

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2012

課題番号：21246058

研究課題名（和文） 蛍光・イオン融合イメージセンサ技術によるマルチモーダルバイオチップの実現

研究課題名（英文） Realization of Fluorescence-Ion Multimodal Image Sensors.

## 研究代表者

澤田 和明 (SAWADA KAZUAKI)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40235461

## 研究成果の概要（和文）：

CMOS集積回路技術により、同じ画素で異なる物理量（イオン濃度、蛍光：特定波長情報、光量）を混載なしに取得できるイメージセンサ構造を提案し、実際にそれらの動画像を取得する融合イメージセンサを実現できた。全く同じ画素で、イオン濃度、蛍光、光量を検出できる特徴があるため、各現象の因果関係を同定することを可能である。このようなバイオイメージセンサは世界に類がなく、新たな科学の発展に寄与できる。

## 研究成果の概要（英文）：

A multimodal bio-image sensor for proton (pH, power of Hydrogen) and filter-less fluorescence imaging is developed, and its prototype has been fabricated using CMOS silicon integrated circuit technology. Both pH and fluorescence images were successfully obtained without optical filters or gratings and simultaneously in the same area in real time using the developed image sensor for the first time.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	15,100,000	4,530,000	19,630,000
2010年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2011年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
総計	31,100,000	9,330,000	40,430,000

## 研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・電子デバイス・電子機器

キーワード：センシング

## 1. 研究開始当初の背景

シリコン LSI トップダウンプロセスと、微小電気機械素子 (MEMS) や高周波回路 (RF) 技術を融合し、新しい価値軸を創成する “More than Moore” 機運が高まっている。本提案は、バイオ生化学技術と LSI 技術を融合することで、これまでどのような手段でも実現できなかった高機能なセンサデバイスが実現可能な状況になっている。

種々の化学現象を解析する重要なパラメータの一つに酸性、アルカリ性の度合いを示

す pH がある。pH はガラス電極や ISFET に代表されるセンサで計測され、pH 情報により細胞の活性度や食品の品質等を知ることができる。また、蛍光標識や蛍光染色の検出は、分子生物学や生化学研究における分析などの分野で広く用いられている。これらの情報を 2 次元イメージとして取得することにより、現象を直感的に理解することが可能となる。また、pH と蛍光の情報を同一画素で取得することにより、対象物がもたらした複数の化学現象を有機的に解析することが可能

となる。そのため、本センサは化学計測における新しい知見を開くことができると期待できる。

## 2. 研究の目的

同一センサで、光画像・蛍光画像・イオン画像を同時測定できる世界に類をみないマルチモーダルセンサを実現し、このセンサを CMOS/CCD 技術によりそれらの情報を画像化できるバイオイメージセンサを製作する。さらにこのバイオイメージセンサに生体、細胞などを直接密着または培養させることにより、それらの情報をリアルタイムに観察できるシステムを製作することを目標とする。従来の光学的な手法では不可能であったことを、LSI 技術との融合で初めて実現する世界的にも画期的なイメージセンサデバイスの製作を行う。

## 3. 研究の方法

本研究では、細胞などの形状がわかる光画像、特定のタンパク質や抗体の反応を示す多重染色された蛍光画像、さらに細胞や生体から放出される K イオン、Ca イオン、H イオン等を 30frame/秒でリアルタイムに測定できるセンサを製作する。画素数として  $128 \times 128$  画素のマルチモーダルバイオイメージセンサを豊橋技術科学大学固体機能デバイス施設で作製し、センササイズ  $10 \mu\text{m}$  角のデバイスを目指す。センササイズ  $10 \mu\text{m}$  角は人間の細胞の大きさ  $20 \mu\text{m}$   $\phi$  より小さくなり細胞の観察が可能となる。今後幅広く応用していくためには、さらに  $5 \mu\text{m}$  ピッチ以下の微細化が必要である。現状のイメージセンサは  $2 \mu\text{m}$  ピッチ以下に微細化されており、最先端の LSI 技術を利用することで、 $5 \mu\text{m}$  ピッチ以下にすることは十分可能である。本研究で微細化されたチップは、期間終了後も共同研究機関での更なる用途開発や技術開発、並びに製品化をねらう。

