬及びビーズに対する評価を行う。

5.2 細胞測定

5.2.1 分析細胞

神経系は、ニューロンとグリア細胞の2種類の細胞から構成されている[1]。神経膠細胞の中で最も豊富なアストロサイト(Astrocyte)は、多くの神経伝達物質受容体及び輸送体を発現し神経細胞の機能を助ける作用をする[2]。また、脳の発生過程、正常な脳活動を維持、神経細胞のシナプス形成、シナプス数字調整などの機能が知られ、多くの注目を集めている。中枢神経系に存在するグリア細胞の一つであるアストロサイトを観察するため、野生型マウスの大脳皮質より培養したアストロサイトを用いて、特定の細胞集団を蛍光ラベルした。

図5.1(a)は干渉顕微鏡での画像を示しており、細胞の形を確認できる。しかし、細胞膜や核などの情報を得るのが困難になる。そこで、図5.1(b)-(d)はCalcein-AM、FM1-43、GFAPによって、ラベリングされたアストロサイトを示す。このように蛍光プローブを用いて、必要な情報を得ることができる。特にCalcein-AMは、蛍光顕微鏡での観察やMicrofluidicsなど、広く使用されている緑色蛍光細胞マーカーであり、強い黄緑色の蛍光(λ_{ex} :490 nm、 λ_{em} :515 nm)を発現する[3,4]。そこで、Calcein-AMでラベリングされたアストロサイトを分析し、既存の蛍光顕微鏡との性能を分析する。

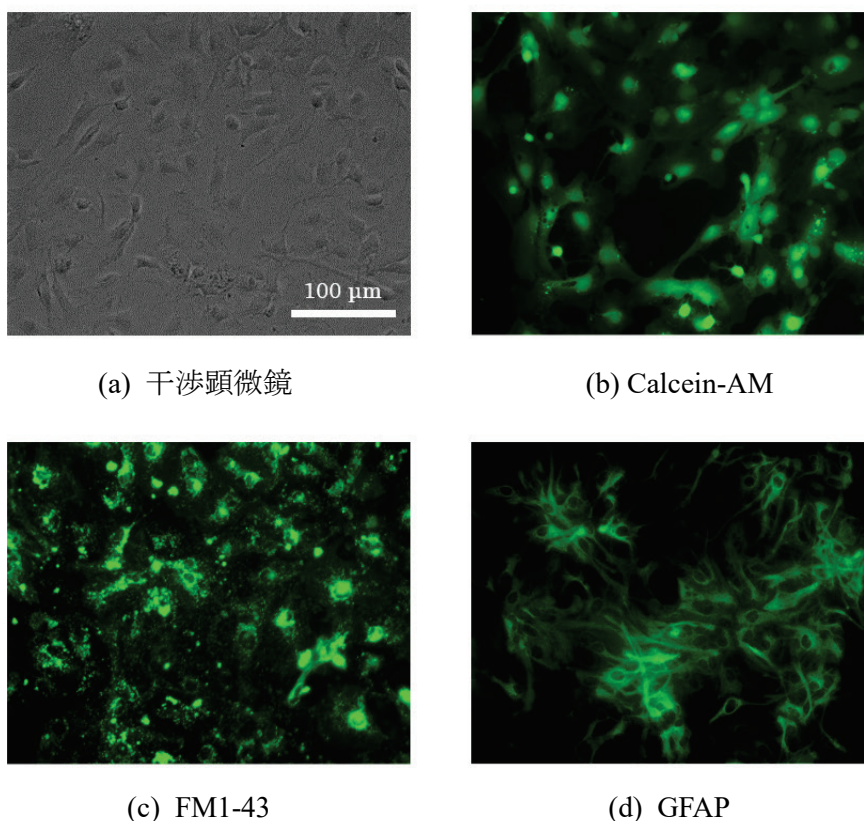


図 5.1 ラベリングされたアストロサイト

5.2.2 細胞の測定システム

図5.2は、蛍光顕微鏡及びフィルタフリー蛍光センサを用いて、ラベリングされた細胞の測定システムを示す。水銀光源は励起フィルタ(λ :490 nm、半値幅:20 nm)、対物レンズ(x20)を通過し、直径は $\varnothing 200 \mu\text{m}$ 、強度は $7 \text{ mW}/\text{cm}^2$ で細胞が固定されたカバーガラスに照射される。カバーガラス、センシングエリア、及び光源は、3軸電動ステージによって移動させることが可能である[6]。

図5.3(a)-(e)はCalcein-AMでラベリングされたアストロサイトの蛍光顕微鏡の画像を示し、図5.3(f)はフィルタフリー蛍光センサの検出領域を示す。カバーガラスで培養した細胞を3軸ステージに移動しながら測定する。細胞から放出された蛍光は蛍光フィルタ($>510 \text{ nm}$)を通して撮影する。同時に、カバーガラスの下部に位置したセンサから光成分を吸収し、光電流を測定した。図5.4に細胞の特定集団によるフィルタフリー蛍光センサの光電流を示す。n型Si基板は5 Vに固定してフォトゲートの電圧のみ1から5 Vまで印加し、出力電流を測定した。

