

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24226010

研究課題名(和文)細胞機能解明のためのイオン・蛍光マルチモーダルイメージセンサシステム創製

研究課題名(英文) Invention of Ion-Fluorescence Multi-Modal Image Sensor System For Elucidation of Cell Functions

研究代表者

澤田 和明 (Sawada, Kazuaki)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40235461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 134,200,000円

研究成果の概要(和文)：同一画素で、生体関連物質・光・蛍光を同時に検出することが可能なマルチモーダルセンサをアレイ化し、細胞に存在するイオンチャネルの動き、働きを弁別できるマルチモーダルバイオイメージセンサを製作し、バイオ分野の応用の見通しがたった。蛍光検出部とイオン検出部が全く同一な45ミクロンピッチ64×64画素、およびエクステンデッドゲートタイプの4ミクロンピッチ128×128画素の2種類を実現し、異分野研究者が活用できるシステムの構築も行った。また蛍光染色した細胞の密度の同定が、蛍光顕微鏡で行ったものと4%以下の誤差で可能となった。

研究成果の概要(英文)：A multi-modal sensor which can detect simultaneously a neurotransmitter, light, and fluorescence on a same pixel was fabricated, and it was applied for bioscience fields. We have realized 45 micron pitch 64x64 pixels ion-fluorescence multimodal sensor which has a same sensor area for ion and fluorescence, and 4 micron pitch 128X128 pixels multimodal image sensor with extended gate structure. Multimodal fluorescence image sensor readout system was also realized to carried out interdisciplinary research with bio scientific researcher. A fluorescence of astrocytes labeled with Calcein-AM taken by the filter-free fluorescence sensor was good agreement with fluorescence intensity observed by conventional fluorescence microscopy.

研究分野：工学, 電気電子工学, 電子デバイス・電子機器

キーワード：集積化バイオセンサ イメージセンサ 蛍光 CMOS バイオセンサ

1. 研究開始当初の背景

異種機能集積により、これまで世の中に存在し得なかった新しい機能を持つ電子デバイスの実現が期待されている。研究提案者は、LSI 技術とバイオセンサ技術を融合させ、光学的なフィルタを必要としない、フィルタフリー蛍光センサならびに様々なイオンを非標識で2次元画像として取得できるイオンイメージセンサの開発を進めてきた。生化学者との共同研究を通して、イオンチャネルを介した細胞内外のイオンの流入・放出過程が観察可能なイメージセンサがミクロンピッチで実現できればこれまで不明であった細胞機能を明らかにできることに着目し本研究を提案するに至った。

2. 研究の目的

同一画素で、生体関連物質・光・蛍光を同時に検出することが可能なマルチモーダルセンサをサブミクロンピッチでアレイ化し、細胞に存在するイオンチャネルの動き、働きを弁別できるマルチモーダルバイオイメージセンサの製作と、従来の光学顕微鏡では不可能であったイオンチャネルを経由した細胞内外のイオンなどの動きをリアルタイムで可視化するデバイス・システムの実現を目的とした。

イオン画像・蛍光画像を同時に測定でき、解像度 $1\mu\text{m}$ 以下の高解像度マルチモーダルバイオイメージセンサの製作・検証に取り組んだ。このイメージセンサにマウスの海馬初代神経細胞や脳スライスを直接密着させ、細胞内のイオン情報を蛍光画像として検出し、イオンチャネルから放出されるイオン (Na^+ , K^+ 等) や生体関連物質 (アセチルコリン, グルタミン酸, ATP) を化学画像として観察するシステムを製作し、外的な刺激 (電圧や化学物質) による細胞内外のイオンの動きを可視化できるシステム構築を目的とした。

3. 研究の方法

本研究を遂行するにあたり、新規なデバイス開発とその応用研究に大別して進めた。新規な蛍光・イオンイメージセンサを実現するため3つの課題を解決しながら研究を行った。具体的には①微細特殊イオンイメージセンサプロセス構築, ②画素縮小のための構成検討, ③サブミクロンセンサのイオン感度確保を本学 LSI 製造設備と協力 LSI 製造企業を用いながら進めた。一方、細胞活動を取得するための応用研究として、①細胞外イオンと細胞内イオンを同時に検出するため従来の技術を利用した基礎検討, ②神経伝達物質検出の基盤技術確立に注力して行った。細胞・組織・生体の機能を低侵襲でリアルタイムに解析する研究については山梨大学医学部と生理学研究所, 電気化学を専門とする連携研究者の服部と連携して行った。