## 4. 研究成果

図 1 にセンシングエリア周辺の等価回路を示す。本センサには pH と蛍光の信号電荷を蓄積する Floating Diffusion が 2 カ所に配置されている。図中の  $C_{fd1}$  は pH の信号電荷を、 $C_{fd2}$  は蛍光の信号電荷を蓄積するのに用いる。pH と蛍光の測定は交互に行い、TG1 および TG2 を用いて 2 つの Floating Diffusion 容量に転送された pH と蛍光の信号電荷の変化は、ソース・フォロアを介して読み出す。この方法により、同一画素で pH と蛍光の計測を可能とする。

図 2 に提案センサの概念図を示す。ここで、A-B 面は pH 測定、A-C 面は蛍光測定に用いる。A-B 面の断面図を図 3 に示す。なお、A-B 面と A-C 面の断面構造は全く同じである。セン

シングエリアの断面は  $\text{Si}_3\text{N}_4/\text{SiO}_2/\text{Si}$  の EIS (electrolyte-insulator-semiconductor) 構造をしており、参照電極には飽和 KCl 溶液で浸した Ag/AgCl 電極を使用している。参照電極の電圧  $V_{ref}$  は、センシングエリアの電位を固定するため、常に一定の電圧を印加する。本センサでは、プロセスとの適合性を考慮して LP-CVD で成膜した  $\text{Si}_3\text{N}_4$  を水素イオン感応膜として使用した。 $\text{Si}_3\text{N}_4$  の他、水素イオン感応膜としては  $\text{Al}_2\text{O}_3$  と  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  も多く用いられる。

センシングエリア直下のエネルギーバンド図を図 4 に示す。フィルタレス蛍光検出を行う上で重要なのは、シリコン表面から光電効果で発生した電子を読み出すことができる点までの深さ、すなわち光の吸収深さ  $W$  が変化する点である。本センサでは、光の吸収深さ  $W$  を TG2 で変化させることができる。その方法については後述する。

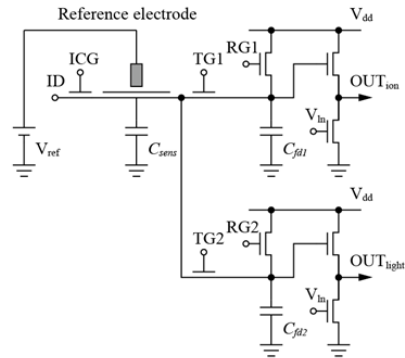


図 1. センシングエリア周辺の等価回路

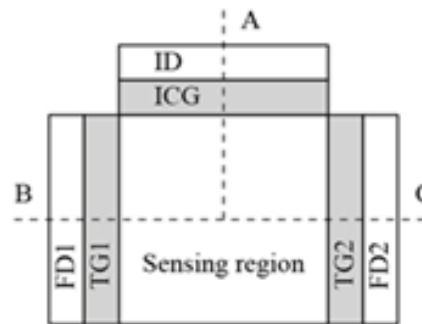


図 2. 提案するセンサの概念図

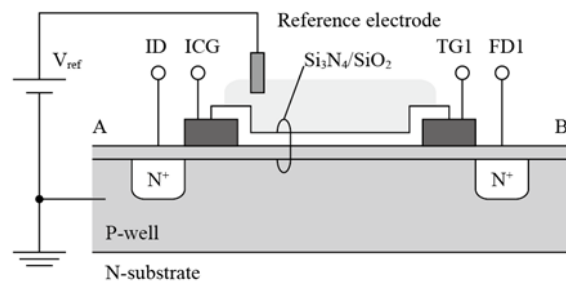


図 3. A-B の断面図

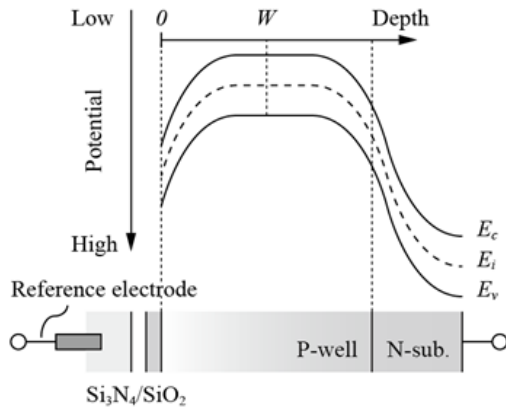


図 4. センシングエリア直下のエネルギーバンド図  
pH の測定原理

ここでは、pH 測定の基本動作について説明する。図 5 に pH の測定手順を示す。まず初めに、FD はリセットトランジスタによりリセットされる。また、センシングエリア直下のポテンシャルの深さは、pH に応じて変化する。