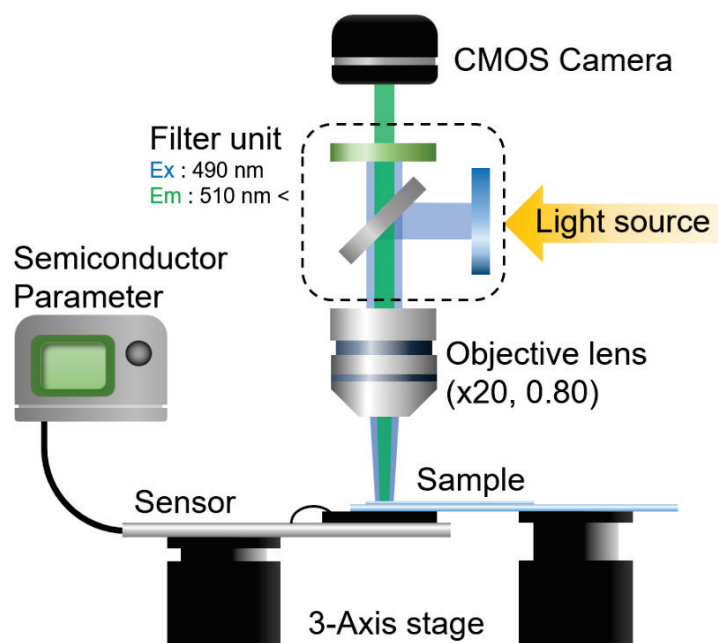


図 5.2 蛍光画像の撮影及びセンサの特性を評価する測定システム

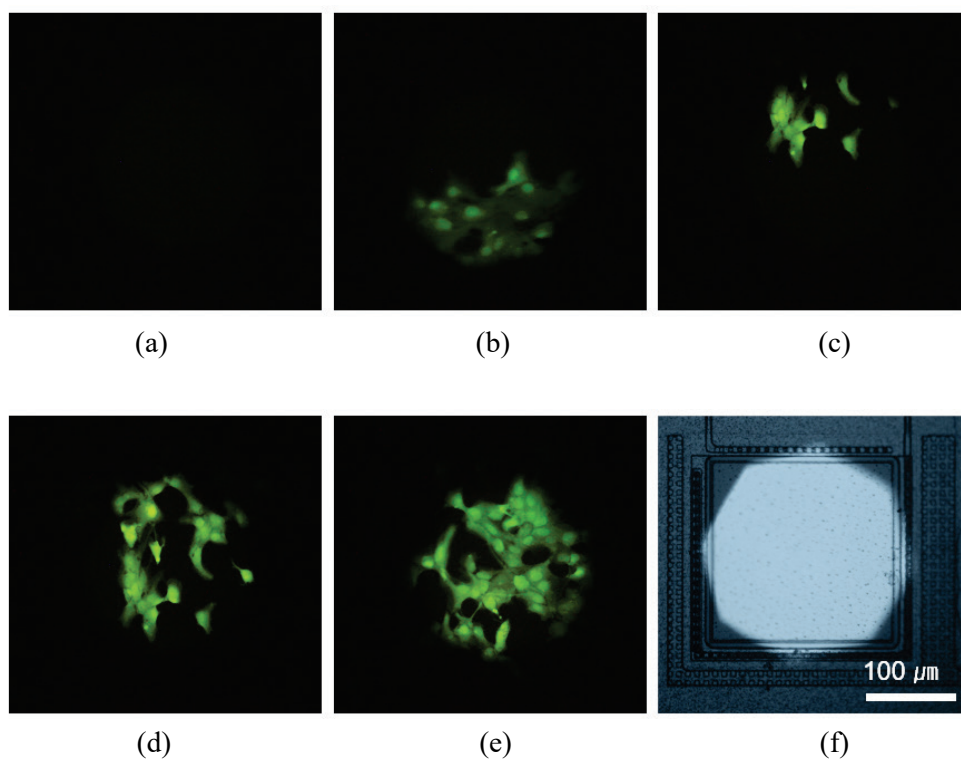


図 5.3 (a)-(e)ラベリングされたアストロサイト(Calcein-AM)の蛍光顕微鏡の画像(f)励起光が照射されたセンシングエリア

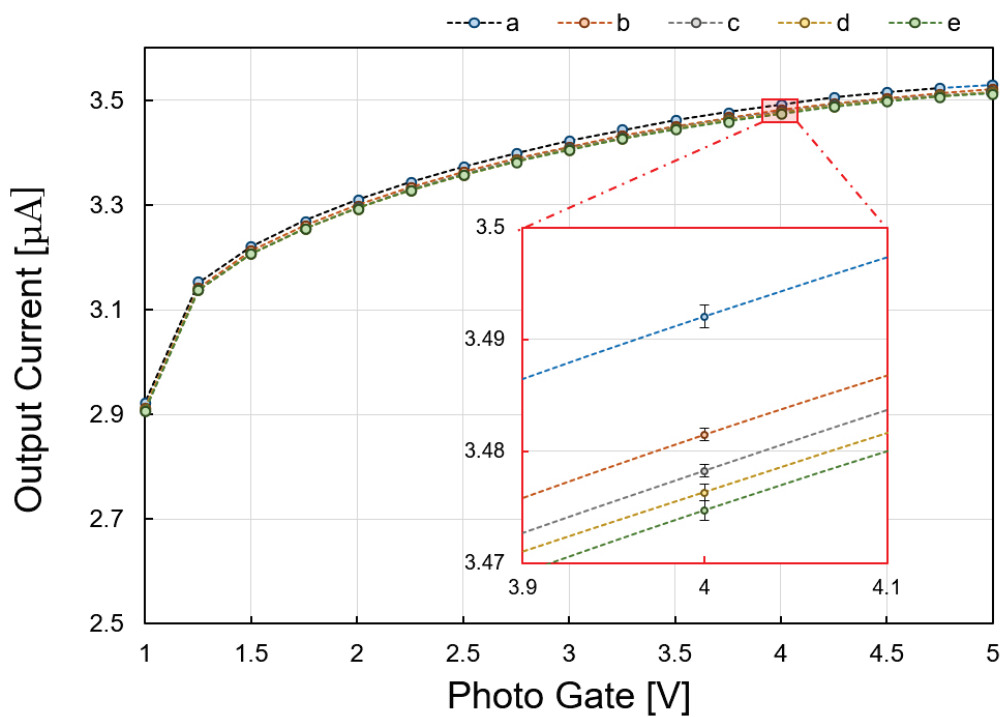


図 5.4 特定集団の細胞によるフィルタフリー蛍光センサの光電流

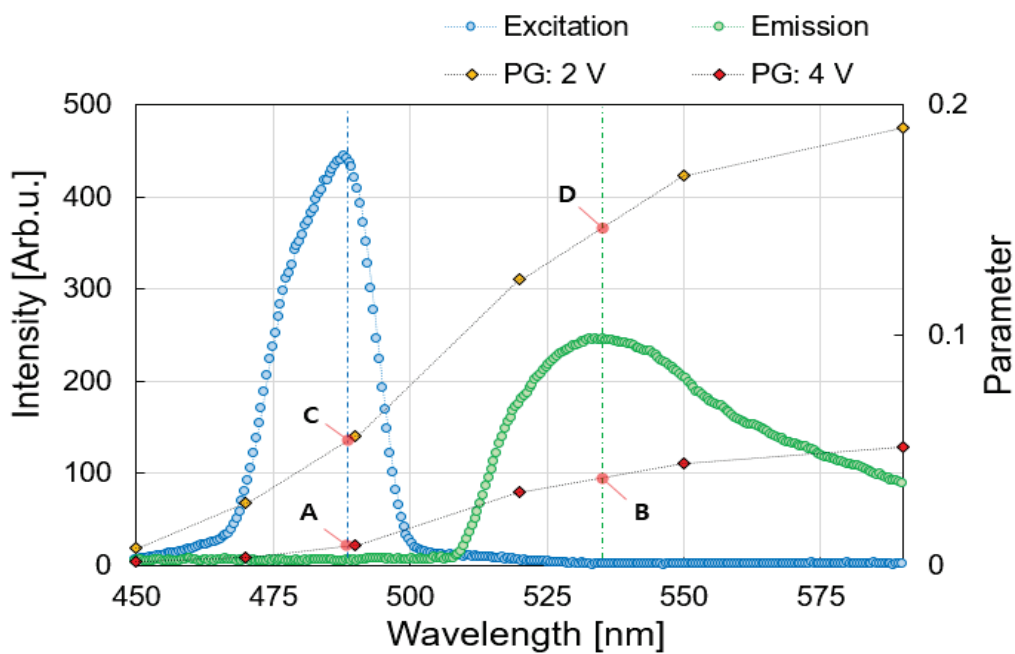
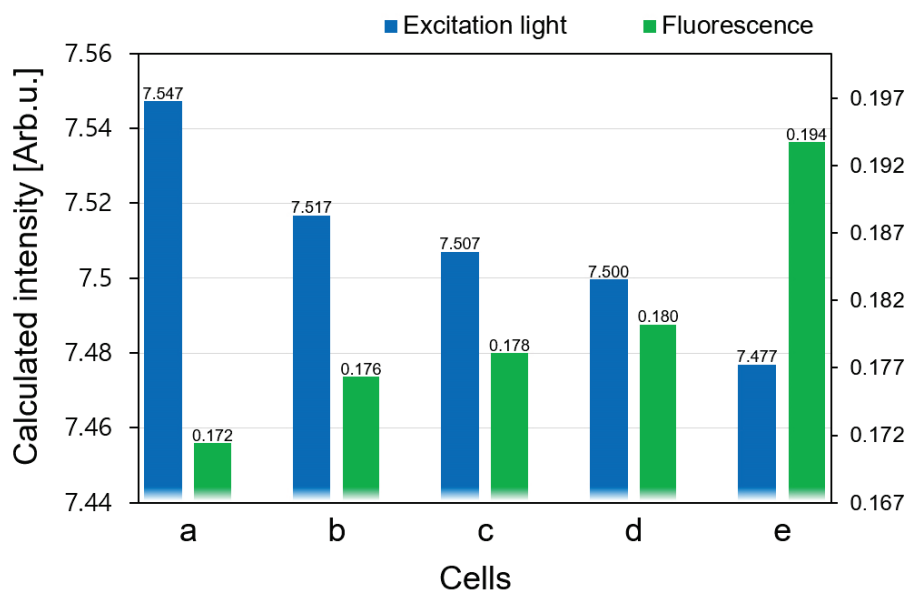


図 5.5 Calcein-AMのスペクトルとセンサのパラメータ (PG : フォトゲート)

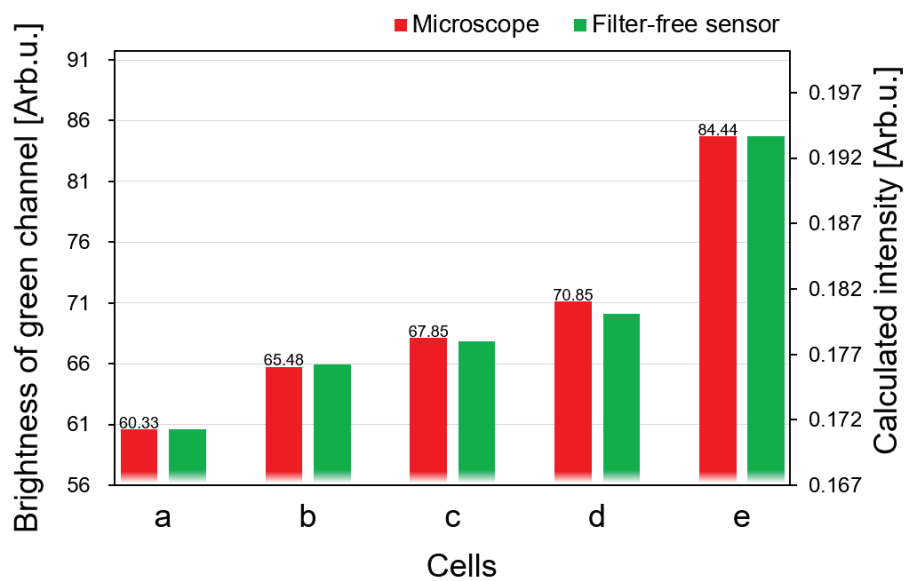
5.2.3 パラメータ及び結果分析

図5.5は、フィルタフリー蛍光センサのパラメータ及びCalcein-AMを用いたラベリングされた細胞のスペクトル曲線を示す。パラメータ値は、光の強度を光電流で割ったものである。Calcein-AMのパラメータ値A、B、C、Dは、励起光(490 nm)及び蛍光(535 nm)のピークに位置する、2、4 Vのフォトゲート電圧の接点によって表すことができる。

図5.6(a)は、特定細胞の集団に応じた励起光と蛍光の強度を示す。光の強度は、検出された光電流を式(4.7)に代入して得られる。細胞の数が増加すると、蛍光の強度が増加し、励起光の強度が減少することが確認できた。励起光は細胞によって吸収され、蛍光はJablonskiダイアグラムによって吸収された光から放出される[5]。つまり、細胞数が増加すると、励起光成分の強度が減少し、蛍光成分が増加した。