4. 研究成果

(1) イオンと蛍光を同時計測のためのアレイデバイス作製と実証

イオンと蛍光のリアルタイム画像化を可

能とするために、3種類のセンサを試作した。
①130 ミクロン画素ピッチのイオン・蛍光イメージセンサ

当初想定した測定原理に基づき原理検証のため、我々のグループで検討を進めてきた。イオンイメージセンサ技術ならびにフィルタレス蛍光センサ技術を一体化したフィルタレス蛍光・イオンイメージセンサの作製に成功し、基本的な原理の確認を行うことができた。製作は豊橋技術科学大学半導体製造設備で、チップのピクセルピッチは $130\mu\text{m}$, 32×32 画素である。実際に製作したチップと、水素イオン濃度ならびに2種類の波長の光のイメージングを独立に測定した結果を図 1, 2 に示す。この研究の過程で、p-well に流れる電流で p-well 電位が微妙に分布を持つことが原因でイメージのムラが生じ、その問題点を次の製作にフィードバックすることとした。本センサは、図 3 に示すようにセンサエリア内に、“電位の鞍”を設け、鞍より手前で吸収した光電流と鞍より奥で吸収した光電流成分を明確に分離するところが特徴である。p-well の電位が微妙に変化することで各画素の“電位の鞍”の位置が変化することが原因と考え、各画素に、p-well 電位固定のための端子を設ける改良を行った。

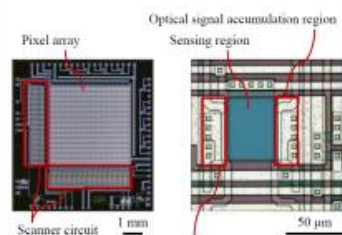


図 1: 130 μm ピッチイメージセンサ

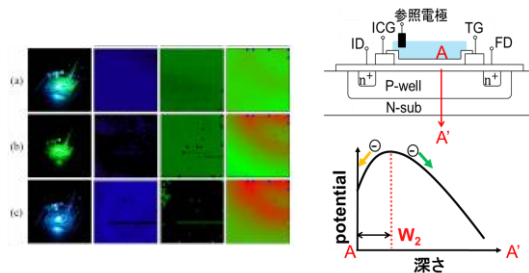


図 2: 模擬励起光・蛍光・イオン同時撮像例

図 3: 検出原理“電位の鞍”w より深い電子は排出される必要あり

② 改良型 37 ミクロンピッチ イオン・蛍光イメージセンサ

p-well 電位内において微妙な電位ムラ (シミュレーションでは $10\text{--}50\text{mV}$) のために、各センサ領域における電位の鞍の深さが変化することが原因で、均一な画像を取得することができなかった。また微細ピッチのイメージセンサを目指し、2 ミクロンイオンイメージセンサ特殊プロセスをベースに協力ファウンドリ工場にて製作を行った。37 μm ピッチ、 64×64 画素のチップ写真を図 4 に示す。イオンと光のイメージングを実現することはできたが、励起光と蛍光の分離には至らなかった。

た. その原因を, 解析したところ, 深さ方向のセンサエリアの濃度分布と画素構造に課題があることが判明した. 画素構造の問題点としてセンサエリアからフローティングデフュージョン (FD) 領域の間に存在する素子分離領域の奥深くから, 図 5 に示す様に“電位の鞍”より奥で発生した電子が FD 領域に混入することと, LSI ファンダリにおける CMOS 領域の p-well 濃度が通常より濃いことにより, “電位の鞍”の位置の変化が小さいことであった. そこで協力半導体工場での追加プロセス (2 重イオン注入) とレイアウトを変更し, 再試作を行った.