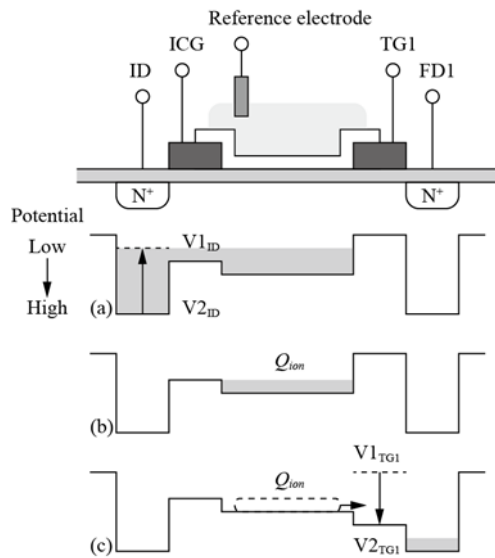


図 5. pH の測定手順

図 5(a) は、センシングエリア直下のポテンシャル井戸へ ID から電荷を注入している状態を示している。図 5(b) においてポテンシャル井戸に蓄積した電荷  $Q_{ele}$  は、pH によってその量が変わる。すなわち、ポテンシャル井戸の深さは電荷量へと変換される。その後、図 5(c) に示すように、 $Q_{ele}$  は、TG を開くことによって FD へ転送される。

このように  $Q_{ele}$  は、センシングエリアから Floating Diffusion に転送され、さらにソース・フォロアで読み出されるため、式(1)のような内部増幅が起きる。式(1)において  $A_{sf}$  は、ソース・フォロアの増幅率である。

$$A_{ele} = \frac{C_{sens}}{C_{ele}} \cdot A_{sf} \quad (1)$$

### 蛍光の測定原理

次に、蛍光測定の基本動作について説明する。図 6 に蛍光の測定手順を示す。まず、図 6(a) に示す通りセンシングエリア直下のポテンシャル井戸に電荷を注入する。センシングエリア直下の表面ポテンシャルは、電荷の注入量に応じて変化する。また、表面ポテンシャルが変化することにより空乏層幅が変化する。すなわち、ポテンシャル井戸に注入する電荷量を調整することで、光の吸収深さ  $W$  を変化させることができる。

この電荷量の調整は、ゲート電極 TG2 の電圧を変化することで行う。まず図 6(b) に示すように、TG2 の電位を ICG の電位より高い  $V_{2TG2}$  に固定する。これにより、ポテンシャル井戸の電荷が TG2 で擦切られ表面ポテンシャルが変化するため、光の吸収深さ  $W1$  が定まる。次に図 6(c) に示すように、TG2 の電位を  $V_{2TG2}$  より高い  $V_{3TG2}$  に固定する。これにより、 $W1$  と同様に光の吸収深さ  $W2$  が定まる。光の吸収深さ  $W1$  と  $W2$  において、光電効果で発生した電流は式(2)および(3)で表される。ここで  $\lambda_1$  および  $\lambda_2$  は入射光の波長、 $\phi_1$  および  $\phi_2$  はそれぞれ  $\lambda_1$  および  $\lambda_2$  のシリコン表面での入射光強度、 $\phi_1$  および  $\phi_2$  はそれぞれ  $\lambda_1$  および  $\lambda_2$  の光の吸収係数、 $S$  は光が照射される面積、 $h$  はプランク定数、 $c$  は真空中の光速、 $q$  は素電荷である。

