

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05715

研究課題名(和文) フォトニック結晶構造の最適化によるバイオ蛍光計測マイクロシステム

研究課題名(英文) Biofluorescence measurement micro system by optimization of photonic crystal structure

研究代表者

柳田 保子 (YANAGIDA, Yasuko)

東京工業大学・科学技術創成研究院・教授

研究者番号：10282849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バイオチップ上で微弱な蛍光強度を高めることのできるフォトニック結晶構造(PhC)の光学特性評価を目的とした。PhCは正方形の格子状に円孔配列を配しており、ガラス基板上にSi₃N₄膜を蒸着し微細加工技術により作製した。また格子定数と円孔直径が異なるナノ周期構造も作製した。波長520nmの光をガラス基板の側面から導入すると、蛍光強度や波長によりPhC結晶面より上方回折することを確認した。さらに、温度応答性ゲルにナノインプリント法を用いてナノ構造を転写して、温度変化に伴い、フォトニック結晶のナノ周期構造を任意に変化させることで、蛍光測定波長を任意に変化可能な光学デバイスを作製できた。

研究成果の概要(英文)：Fluorescence assay is well established method for a biochemical sensing for detecting and measuring biological molecules, such as DNA assay. However, light intensity from fluorophores are relatively-weak. In this study, we fabricated a Photonic Crystal (PC) slab for the enhancement of a fluorescence intensity. The PC was made of Si₃N₄ on a glass substrate and it have a square-lattice hole array. We also fabricated another structure with different lattice constants and hole diameters. We then evaluated the fabricated PhC by introducing the light with the wavelength of 520 nm from the side and measuring the spectrum of emitted light. Moreover, we fabricated a fluorescence measurement device which can arbitrarily change nano periodic structure of photonic crystal by using temperature responsive gel. By transferring nanostructures to a thermoresponsive gel by nanoimprint method, a device was able to change its measurement wavelength arbitrarily with temperature change.

研究分野：マイクロ・ナノシステム

キーワード：マイクロ加工 フォトニック結晶構造 バイオ計測 マイクロシステム

1. 研究開始当初の背景

食品の安全性検査や、新型インフルエンザなど各種感染症の診断などにおいて、バイオ計測の迅速化が急務の課題となっている。このバイオ計測では、食中毒の原因となる菌体や感染症の原因ウイルスなどが増殖する前の極微量の段階で高感度に検出する必要がある。また、計測対象のバイオ分子などを、感染や発症現場などオンサイトで精度高く診断するために、バイオ診断システムの小型化・軽量化が求められている。このような問題に対し、近年の微細加工技術の進展により、DNA やタンパク質、菌体やウイルスなどを高感度に計測するための蛍光計測バイオチップの開発が進んでいる。これをオンサイト計測に用いるためには、微弱な蛍光を精度よく検出できる光学系のマイクロ化が必須である。

当研究グループでは、フォトニック結晶といわれる光の波長程度の周期的な誘電率分布を持ったナノ構造体を、バイオ分子などの高感度計測へ応用するため、これまでにポラスシリコンの製作や、ナノ微粒子を規則的に配置する手法を検討して、バイオ分子検出に関する研究を実施してきた。また上記方法のほかに、電子線リソグラフィなどの微細加工技術によりガラス基板上にフォトニック結晶構造を作製し、そのバイオ分子計測の高感度化などに関する研究を行ってきた。これまでに、ガラス基板上に成膜したシリコンナイトライド薄膜上に、電子線リソグラフィにより正方格子状ホールアレイを作製し、顕微分光測定を行ったところ、波長 500nm 付近の光に対して透過率の低下ピークをもつこと、またピーク波長はホール直径に依存して変化することを確認した。さらに製作したチップの基板側面より白色光を導波させると、フォトニック結晶パターンエリアで特定波長の蛍光のみを上方向へ放出すること、この放出光波長はフォトニック結晶パターンの寸法、特にホール間隔に依存することを明らかとしている。

以上により、ガラス基板内を導波する全反射光のうち、ある特定波長の光のみをフォトニック結晶表面で上方向に回折放出させる手法に着目し、複数種類のフォトニック結晶構造と回折する光波長との相関関係について詳細検討を進めるとともに、一枚のガラス基板上に複数種類のフォトニック結晶構造を連続的に作製することで、励起光と蛍光の光路を分離したマイクロ光学系を併せ持ち、多色蛍光の同時検出が可能な超高感度バイオ蛍光計測チップを開発できると着想した。