細胞数に依存して、(a)から(e)までの励起光と蛍光の強度は、70と22 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ と変化した。この結果から、光学フィルタを使用せずに、フィルタフリー蛍光センサを用いて二つの光を同時に検出して分離することが可能であることがわかる。図5.6(b)にフィルタフリー蛍光センサから検出した蛍光の強度及び蛍光顕微鏡から検出した画像データの比較を示す。蛍光顕微鏡の画像データは、図5.3(a)-(e)に示す画像の緑色チャネルの輝度値を抽出した。測定したデータは、(a)が最小値、(e)が最大値に基づいて正規化した。ラベリングされた細胞からの蛍光強度は既存の蛍光顕微鏡の測定結果に対応し、4%以内範囲の誤差で計測できた。従来の蛍光顕微鏡とほぼ一致する結果から定量評価などに応用できると考えられる[6]。



(a)



(b)

図 5.6 フィルタフリー蛍光センサを用いた (a) 励起光と蛍光の計算強度 (b) 蛍光画像との測定値の比較。

5.3 フィルタフリー蛍光センサの応用

5.3.1 フィルタフリー蛍光イメージセンサ

蛍光イメージング技術は生体機能の解明のため、生化学分野などで広く使用されている。細胞等の観察のために2次元での蛍光イメージの取得を目指し、フィルタフリー蛍光イメージセンサの開発を行った[7]。生物観察をする前に、事前の検討で量子ドットを塗布し、蛍光顕微鏡と開発した蛍光イメージセンサの画像を比較して、性能を分析する。イメージセンサは $2.0\ \mu\text{m}$ CMOS、1-Poly、2-メタルプロセスを用いて 32×32 のピクセルで作製した。図5.7に1画素のレイアウト及び顕微鏡画像を示す。検出領域の面積は $246.4\ \mu\text{m}^2$ であり、検出領域の外部はアルミで遮光されている。検出領域のポテンシャルは上側で配線された V_{pg} によって制御する。