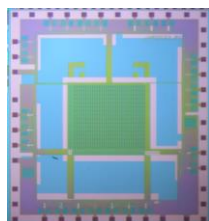


図 4: 37 μm ピッチ蛍光・イオンイメージセンサ

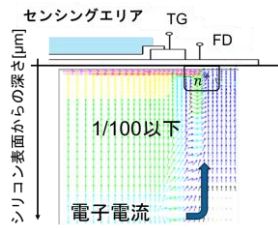


図 5: 微細化における分離能力低下の課題

図 6 に変更した 1 画素のレイアウト図, パッケージ写真, およびセンサの断面構造を示す. この改良により, 画素ピッチが 45 ミクロンと増大したが, 2 種類以上の pH と蛍光波長を分離して動画として画像化することに成功した. また, 本研究においてリアルタイムに可視化するための計測装置やアプリケーションの開発も行ったのでその計測システムの写真を図 7 に示す. 実際に生命化学の研究で活用されている蛍光ナノ粒子を用い, チップ上に塗布した画像と動画のスナップショットを図 8 に示す. 励起光として青色 LED (470nm) を用い, 量子ドットからは 620nm の蛍光を発する.

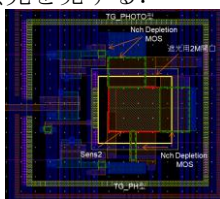


図 6a: 改良版蛍光・イオンイメージセンサ 1 画素



図 6b: 改良版イメージセンサパッケージ

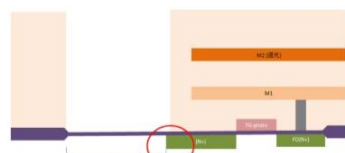


図 6c: 改良版イメージセンサ画素断面構造



図 7: 構築した蛍光・イオンイメージセンサシステム

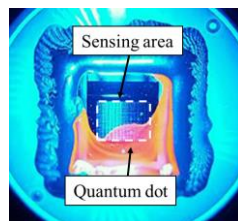


図 8a: センサチップ上に蛍光ナノ粒子を乗せた様子

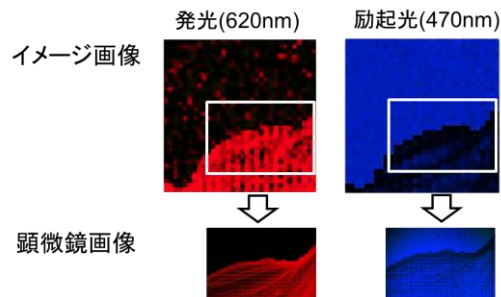


図 8b: 構築した蛍光・イオンイメージセンサシステムで取得した蛍光ナノ粒子からの蛍光. 蛍光顕微鏡画像と同様な画像が得られている

蛍光ナノ粒子が存在していない箇所では励起光のみが, 蛍光ナノ粒子が存在する領域は, 励起光情報に加えて 620nm の蛍光情報を動画として得ることができた. 通常の蛍光顕微鏡で取得した画像を合わせて示すが, 蛍光顕微鏡による光強度と試作を行ったチップと比較したところ定量的な評価も本イメージセンサで確認ができ, 同一のセンサでイオン情報と蛍光情報を画像化するチップの製作に成功した.

一方, 図 6C に示した様に, イオンおよび蛍光検出領域 (センシング領域) は回路部の耐水性を確保するため, センサチップ表面から約 3 ミクロン下部に存在する. そのためパッシベーション膜のエッチングが必要である. ドライエッチング工程ではイオンセンサ領域にプラズマダメージが導入されるため, ウェットエッチング工程を採用する必要があった. そのため, 微細化に対しては限界が存在すると判断しイオンと蛍光を完全に同じ画素で検出することから 1 μm 画素内に 2 つのセンサを内蔵することに方針を修正した.