2. 研究の目的

本研究では、フォトニック結晶の光学特性を微量な菌体やウイルス、バイオ分子のオンサイト蛍光測定に適用するために、以下の点を明らかとすることを目的とした。

1) フォトニック結晶構造パターンと上方放出光波長との相関性を精査して、可視光波長領域の蛍光に対応するフォトニック結晶を作製し、光学特性を評価する。

2) 一枚のガラス基板上に複数のフォトニック結晶構造を連続的に作製し、それぞれの特定波長光の上方放出特性を検証して多色蛍光計測フォトニック結晶チップの製作指針を決定する。

3) フォトニック結晶領域の大面积化のための微細加工条件を決定し、高感度蛍光計測システムの簡易化を測る。

3. 研究の方法

3.1 原理

フォトニック結晶とは周期的な誘電率分布を持つナノ構造体で、これまで赤外線領域での研究が行なわれてきたが、近年では可視光領域での利用が注目されている。フォトニック結晶面における蛍光高輝度観測の原理は、基板表面に製作した回折格子としてフォトニック結晶構造が存在すると、蛍光体の光放出形状が変化することである。基板表面で励起された蛍光体は全方位に蛍光を発するため一部は基板に入射し、側面方向への入射角の大きいものは全反射により基板内部に導波する。回折格子を製作して基板内部での全反射を減少させることで、受光素子に観測される光量の増加が見込まれる。概念図を Fig.1 に示す。

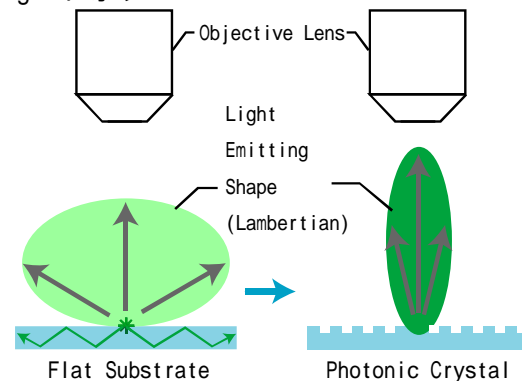


Fig.1 Basic concept of the fluorescence enhancement on the PC chip

3.2 製作プロセス

ガラス基板上にシリコンナイトライド (SiN) 膜を微細加工したフォトニック結晶の製作は、電子線描画とドライエッチングプロセスにて行った。基板として無アルカリガラス (#1737, Corning) を使用し、シリコンナイトライドを CVD プロセスにより 80 nm 成膜した。電子線レジストには ZEP520-A (日本ゼオン) を使用し、帯電防止剤としてエスベイサー 300Z (昭和電工) をスピンコートした。電子線描画装置 (ELS-7500, ELIONIX) にて描画・現像後、ICP エッチング装置

(RIE-10iP, Samco)にて CHF_3 プラズマエッチングを行った。同装置でレジストの O_2 ア

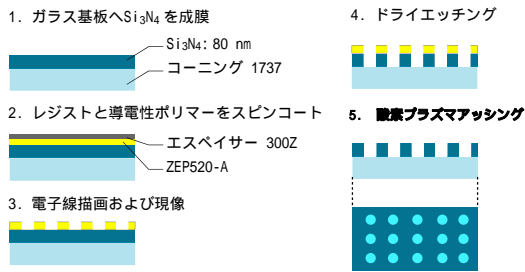


Fig.2 Fabrication process of PhC device

ッシングも行った (Fig.2)。

また、温度応答性高分子膜を用いたナノ周期構造作製は、Si 基板上に電子線描画により作製した微細パターンをポリジメチルシロキサン (PDMS) で型取りし、ナノインプリントすることによって作製した。本研究では温度応答性高分子膜として Bioresist (日産化学株式会社) を使用した。Bioresist は、Poly-N-isopropylacrylamide (以下 PNIPAAm) を主成分とした温度応答性高分子で、一般的なフォトレジストと同様に、紫外線を照射することで簡易に微細パターンを作製することが可能である。まず、シリコン基板にポジ型のフォトレジストである ZEP520 をスピンコートして電子ビーム露光装置 (JBX-6300SJ) によって描画し現像を行った。その後、PDMS を流し込み、硬化させパターンを転写した。また、ガラス基板に Bioresist をスピンコートし、作製した PDMS の鋳型を用いてナノインプリントを行い、微細パターンを Bioresist に転写しフォトニック結晶を作製した。