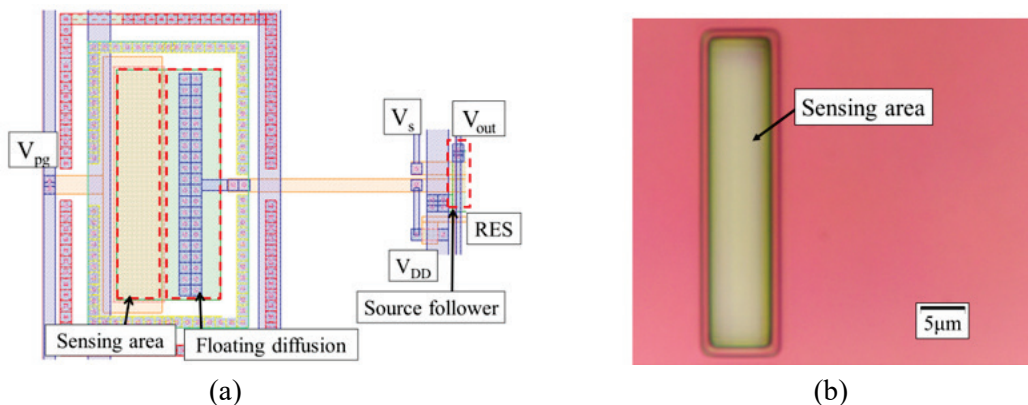


図 5.7 開発したイメージセンサの (a) レイアウト (b) 検出領域の画像

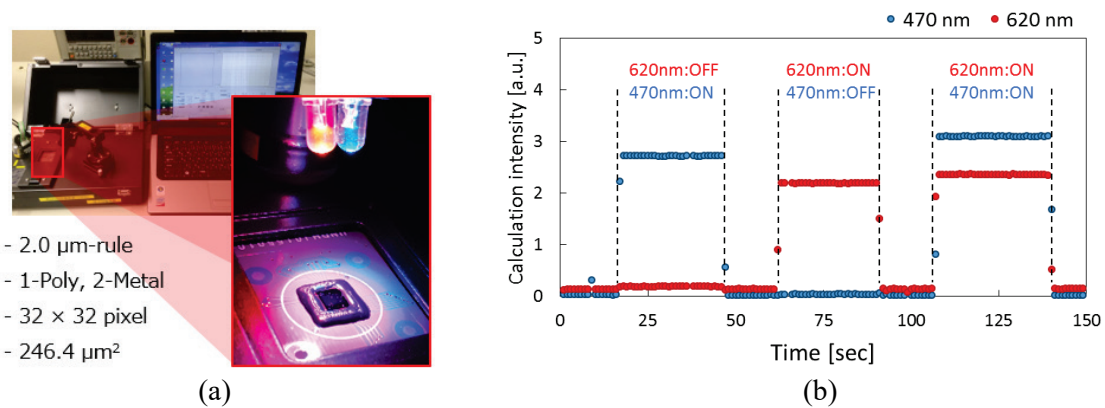


図 5.8 (a) フィルタフリー蛍光イメージシステム (b) 2波長分離結果

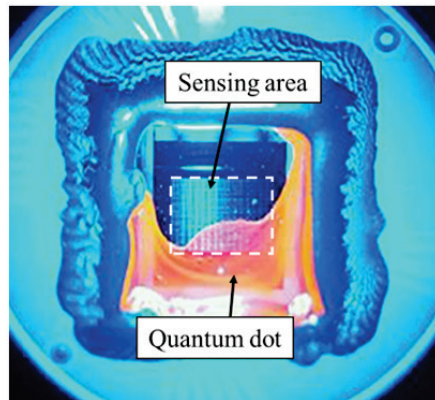


図 5.9 量子ドットを塗布したセンサ

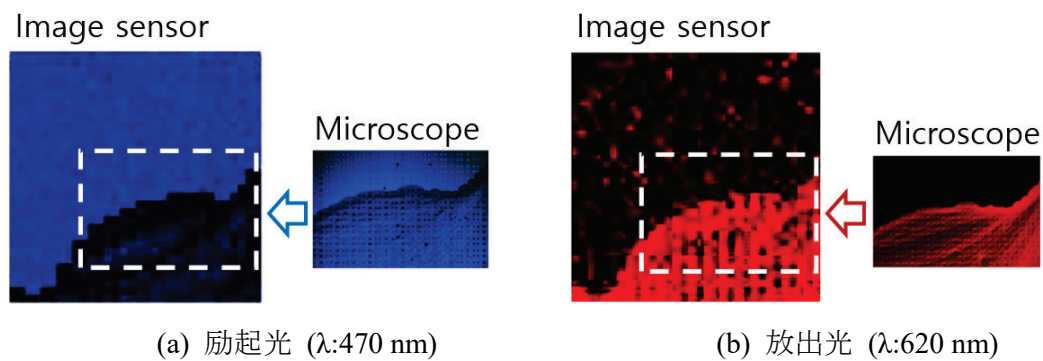


図 5.10 2次元画像と蛍光顕微鏡の画像

作製したイメージセンサの2波長分離を評価するためにLED光を用いて評価を行い、図5.8(a)に測定システムを示す。各LED(λ :470、620 nm)をONとOFFで切り替え、本センサの全画素に照射し、2波長を分離して光強度を検出した。その結果を図5.8(b)に示しており、470 nmと620 nmの波長を分離して光強度の算出ができていたことを確認した。図5.9は作成したセンサに液状の量子ドット(QSR-620-50)を塗布し、励起光 (470 nm)を照射する際の画像である。塗布した量子ドットは470 nmの波長で励起され620 nmの波長の光を放射する。図5.10は量子ドットに励起光が照射する際に発光する光成分を蛍光イメージセンサによって映像化した画像の結果である。左がイメージ画像で右が蛍光顕微鏡の画像である。蛍光顕微鏡から撮った画像は光学フィルタを使用した。しかし、蛍光イメージセンサはフィルタを使用せずに二つの波長を分離して、470、620 nmの光源を同時に検出した。この結果により、アレイ化したフィルタフリー蛍光センサは励起光と蛍光を同時に検出する2次元のイメージングに成功し、生物分野などへの応用が可能であると考えている。

5.3.2 センサと流路素子の一体化

小型化された蛍光検出システムを製作するため、流路素子を作製しフィルタフリー蛍光センサと一体化した。SU-8を鋳型としてPDMS(Polydimethylsiloxane)製流路素子の製作をしており、図5.11に流路素子のプロセスを示す。厚膜ネガ型レジストSU-8フォトレジストを基板の上に塗布後、フォトリソグラフィにより流路部分になるパターンを形成する。次に形成したSU-8製の鋳型にPDMSを流し込み、65 °Cに加熱してPDMSを硬化する。そして、PDMSを鋳型から離型し、注入口と排出口を開口し、カバーガラスとPDMSを接着する。