③ 4 ミクロンピッチ イオン・蛍光イメージセンサ

当初の研究提案, 上記②に記した通り, 同一のセンサでイオンと蛍光の検出を目的としたが, 微細画素構造を実現するためには, 最先端の CMOS プロセスを活用することが必要である. 微細化により, 同一のセンサでイオン情報を 1 ミクロン以下に狭めることが可能と考え, 微細イオン・蛍光イメージセンサは, 蛍光検出部とイオン検出部を分けて作ることに方針を変更した. 協力ファンダリ工場の 0.15 ミクロン CMOS プロセスを活用し, イオン検出は 5 層メタル上に Ta₂O₅ イオン感応膜を配置した. さらにエクステンド構造とし, 隣接してフォトゲート構造のフィルタフリー蛍光センサを配置した画素ピッチ 4 ミクロンのセンサの作製に成功した.

図9にセンサチップの画素レイアウト，並びに製作したチップの写真を示す．画素構成は128×128画素である．

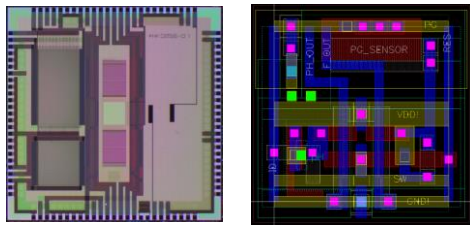


図9: 作製した4マイクロピッチ128×128画素蛍光・イオンイメージセンサ(左)と、1画素のレイアウト
実際に作製したセンサエリアのSEM写真および断面SEM写真を図10に示した．確かに1.5マイクロの空間のギャップで、イオンセンサと蛍光センサが隣接した構造となっている．現在本センサの評価プログラム，計測装置の製作に取り組んでいる．

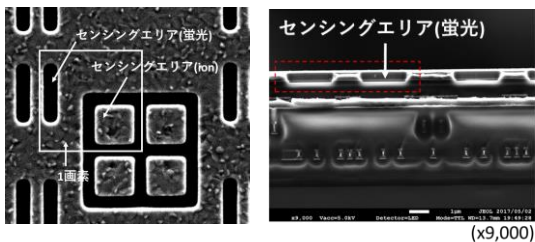


図10: 作製した4マイクロピッチ蛍光・イオンイメージセンサのSEM画像(左)と、断面SEM

図11に示すようにイオンイメージセンサにおいては1024×1024画素の作製も終了しており100万画素のサブマイクロセンサの実現も技術的に可能となった．さらに2μmピッチのイオンイメージセンサおよび計測システムの製作も完了した．

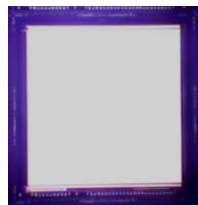


図11: 作製した100万画素(1024x1024)イオンイメージセンサの顕微鏡写真

製作したイオンイメージセンサにより5μm程度のNaCl微結晶が溶けていく様子をリアルタイムに可視化した動画を図12に示す．

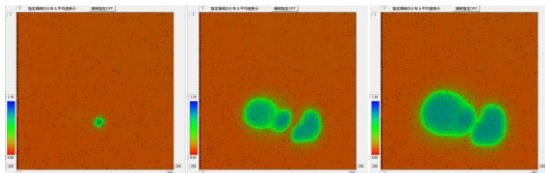


図12: 作製した2マイクロピッチイオンイメージセンサでの取得画像

以上の成果を基に，今回汎用のCMOSファンダリプロセスを利用してセンサを試作した結果を基に，計算上ではあるが35nmのCMOSプロセスを活用することで1マイクロ以下の画素を実現できる見通しが立った．

(2) デバイス構造と動作機構の最適化による蛍光検出感度向上と応用

蛍光検出能力向上について検討を行い3つの解決策を見出した．励起光強度と蛍光強度比2000対1まで分離することに成功した．申請時は励起光強度と蛍光強度比100対1であったのに比べ20倍の向上に至った．1つ目の解決策は図13に示した“電流差分計測技術”である．計測対象の光電流は，“電位の鞍”の位置を変更してその電流の違いを読み取ることで，励起光成分と蛍光成分を算出することができる．つまり，精度良くその違いを検出するためには，大部分である変更しない電流値を計測時に差し引くことが有用であることがわかり，デバイス構造を変更せずに1000対1まで検出できた．更に実際に100μmのFITC蛍光物質検出に対して図14に示すように標準偏差を1/5と狭くすることができ高精度な検出ができることを実証した．2つ目の解決策として，基板バイアスを変更し，“電位の鞍”を急峻にすることで，励起光強度と蛍光強度比を800対1で検出できることを実証できた．3つ目の解決策は，励起光および蛍光が入射される多結晶シリコン薄膜表面の凹凸を減少させることで，図15に示すようにデバイス構造を変更せずに2000対1まで検出できるようになった．具体的には，通常の工程での多結晶シリコンの表面荒さ16nmであったのに対して，1.6nmの表面荒さにすることで上記値を達成できた．