4. 研究成果

4.1 光シミュレーションによるフォトニック結晶構造と光学特性との相関性の検討

フォトニック結晶構造パターンと光学特性について、光シミュレーションによるフォトニック結晶構造と光学特性との関連性を検討した。MEMS-One を用いて一次元フォトニック結晶の全反射による光導波解析に関する検討を行ったところ、結晶構造による回折は確認されたが、上部では光源の影響が大きいことから、定量化のために引き続き検討する必要があることが分かった。また EEM-FDM (株式会社 EEM) による 3 次元 FDTD 法を用いて Bioresist によるナノ周期構造と光学特性との関係について検討を行ったところ、波長 500nm に共振点波長を持つ構造を見出すことができた。

4.2 多色蛍光計測用フォトニック結晶チップの製作

ガラス基板の上にシリコンナイトライド

(SiN) 膜を微細加工したフォトニック結晶構造について、形状・寸法などの設計について検討した。円孔の大きさや格子定数を最適化するために、先行研究で作製した直径 380nm、深さ 100nm、ホールピッチ 520nm を基準として、赤色、黄緑色、黄色、黄赤色に共鳴すると予想される円孔 130~530nm、円孔間隔 520~730nm 程度までを適宜組み合わせ、8 パターンのフォトニック結晶を設計した (Table 1)。

Table1 Parameters of designed PhC

	PhC1	PhC5	PhC6	PhC7	PhC8	PhC2	PhC3	PhC4
ピッチ a [nm]	520	570	580	590	600	728	728	728
円孔径 d [nm]	380	417	424	431	438	532	266	133

また円孔間隔の影響について詳細検討を行うために、円孔直径を 280nm とし円孔間隔を 400 から 500nm まで変化させた構造パターンを組み合わせ設計した (Table 2)。

Table2 Parameters of designed PhC

	PhC9	PhC10	PhC11	PhC12	PhC13
ピッチ a [nm]	400	450	500	520	550
円孔径 d [nm]	280	280	280	280	280

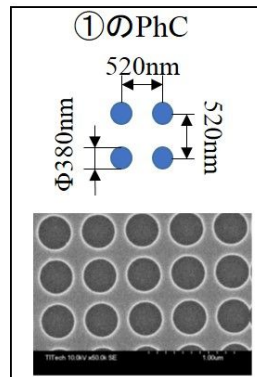


Fig.3 Example of fabricated structure of PhC device

次にガラス基板の上に 80nm の SiN 膜を蒸着し、パターン形状を作製した。製作例を Fig.3 に示す。パターン描画のためのレジスト膜厚、EB 描画のドーズ量、エッチングレート等の製作条件について詳細検討を行い、SEM と AFM 観察により、設計

通りのナノ周期構造パターンを安定的に製作するための条件を得ることができた。

このナノ構造パターンを有するガラス基板へ斜め上方より白色光を照射したところ、波長の異なる散乱光が発生し、回折光が放出された様子を観察できた。またガラス基板の下側より白色光を照射し、透過スペクトルを取得したところ、構造パターンの違いに応じて透過光の透過率が変化することが示された。ガラス基板の側面より白色光を導入した測定実験の概要を Fig.4 に示す。

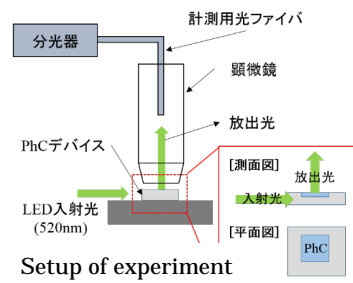


Fig.4 Setup of experiment

それぞれのフォトニック結晶領域から放出される光のスペクトルを測定したところ、異なる波長光が放出される様子を観察できた。円孔径が大きくなるに従い高強度となること、10nm程度の格子定数の変化はスペクトルピークに影響を及ぼさないことなどが明らかとなった (Fig.5)。