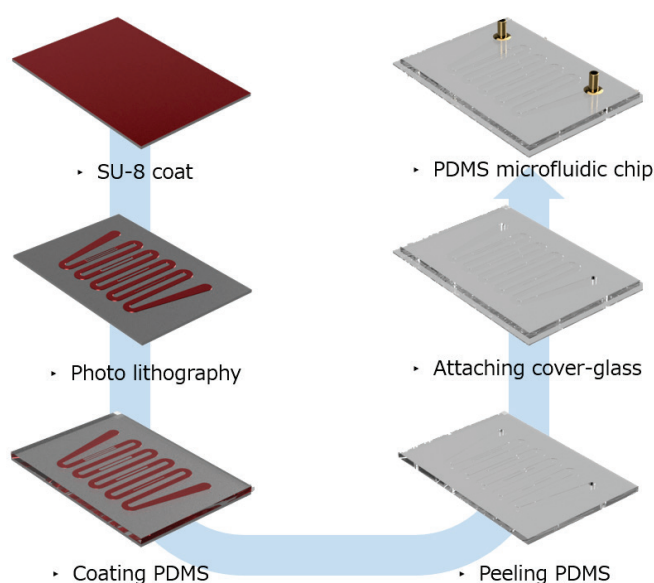
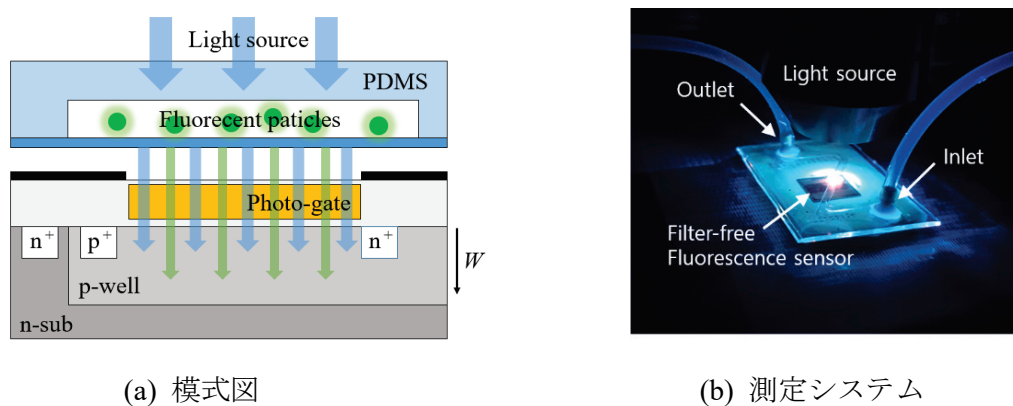


図 5.11 PDMS製流路素子の製作プロセス

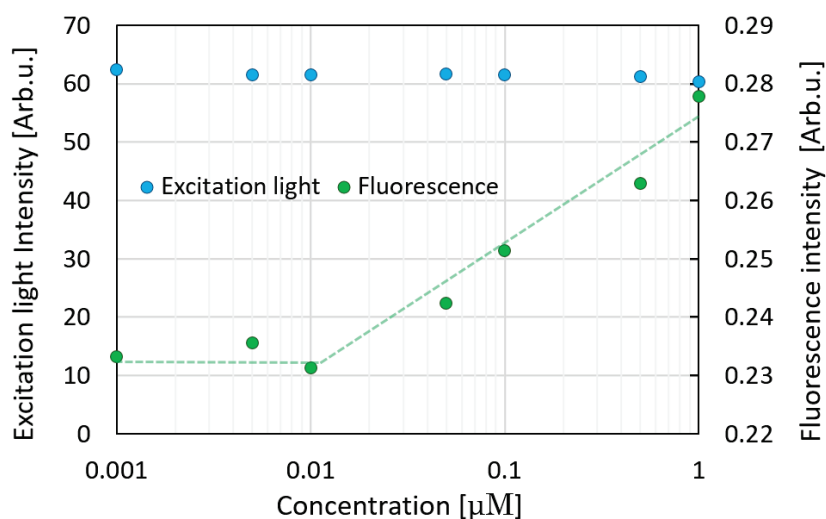


(a) 模式図

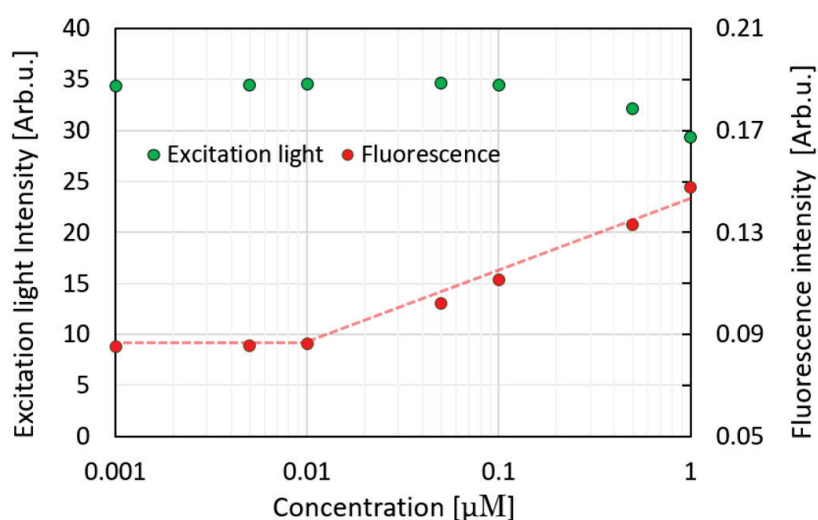
(b) 測定システム

図 5.12 フィルタフリー蛍光検出システム

図5.12にフィルタフリー蛍光分析システムの模式図及び測定画像を示す。フィルタフリー蛍光センサは、光の波長によって変化するSiの吸収係数を用いて光強度を測定しており、2つ以上の波長を分離して同時に検出することが可能である。そこで、一体化したシステムを用いて、少量のFITC、Texas Red試薬の励起光と蛍光を検出した。流路素子に試薬を注入した際、濃度に対する光強度の計算結果を図5.13に示す。フォトゲート電圧は第4章の図4.9と同じ条件で行い、520 nmの波長を0.01 μM まで検出することができた。この結果は、第4章に言及した結果とほぼ一致しており、流路素子と一体化することで、以前の試薬容量(3 mL)より少量(3 μL)で同じ結果を得られた。