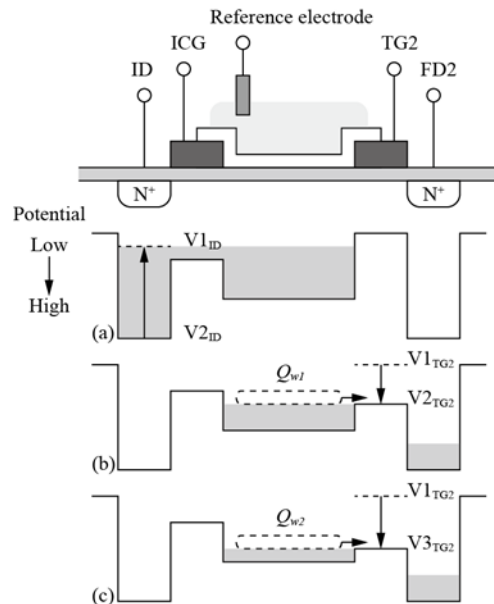


図 6. 蛍光検出の手順

$$I_1 = \frac{\phi_1 q S \lambda_1}{hc} (1 - e^{-\alpha_1 W_1}) + \frac{\phi_2 q S \lambda_2}{hc} (1 - e^{-\alpha_2 W_1}) \quad (2)$$

$$I_2 = \frac{\phi_1 q S \lambda_1}{hc} (1 - e^{-\alpha_1 w_2}) + \frac{\phi_2 q S \lambda_2}{hc} (1 - e^{-\alpha_2 w_2}) \quad (3)$$

式(2)および(3)における未知の値は、入射光強度  $\phi_1$  および  $\phi_2$  である。よって、この連立方程式を解くことで、波長の異なる2色の光の入射光強度を導き出すことができる。なお、電流 - 電圧変換は式(4)で行われる。ここで  $T$  は信号電荷の蓄積時間、 $A_{sf}$  はソース・フォロアの増幅率である。

$$V = \frac{1}{C_{fd2}} \cdot T \cdot A_{sf} \cdot I \quad (4)$$

図7に試作したマルチモードイメージセンサの写真を示す。試作は豊橋技術科学大学 (TUT) エレクトロニクス先端融合研究所 (EIIRIS) の  $5 \mu\text{m}$  N-Sub. 1P1M (1-Poly and 1-Metal) Single Well CMOS プロセスを用いた。図7左図は、ピクセル数 1024、スキャナ回路を搭載したチップの全体写真である。チップをパッケージにボンディング後、溶液からボンディング部を保護するために、センシングエリア以外を变成シリコン系接着剤でコーティングした。図8右図は、1画素の顕微鏡画像である。画素ピッチは  $130 \mu\text{m}$ 、開口部の面積は  $54 \times 40 \mu\text{m}^2$  である。

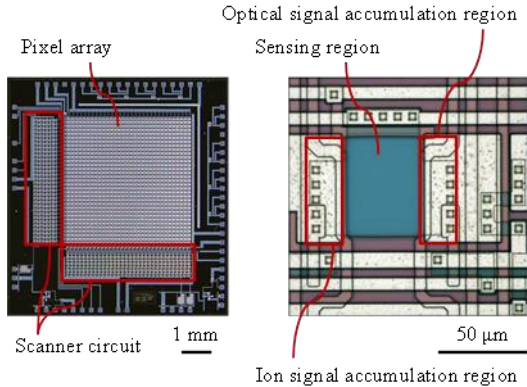


図 7. マルチモードセンサの写真

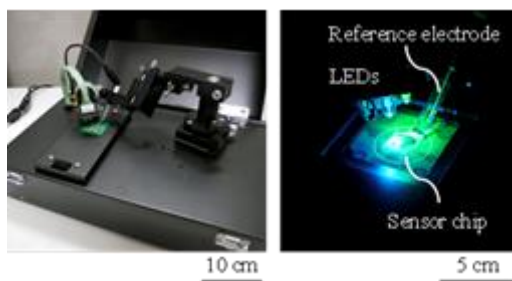


図 8. 信号読み出し装置の外観

図8に示すのが、信号読み出し装置である。参照電極と、光源として任意の波長の LED

(light-emitting diode) をセットできる。チップの駆動パルスは装置に USB (universal serial bus) で接続したパソコンから入力する。一方、チップからの出力信号も USB を介してパソコンに転送され、結果が 5 fps の動画として表示される。