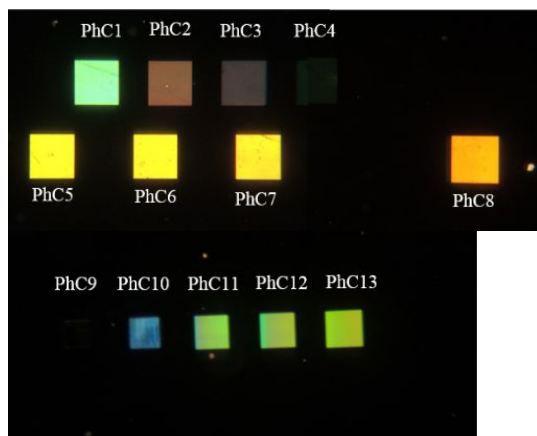


Fig.5 Image of PhC

4.3 フォトニック結晶領域の大面积化を実現するための製作方法の検討

フォトニック結晶領域の大面积化を目指し、その微細加工プロセスの最適化について検討を行った。ガラス基板上に温度応答性材料であるバイオレジスト膜を作製し、ナノインプリント法を用いることにより、円柱径約640nm、円柱間距離1260nmの正方格子状アレイを作製できることを確認した。このガラス基板の側面より白色光を照射すると、ナノ周期構造表面が20では波長646nm光を、40では波長560nmの光を上方放出することを確認した (Fig.6)。

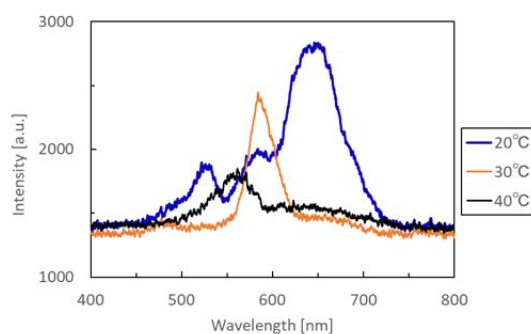


Fig.6 Spectrum from SiN PhC

今後、円柱径約640nm、円柱間距離1260nmの正方格子状アレイ形状を有する鋳型の製作法を確立することにより、ナノインプリント法を用いて、フォトニック結晶構造領域の大面积化が可能になると考えられる。

4.4 バイオ分子計測の最適化

バイオ分子計測でよく用いられる蛍光波長光を、適宜組合わせて入射光としたときのフ

ォトニック結晶構造と放出光の関係について検討を行った。ガラス基板上的SiN膜にフォトニック結晶構造を作製したガラス基板を用いて、蛍光色素の中でも最大蛍光波長が525nmであるフルオレセイン蛍光色素から放出される525nmの光をナノ周期構造パターンの側面より導入したところ、円孔間隔520nm、円孔直径280nmで効率よく光が放出される様子を得ることができた。またガラス基板の側面に蛍光色素を滴下するためのマイクロチャンバを設置し、フルオレセインを滴下して、各ナノ構造表面からの放出光を測定した結果、円孔間隔が蛍光波長と同程度のナノ構造表面からの放出光強度が強くなること、本デバイスにおける測定限界は10mg/ml程度であることを確認した (Fig.7)。

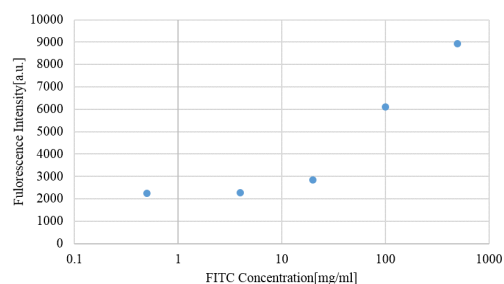


Fig.7 Measurement of FITC concentration

蛍光試薬の中でも最大励起波長554nm、最大蛍光波長568nmであるCy3と、最大励起波長667nm、最大蛍光波長685nmであるCF660Rを混合し、バイオレジスト膜上の周期構造の側面に設置したマイクロチャンバに滴下して、各蛍光試薬の励起波長光を照射したところ、20のナノ周期構造表面からはCF660Rの蛍光スペクトルを、40の表面からはCy3の蛍光スペクトルを取得することを確認した (Fig.8)。