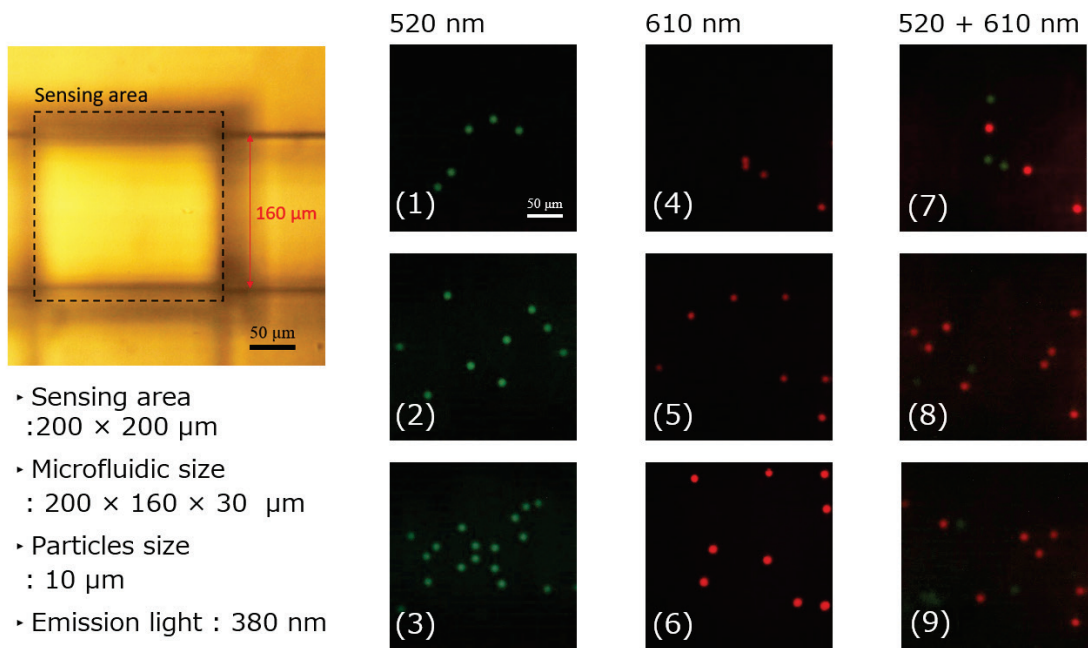


(a) FITC



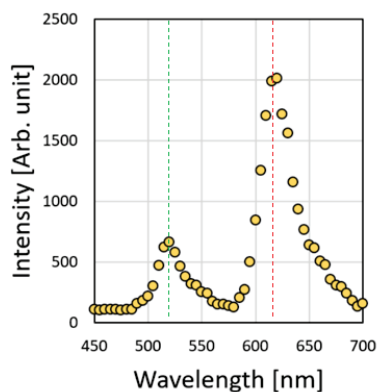
(b) Texas Red

図 5.13 励起光と蛍光の強度 (流路素子)

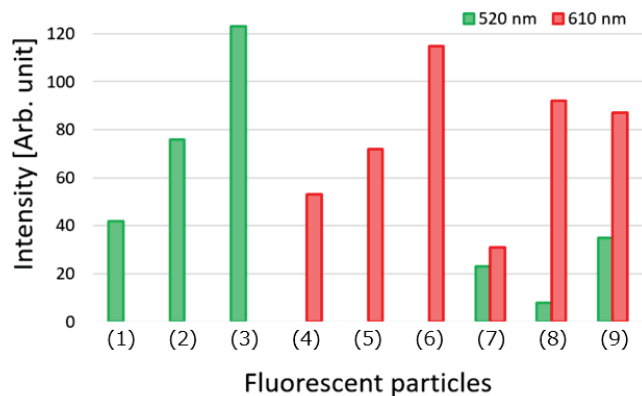


(a) センシングエリア

(b) 流路素子に流れている蛍光ビーズ



(c) 分光特性(図5.12(b)(9))



(d) 計算された蛍光の強度

図 5.14 蛍光ビーズの検出

図5.14(a)は流路素子と一体化されたフィルタフリー蛍光センサの画像を示しており、センシングエリアのサイズは $200 \times 160 \times 30 \mu\text{m}$ である。図5.14(b)は流路素子に励起光($\lambda:380 \text{ nm}$)を照射した場合、流れている蛍光ビーズの画像を示している。蛍光ビーズはThermo Fisher社のCDG1000($\lambda:508 \text{ nm}$)と血流量測定に使用されているF8834($\lambda:605 \text{ nm}$)を用いて検出し、直径は $10 \mu\text{m}$ である[8,9]。図5.14(b)の(1)~(3)はCDG1000、(4)~(6)はF8834、(7)~(9)はCDG1000とF8834を混合したビーズの画像であり、フィルタフリー蛍光センサと同時に計算された蛍光の強度を図5.14(d)に示した。照射される

励起光(λ :380 nm)はフォトゲートにほとんど吸収され、出力された光電流は各蛍光ビーズからの蛍光で考えられる。蛍光ビーズの分布による蛍光強度と混合されたビーズについて蛍光成分の分離が可能であることが示された。図5.14(c)は図5.14(b)(9)の画像と同時に検出された分光特性を示しており、計算された結果(図5.14(d)(9))と近い値を持つことが確認された。その結果から一体化したフィルタフリー蛍光センサで、POCTなどに応用可能な小型検出装置の実現が可能であると考えられる[10]。

5.4 結言

本章では、フィルタフリー蛍光センサを用いた細胞の測定法及び小型化された蛍光検出システムを提案した。中枢神経系に存在するグリア細胞の一つであるアストロサイを野生型マウスの大脳皮質より培養したアストロサイを用いて、特定の細胞集団を蛍光ラベルした。アストロサイトのプローブとして使用したCalcein-AMは、蛍光顕微鏡での観察やMicrofluidicなど広い分野で使われている。測定した結果を検証するため、同じ細胞について蛍光顕微鏡とフィルタフリー蛍光センサの同時測定システムを構築した。センサからの光電流を用いて、波長によるパラメータを得ることができた。また、Calcein-AMのスペクトルを検出し、細胞から放出する励起光と蛍光の強度を計算した。フィルタフリー蛍光センサからの結果を検証するため、蛍光顕微鏡から得られた画像の緑チャンネルの輝度を検出した。フィルタフリー蛍光センサから計算した蛍光の強度は、蛍光顕微鏡から検出した蛍光の強度と4%以内の誤差が発生した。そこで、細胞イメージングの2次元蛍光画像の取得するため、 32×32 画素のフィルタフリー蛍光イメージセンサを開発した。センシングエリアに量子ドットを塗布した際の蛍光イメージングした結果、蛍光顕微鏡で撮影した画像とほぼ一致することを確認した。そして、小型化された蛍光検出システムを製作するため、流路素子を作製しフィルタフリー蛍光センサに適用して評価を行っており、FITC試薬に対して以前(ディスプレイ)より少量の試薬3 μL でほぼ一致する結果を得られた。そして、蛍光ビーズの分布による蛍光強度と混合されたビーズについて蛍光成分の分離が可能であることが示された。これらの結果を踏まえ、今後の研究ではフィルタフリー蛍光センサを用いて細胞等の生体観察に応用することが期待される。