試作したセンサの動作を確認するため、2色のLEDを蛍光 (中心波長 525 nm) および励起光 (中心波長 470 nm) として用いた模擬実験を行った。また、pH 測定には3種類の pH 標準緩衝液 (pH 4.01 buffer solution: TOADKK 143F191, pH 6.86 buffer solution: TOADKK 143F192, pH 9.1 buffer solution: TOADKK 143F193) を用いた。

模擬実験の結果を図9に示す。図9(I)-(IV)はそれぞれ、測定風景、励起光イメージ、蛍光イメージ、pH イメージを示している。また図9(a)-(c)はそれぞれ、励起光波長および蛍光波長の LED、蛍光波長の LED を照射している。なお、全測定を通して、センサ表面は pH 標準緩衝液で覆われている。

この結果から、2波長の光を分別できており、pH イメージも取得できていることがわかる。また事前に行った pH 測定の結果、その感度はおよそ 36.8 mV/pH であった。ネルンストの式によると、pH 感度の最大値はおよそ 59 mV/pH であるが、式(1)で示した内部増幅率のためこのような値になる。さらに、1画素において、励起光の光強度に対して1桁小さい蛍光の光強度を検出できることを確認している。

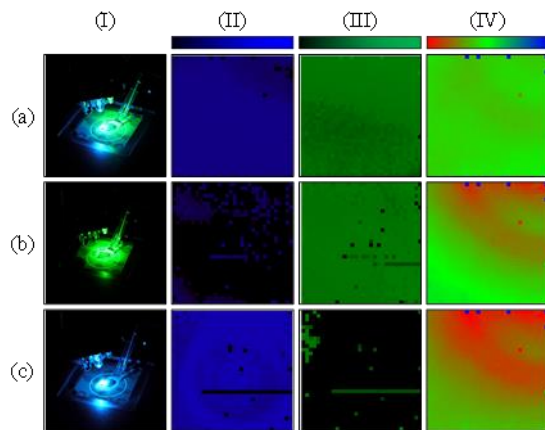


図 9. マルチモードセンサによる pH と蛍光の測定結果

以上のように我々は、pH と蛍光を同一画素で検出することができるマルチモードイメージセンサを実現した。細胞内の活動を蛍光検出法、細胞外に放出されたイオンを pH 検出の応用で測定可能となる。そのため、本センサを用いて蛍光染色した細胞内外の活動を画素単位でマッピングすることが可能となる。

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 7 件)

1. Toshiaki Hattori, Yoshitomo Masaki, Kazuya Atsumi, Ryo Kato and Kazuaki Sawada, “Real-Time Two-Dimensional Imaging of Potassium Ion Distribution Using an Ion Semiconductor Sensor with Charged Coupled Device Technology”, ANALYTICAL SCIENCES, vol.26, No.10, pp. 1039-1045, 2010 (doi:10.2116/analsci.26.1039)
2. Hirokazu Nakazawa, Makoto Ishida and Kazuaki Sawada, “Progressive-Type Fused pH and Optical Image Sensor”, Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 49, 04DL04, 2010 (doi:10.1143/JJAP.49.04DL04)
3. H. Nakazawa, M. Ishida, and K. Sawada, “REDUCTION OF INTERFERENCE BETWEEN pH AND OPTICAL OUTPUT SIGNAL IN A MULTIMODAL BIO-IMAGE SENSOR”, Proceeding of IEEE Sensors 2010 Conference, pp. 2299-2302
4. Hirokazu Nakazawa, Makoto Ishida, and Kazuaki Sawada, “Multimodal bio-image sensor for real-time proton and fluorescence imaging”, Sensors and Actuators B:Chemical, pp.14-20, 2012, doi:10.1016/j.snb.2011.11.010
5. Takenaga S, Tamai Y, Okumura K, Ishida M, Sawada K, “Label-Free Acetylcholine Image Sensor Based on Charge Transfer Technology for Biological Phenomenon Tracking”, Jpn. J. Appl. Phys, Vol.51, 2012, 027001-1-5, Doi:10.1143/JJAP.51.027001
6. Hirokazu Nakazawa, Makoto Ishida, and Kazuaki Sawada, “Reduction of interference between pH and optical output signals in a multimodal bio-image sensor”, IEEE Sensors Journal, Vol.11, pp.2718-2722, 2011, doi:10.1109/JSEN.2011.2157340
7. Shoko Takenga, Yui Tamai, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, “Charge Accumulation Type Hydrogen Ion Image Sensor with High pH resolution”, Japanese Journal of Applied Physics (JJAP), Vol. 50, No. 2, 027001, 2011 (doi:10.1143/JJAP.50.027001)