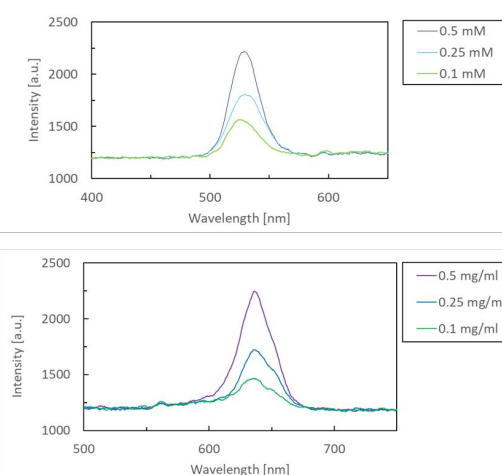


Fig.8 Spectrum from bioresist PhC

以上により、ナノ周期構造表面の光学特性を用いて、バイオ分子への標識に用いられるラベル化蛍光色素を検出可能であることを示した。

本研究は、問題解決が急務となっている食品の安全性検査や、新型インフルエンザなど各種感染症の診断などに対する新しい新規診断法の開発につながり、また、分析化学や医学、ライフサイエンス研究推進により国民のQOL向上へ資することが期待され、ライフイノベーションの推進に大きく貢献すると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 13 件)

櫻井 友紀也, 朴 鍾湊, 初澤 毅, 柳田 保子, ナノインプリント法を用いた温度応答性フォトニック結晶の作製, 第78回応用物理学会秋季学術講演会 2018年3月

三野 恵莉子, 初澤 毅, 柳田 保子, 朴 鍾湊, ナノピース微細構造膜の製作と分光への応用, 2018年度精密工学会春季大会 2018年3月

櫻井 友紀也, 朴 鍾湊, 初澤 毅, 柳田 保子, 温度応答性高分子を用いたフォトニック結晶の作製, 2017年度精密工学会秋季大会 2017年9月

黒坂 幹哉, 朴 鍾湊, 柳田 保子, 初澤 毅, 裏面露光による電極アレー構造の製作(第2報)熱処理による金薄膜の密着性向上, 2017年度精密工学会秋季大会 2017年9月

TAN ZHENG LIN, 松谷 晃宏, 西岡 國生, JONGHO PARK, 初澤 毅, 柳田 保子, ヒドロゲルファイバー表面形状形成のためのマイクロノズル作製, 第78回応用物理学会秋季学術講演会 2017年9月

柳田保子, バイオ計測のためのマイクロ・ナノデバイスの開発, 電気化学会第84回大会, 受2Q10, 2017.3.26 東京

Y. Yanagida, BioMEMS chip for single-cell characterization. Cooperative Symposium Toward New Biotechnology Tsinghua-Tokyo Tech & Industry, Tokyo Tech, Yokohama, Japan, January 2017

伴野将大, 松谷晃宏, 朴 鍾湊, 柳田 保子, 初澤 毅, ガラス基板上的SiN薄膜によるフォトニック結晶構造の光学特性, 第64回応用物理学会春季学術講演会講演予稿集, 01-039, 2017.3.15

Y. Yanagida, MEMS/NEMS based biochip for biomedical sensing. International Symposium on Biomedical Engineering, Tokyo, Japan, Nov. 2016

N. Tottori, Y. Sakurai, T. Nisisako, Y. Yanagida, T. Hatsuzawa, Thermally tunable deterministic lateral displacement through hydrogel micro pillar arrays. The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and

Life Science (MicroTAS2016), Dublin, Oct. 2016

フォトニック結晶の光学特性と蛍光測定への応用, 伴野将大, 朴 鍾湊, 柳田 保子, 初澤 毅, 2016年度精密工学会秋季大会学術講演会論文集, C07, 2016.9.8

J.G. Park, Y. Yanagida, T. Hatsuzawa, Characterization of double tank electrochemical cell for fabrication of porous silicon. 8th International Symposium on Microchemistry and Microsystems, Hong Kong, May 2016

Y. Yanagida, Y. Imai, J.G. Park, T. Endo, and T. Hatsuzawa, Development of On-site Fluorescent Measurement Chip using Photonic Crystal, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem2015), Honolulu, Hawaii, USA, Dec. 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.yanagida.first.iir.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳田 保子 (YANAGIDA Yasuko)
東京工業大学 科学技術創成研究院・教授
研究者番号: 1 0 2 8 2 8 4 9

(2) 研究分担者

初澤 毅 (HATSUZAWA Takeshi)
東京工業大学 科学技術創成研究院・教授
研究者番号: 7 0 2 7 2 7 2 1

朴 鍾湊 (PARK Jongho)

東京工業大学 科学技術創成研究院・助教
研究者番号: 8 0 6 3 9 1 4 6

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号:

(4) 研究協力者

(0)