参考文献

- [1] P. G. Haydon, G. Carmignoto, Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling, *Physiol. Rev.* 86 (2006) 1009-1031.
- [2] Y. Shinozaki, M. Youichi, K. Iwatsuki, Y. Moriyama, Y. Gachet, S. Koizumi, Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission, *Sci. Rep.* 4 (2014) 1.
- [3] S. A. Weston, C. R. Parish, Calcein: a novel marker for lymphocytes which enter lymph nodes, *Cytometry* 13 (1992) 739-749.
- [4] M. A. Green, M. J. Keevers, Optical properties of intrinsic silicon at 300 K, *Prog. Photovoltaics Res. Appl.* 3, 189 (2006) 189-192.
- [5] A. Jaboski, *Nature* 131 (1933) 839.
- [6] Y. J. Choi, Y. Shinozaki, K. Takahashi, T. Iwata, S. Koizumi, and K. Sawada, Cell analysis system using a filter-free fluorescence sensor, *Transducers2017*, Kaohsiung, Taiwan, June (2017).
- [7] K. Tanaka, Y. Kimura, Y.J. Choi, T. Iwata, K. Takahashi, and K. Sawada, Realization of filter-free fluorescence image sensor, *Transducers2017*, Kaohsiung, Taiwan, June (2017).
- [8] R. W. Glenny, S. Bernard, M. Brinkley, Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion, *J. Appl Physiol* 74 (1993) 2585-2597.
- [9] M. F. V. Oosterhout, H. M. Willigers, R. S. Reneman, F. W. Prinzen, Fluorescent microspheres to measure organ perfusion: validation of a simplified sample processing technique, *International Microprocesses and Nano-technology Conference (MNC 2017)*, *Am. J. Physiol* 269 (1995) 725-733.
- [10] Y. J. Choi, K. Takahashi, T. Iwata and K. Sawada, Filter-free fluorescence analysis system integrated with microfluidics device, *International Microprocesses and Nano-technology Conference (MNC 2017)*, Jeju, Korea, Nov (2017) 8P-7-97L.

第6章 総括

本研究では、フィルタフリー蛍光検出センサの性能向上に目的として研究を行った。

第1章では、蛍光センサのシステム及びオンチップ蛍光センサの最新動向について説明した。既存の大規模な蛍光分析装置について問題を提示し、その場診断のために小型化されたオンチップセンサの必要性を説明し、本研究の目的を述べた。

第2章では、フィルタフリー蛍光センサの構造及び動作原理について述べた。そしてSPECTRAを用いて、センサのポテンシャル分布を解析し、センサの製作プロセスについて説明した。

第3章では、フィルタフリー蛍光センサの分離能力を向上するために、Poly-Si表面の平坦化による前方散乱の改良について述べた。フィルタフリー蛍光センサの表面平坦化によるセンサの性能を確認した。検出領域の干渉評価による反射率を求め、波長分離能力の標準化を行った。表面平坦化により、波長分離能力は既存の800:1から1250:1まで約1.5倍の性能が向上された。

第4章では、フィルタフリー蛍光センサを用いた蛍光試薬の検出法について述べた。波長分離能力を算出する際にSiの吸収係数 α 及び波長 λ を代入すると蛍光試薬から放出する蛍光の半値幅について大きな誤差が発生する。そこで、波長に対する光電流を基にしてパラメータ法を提案し、蛍光試薬をサブマイクロモラまで定量化した。また、混合蛍光試薬から放出する3波長の検出に成功した。

第5章では、その場診断などを目的として、細胞の検出法及びフィルタフリー蛍光センサの応用について述べた。蛍光ラベリングされた細胞から放射する微細な光成分を検出するため、3章で提示した表面の平坦化及びパラメータ法を基にして、ラベリングされた細胞を測定して、蛍光顕微鏡と近い値を得られた。また、32×32のフィルタフリー蛍光イメージセンサを開発し、量子ドットからの光成分を分離してイメージングした。そして、蛍光測定系の小型化を目的として流路素子とフィルタフリー蛍光センサを一体化し、以前より少量の試薬及び蛍光ビーズを検出することが可能になった。

本研究ではフィルタフリー蛍光センサの性能向上のため、表面の平坦化、パラメータ測定法を提案した。生化学分野などで適用するため、蛍光試薬、標識細胞などを測定し既存の蛍光顕微鏡との近い値を得られた。これらの結果を踏まえ、今後の研究ではフィルタフリー蛍光センサを用いて細胞等の生体観察に応用することが期待される。

謝辞

本研究の機会を与えて頂くとともに、研究の遂行ならびに本論文の執筆にあたって終始適切なお指導と、御助言を賜りました豊橋技術科学大学電気・電子情報工学系 教授 澤田和明先生に謹んで感謝の意と敬意を表します。

本研究を遂行するにあたり、副査として御指導、御助言を賜りました豊橋技術科学大学電気・電子情報工学系 教授 若原昭浩先生、准教授 岡田浩先生にこの場を借りて心から感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、様々な御指導、御助言を賜りました豊橋技術科学大学電気・電子情報工学系 講師 高橋一浩先生、助教 岩田達哉先生に心から感謝の意を表します。

豊橋技術科学大学特別顧問 特別顧問・名誉教授 石田誠先生、リーディング大学院教育推進機構 特任教授 石井仁先生、豊橋技術科学大学電気・電子情報工学系 准教授 河野剛士先生、助教 赤井大輔先生、助教 秋田一平先生、特任助教 丸山智史先生、助手 李宥奈先生、豊橋技術科学大学 研究員 高瀬博行氏、木村安行氏、堀尾智子氏、技術専門職員飛沢健氏に研究遂行にあたり日頃より有益なお討論ご助言を頂きました。この場を借りて心から感謝の意を表します。

フィルタフリー蛍光検出について詳細なお指導と多大なる御協力を頂きました、現トヨタ自動車株式会社 松田倫明氏、現ソニー株式会社 森脇優氏、大石泰三氏、現オリンパス株式会社 西村祐典氏にこの場を借りて深く感謝の意を表します。