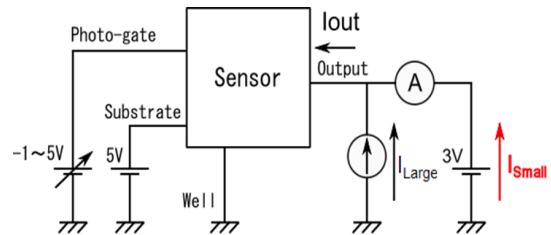


図13: 電流差分検出原理

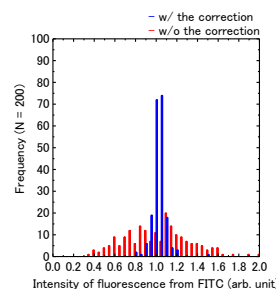


図14: 電流差分原理で検出精度(標準偏差)を5倍向上できた

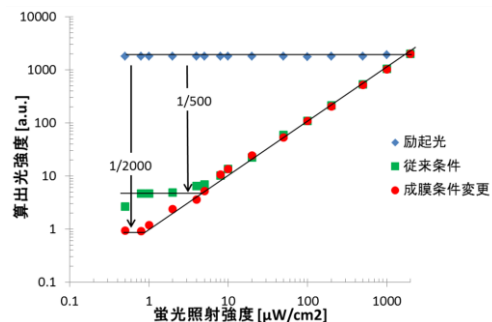


図15: ポリシリコンゲートの平坦性を向上させることで1/2000の蛍光検出ができた

(3) イオン・フィルタフリー蛍光センサによるバイオ関連物質の検出

励起光と蛍光を高い弁別能力を持つフィルタフリー蛍光センサを活用し、様々なバイオ関連物質検出の応用を行った。野生型マウス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 Calcein AM で蛍光ラベリングしたサンプルを用いて、本センサにより、細胞観察が可能であるか検討を行った。図 13 に Calcein AM で蛍光ラベリングしたアストロサイト細胞の蛍光顕微鏡画像を示す（写真下部の値は蛍光のコントラストである）。

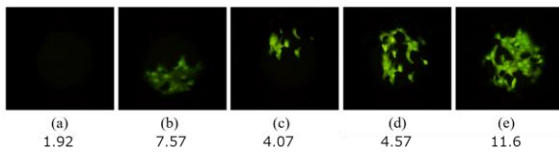


図 13: Calcein AM で蛍光ラベリングしたアストロサイト細胞の蛍光顕微鏡画像

次に蛍光顕微鏡を用いずに、本研究で開発した光学的フィルタを用いないセンサで、蛍光強度を計測した。図 14 に、アストロ細胞密度を変化させて蛍光強度を計測した結果を示す (a)-(e) は図 13 に対応)。併せて、蛍光顕微鏡で取得した情報も示す。本センサで取得した値と蛍光顕微鏡で取得した値が 4% 以下の誤差で合致しており、蛍光顕微鏡を用いずに細胞密度の同定が可能であることを実証することができた。実際の濃度としてはサブマイクロモラーの蛍光物質の検出が可能であった。