本研究において多くの有益な助言、御討論と大なる本研究において多くの有益な助言、御討論と大なる御協力を頂きました豊橋技術科学大学 博士前期課程2年大西脩平氏、田中清嗣氏、豊橋技術科学大学工学部4年 手島拓哉氏、田中佐和子氏の皆様に深く感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、有益な御討論ならびに多大なる御協力を頂きました現豊橋技術科学大学大学 秘書 豊田留美子氏に心より感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり有益な助言、並び御協力頂い 集積化バイオセンサ・MEMSグループの皆様をはじめとするデバイス工学分野、ならびに卒業された諸先輩方に深く感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、有益な御討論ならびに御協力を頂きました韓国安東大学 教授 李榮泰先生に感謝の意を致します。

最後に、在学にあたり、深い理解と経済的・精神的に支えて頂いた両親に心より感謝致します。

2017 年 9 月
崔 容俊 (Choi Yong Joon)

本研究に関する発表論文と学会発表等

国際論文

1. Y. J. Choi, K. Takahashi, M. Matsuda, T. Hizawa, Y. Moriwaki, F. Dasai, Y. Kimura, I. Akita, T. Iwata, M. Ishida, and K. Sawada, “Filter-less fluorescence sensor with high separation ability achieved by the suppression of forward-scattered light in silicon”, Japanese Journal of Applied Physics, vol. 55, 04EM10, 2016.
2. Y. J. Choi, K. Takahashi, N. Misawa, T. Hizawa, T. Iwata, and K. Sawada, “Multi-wavelength fluorescence detection of submicromolar concentrations using a filter-free fluorescence sensor”, Sensors and Actuators B: Chemical, vol. 256, 38-47, 2018.
3. K. Tanaka, Y. J. Choi, Y. Moriwaki, T. Hizawa, T. Iwata, F. Dasai, Y. Kimura, K. Takahashi and K. Sawada, “Improvements of low-detection-limit filter-free fluorescence sensor developed by charge accumulation operation”, Japanese Journal of Applied Physics, vol. 56, 04CM09, 2016.

国際会議

1. Y. J. Choi, K. Takahashi, M. Matsuda, T. Hizawa, Y. Moriwaki, F. Dasai, Y. Kimura, I. Akita, T. Iwata, M. Ishida, and K. Sawada, “Improvement of filter-less fluorescence sensor by the surface planarization of polysilicon photogate”, Solid State Devices and Materials (SSDM 2015), pp.398-399, Hokkaido, Japan, Sep. 2015.
2. Y. J. Choi, K. Takahashi, N. Misawa, M. Matsuda, T. Hizawa, Y. Moriwaki, F. Dasai, Y. Kimura, T. Iwata, M. Ishida, and K. Sawada, “Performance analysis of Filter-free fluorescence sensor using FITC dye”, Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology (APCOT 2016), pp.57-58, Kanazawa, Japan, Jun. 2016.
3. Y. J. Choi, K. Takahashi, F. Dasai, N. Misawa, Y. Kimura, T. Iwata, K. Sawada, “Fluorescence detection of submicromolar concentration using a filter-free fluorescence sensor”, BioMedical Circuits and Systems Conference (BioCAS 2016), pp.459-462, Shanghai, China, Oct. 2016.
4. Y. J. Choi, Y. Shinozaki, K. Takahashi, T. Iwata, S. Koizumi, and K. Sawada, “Cell analysis system using a filter-free fluorescence sensor”, Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS 2017), pp.198-201, Kaohsiung, Taiwan, Jun. 2017.
5. Y. J. Choi, K. Takahashi, T. Iwata and K. Sawada, “Filter-free fluorescence analysis system integrated with microfluidics device”, International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2017), 8P-7-97L, Jeju, Korea, Nov. 2017.
6. K. Tanaka, Y. Kimura, Y. J. Choi, T. Iwata, K. Takahashi, K. Sawada, “Realization of filter-free fluorescence image sensor”, Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS 2017), pp.1616-1619, Kaohsiung, Taiwan, Jun. 2017.

7. S. Onishi, Y. J. Choi, M. Ishida, K. Sawada, H. Ishii, K. Machida, K. Masu, Y. Nikaido, M. Saito, and S. Yoshida, “Detection of Bacterial Fluorescence by the Combination of MEMS Microfluidic Chip and Si Photodetector toward On-chip Biological Sensing”, The Electrochemical Society (ECS 2017), pp.1149, Washington, USA, Oct. 2017.

国内学会

1. 崔容俊、高橋 一浩、松田 倫明、飛沢 健、森脇 優、太齋 文博、木村 安行、秋田 一平、岩田 達哉、石田 誠、澤田 和明、“ポリシリコンフォトゲートの表面平坦化によるフィルタレス蛍光センサの高性能化”、第 63 回応用物理学春季技術学術講演会、20p-P12-6、東工大、2016.
2. 崔容俊、高橋 一浩、三澤 宣雄、飛沢 健、太齋 文博、木村 安行、岩田 達哉、澤田 和明、“フィルタフリー蛍光センサによる低濃度溶液を用いた励起光と蛍光の同時測定”、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、24pm3-C-3、平戸文化センター、2016.
3. 崔容俊、篠崎 陽一、高橋 一浩、岩田 達哉、小泉 修一、澤田 和明、“フィルタフ-蛍光センサを用いた標識細胞の蛍光検出”、第 64 回応用物理学学会春季学術講演会、16p-F205-13、パシフィコ横浜、2017.
4. 大西 脩平、崔容俊、石田 誠、澤田 和明、石井 仁、町田 克之、益 一哉、二階堂 靖彦、齋藤 光正、吉田 眞一、“ビーズを用いた PDMS 製細菌捕獲チップの検討V-フィルタフリー蛍光センサの適用”、第 64 回応用物理学学会春季学術講演会、15a-304-8、パシフィコ横浜、2017.
5. 大西 脩平、崔容俊、石田 誠、澤田 和明、石井 仁、町田 克之、益 一哉、二階堂 靖彦、齋藤 光正、吉田 眞一、“ビーズを用いた PDMS 製細菌捕獲チップの検討VI- レジオネラ蛍光の減衰過程の解析”、第 78 回応用物理学学会秋季学術講演会、8p-PA-19、福国際会議場、2017.

国内研究会

1. 崔容俊、高橋 一浩、松田 倫明、飛沢 健、森脇 優、太齋 文博、木村 安行、秋田 一平、岩田 達哉、石田 誠、澤田 和明、“ポリシリコン表面の平坦化によるフィルタフリー蛍光センサの波長分離能力向上”、バイオ・マイクロシステム研究会、BMS-16-004、東京大学生産技術研究所、2016.
2. 崔容俊、篠崎 陽一、高橋 一浩、田中 清嗣、木村 安行、岩田 達哉、小泉 修一、澤田 和明、“フィルタフリー蛍光センサによる細胞検出システム”、バイオ・マイクロシステム研究会、BMS-17-053、群馬県桐生市市民文化会館、2017.