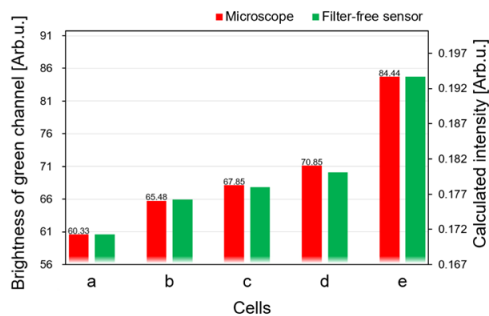


図 14: 本センサで検出した蛍光強度 (赤)。併せて蛍光顕微鏡で取得した値も併記 (緑)。誤差は 4% 以下。

さらに、 $23\mu\text{m}$ ピッチ、 128×128 画素イオン・光イメージセンサ表面に、酵素機能膜またはイオン選択膜を配置することで、電気刺激による海馬や大脳皮質からの ACh, ATP および K イオンの細胞外への放出過程をリアルタイムで観察することに成功した (図 15)。また、蛍光・イオンイメージセンサの有用性を示すため、通常の蛍光顕微鏡とイオンイメージセンサを組み合わせ、細胞内・外のイオンの同時検出に成功し、細胞内に Ca^{2+} イオンを取り込んだ後、プロトンを放出するところをリアルタイムに観察できた。(図 16)

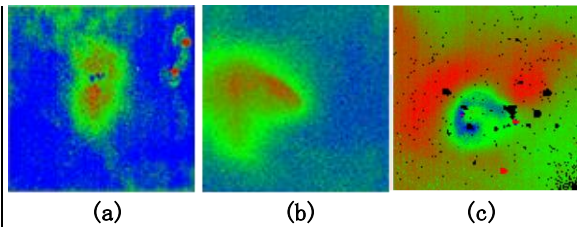


図 15: (a) ラットの海馬のイオンチャネルから K イオンの放出をノンラベル観察。(b) 大脳皮質のシナプスからアセチルコリンが放出する様子をリアルタイム観察した例。(c) ATP 放出を確認した例

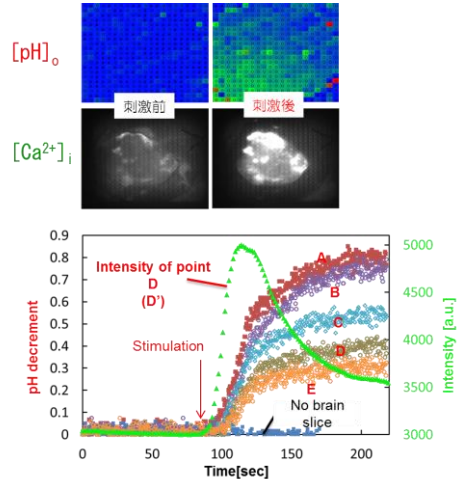


図 16: 細胞内の Ca イオン (蛍光画像) と細胞外のプロトンを同時に計測した例

以上の成果により、これまで光学顕微鏡では取得できなかった様々な生体細胞やイオンと細胞内のイオンの動きを、レンズを使用せず、マイクロチップに静置するだけで検出可能なシステムが実現できたといえる。今後、生命科学分野の研究者とともに、これまで観察不可能であった現象の解明のために活用し研究を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- ① Hirokazu Nakazawa, Keita Yamasaki, Takuya Toyofuku, Ippei Akita, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, Improvement of the detection accuracy and the detection limit of a filter-less fluorescence detector, Applied Physics Express, Vol.6 077001, 2013, DOI: 10.7567/APEX.6.077001
- ② Hirokazu Nakazawa, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, Multimodal bio-image sensor for real-time proton and fluorescence imaging, Sensors and Actuators B:Chemical, vol.180, pp.14-20, 2013, DOI: 10.1016/j.snb.2011.11.010
- ③ Yu Moriwaki, Kazuhiro Takahashi, Ippei Akita, Makoto Ishida, and Kazuaki Sawada, Improvement of dynamic range of filter-less fluorescence sensor with body-biasing technique, Japanese Journal of Applied Physics, vol.54, 04DL03-1-5, 2015, DOI:10.7567/JJAP.54.04DL03

④ Yong Joon Choi, Kazuhiro Takahashi, Motoharu Matsuda, Takeshi Hizawa, Yu Moriwaki, Fumihiro Dasai, Yasuyuki Kimura, Ippei Akita, Tatsuya Iwata, Makoto Ishida, and Kazuaki 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, 04EM10-1-04EM10-6, 2016, DOI:10.7567/JJAP.55.04EM10

⑤ Kiyotsugu Tanaka, Yong Joon Choi, Yu Moriwaki, Takeshi Hizawa, Tatsuya Iwata, Fumihiro Dasai, Yasuyuki Kimura, Kazuhiro Takahashi and Kazuaki Sawada, Improvements of low-detection-limit filter-free fluorescence sensor developed by charge accumulation operation, Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 56, 04CM09-1-04CM09-5, 2017 DOI:10.7567/JJAP.56.04CM09

〔学会発表〕(計5件)

① H. Nakazawa, K. Yamasaki, T. Toyofuku, I. Aikita, M. Ishida, and K. Sawada, Proposal of a High Accuracy Filter-Less Fluorescence Detector for Bio-Applications, The 10th Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim (CLEO-PR 2013), TuJ2-3, 2013, Kyoto, Japan

② Y. Moriwaki, K. Tanaka, K. Takahashi, T. Iwata, I. Akita, F. Dasai, Y. Kimura, M. Ishida, K. Sawada, Wide dynamic range filter-free fluorescence detection sensor with triple-well structure, Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology 2016 (APCOT2016), 1d. 3, pp. 53-54, Kanazawa, Japan

③ Yong Joon Choi, Kazuhiro Takahashi, Motoharu Matsuda, Takeshi Hizawa, Yu Moriwaki, Fumihiro Dasai, Yasuyuki Kimura, Tatsuya Iwata, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, PERFORMANCE ANALYSIS OF FILTER-FREE FLUORESCENCE SENSOR USING FITC DYE, Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology 2016 (APCOT2016), 1d. 5, pp. 57-58, 2016, Kanazawa, Japan

④ K. Tanaka, Y. Moriwaki, T. Hizawa, T. Iwata, I. Akita, F. Dasai, Y. Kimura, K. Takahashi, K. Sawada, A Low Detection Limit Filter-free Fluorescence Sensor Using Charge Accumulation Technique, 2016 International Conference of Solid State Devices and Material (SSDM2016), 2016, Tsukuba, Ibaraki, Japan

⑤ Yong Joon Choi, Kazuhiro Takahashi, Fumihiro Dasai, Nobuo Misawa, Yasuyuki Kimura, Tatsuya Iwata, Kazuaki Sawada, Fluorescence Detection of Submicromolar

Concentration Using a Filter-Free Fluorescence Sensor, 2016 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS2016), pp. 412-415, 2016, Shanghai, China

〔図書〕(計1件)

① 石田 誠, 澤田和明, 集積回路技術とセンサ技術を融合したスマートバイオチップ, 人工臓器, 第42巻1号, pp. 79-83, 2013

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 半導体装置及び半導体装置の製造方法
発明者: 伊藤由規, 瀬戸勝, 石井真, 國井有巳, 二川雅登, 澤田和明

権利者: ラピスセミコンダクタ, 豊橋技術科学大学

種類: 特許

出願番号: 特願 2014-208420

公開番号: 特開 2016-080370

出願年月日: 2014年10月9日

公開年月日: 2016年5月16日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.int.ee.tut.ac.jp/icg/>

<http://www.mmbio.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 和明 (SAWADA, Kazuaki)

豊橋技術科学大学大学院工学系研究科・電気・電子情報工学系・教授

研究者番号: 40235461

(2) 連携研究者

櫻井 孝司 (SAKURAI, Takashi)

順天堂大学研究企画管理室 URA

研究者番号: 50283362

(3) 連携研究者

高橋 一浩 (TAKAHASHI, Kazuhiro)

豊橋技術科学大学大学院工学系研究科・電気・電子情報工学系・テニュアトラック講師

研究者番号: 90549346

(4) 連携研究者

二川 雅登 (FUTAGAWA, Masato)

静岡大学・学術院工学領域・電気電子工学系列・准教授

研究者番号: 90607871

(4) 連携研究者

服部 敏明 (HATTORI, Toshiaki)

豊橋技術科学大学大学院工学系研究科・電気・電子情報工学系・准教授

研究者番号: 80198762