[学会発表] (計 14 件,) その他 25 件  
(国内)

1. 中澤寛一, 石田 誠, 澤田和明, pH・光マルチモーダルバイオイメージセンサの特性改善 -pH と光出力信号の相互干渉低減-, 2010 年映像情報メディア学会年次大会, 愛媛大学, 愛媛, 2010 年 8 月 31 日~9 月 2 日
2. 中澤寛一, 石田 誠, 澤田和明, 医療分野へ応用可能な pH・光マルチモーダルバイオイメージセンサの開発, 第 27 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 島根, 2010 年 10 月 14-15 日
3. 中澤寛一, 福司康子, 櫻井孝司, 石田 誠, 寺川 進, 澤田和明, 医療分野へ応用可能な pH・光マルチモーダルバイオイメージセンサの開発, 映像情報メディア学会 情報センシング研究会, 機械振興協会, 東京, 2010 年 11 月 19 日
4. 中澤寛一, 石田 誠, 澤田和明, イオン・蛍光マルチモーダルイメージセンサ, 第 72 回応用物理学会学術講演会, 山形, 2011.8.29-9.2
5. 中澤寛一, 石田 誠, 澤田和明, pH・蛍光マルチモーダルイメージセンサの提案・試作, 第 28 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 東京, 2011.9.26-27

(国際)

1. Hirokazu Nakazawa, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, “Proposed a Progressive Type pH and Optical Fused Image Sensor”, 2009 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM), pp.1350-1351, Sendai, Miyagi, Japan, 2009
2. Hirokazu Nakazawa, Hiroyasu Ishii, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, “A Fused pH and Fluorescence Sensor using a same Sensing Area”, IEEE Sensors 2009, B3L-A, Christchurch, New Zealand, 2009
3. S. Takenaga, S. R. Lee, M. M. Rahman, H. Takao, M. Ishida, and K. Sawada, “TWO-DIMENSIONAL LABEL-FREE ACETYLCHOLINE IMAGE SENSOR FOR IMAGING NEURONAL COMMUNICATION”, The 15th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS2009), T3P. 0 24, pp. 975-978, Denver America 2009
4. Shoko Takenaga, Yui Tamai, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, “Highly Sensitive Charge Transfer Type Hydrogen Ion Image Sensor by Charge Accumulation Technique”, 5th Asia-Pacific Conference on

Transducers and Micro-Nano Technology, Perth, Western Australia, 2010.7.6~9

5. H. Nakazawa, M. Ishida, and K. Sawada, "REDUCTION OF INTERFERENCE BETWEEN pH AND OPTICAL OUTPUT SIGNAL IN A MULTIMODAL BIO-IMAGE SENSOR", IEEE Sensors 2010 Conference, Hawaii, USA, 2010.11.1~4
6. Hirokazu Nakazawa, Keita Yamasaki, Kazuhiro Takahashi, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada, "A FILTER - LESS MULTI - WAVELENGTH FLUORESCENCE DETECTOR" The 15th International Conference on Solid State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS2011), Beijing, China, 2011.6.5-9
7. Hirokazu Nakazawa, Makoto Ishida, and Kazuaki Sawada, "Multimodal Proton and Fluorescence Image Sensor for Bio Applications", 2011 IEEE/IFIP 19th International Conference on VLSI and System-on-Chip, Hong Kong, China, 2011.10.3-5
8. Hiroto Watanabe, Hirokazu Nakazawa, Fumihiro Dasai, Makoto Ishida, and Kazuaki Sawada, "A Simultaneous Multimodal Sensor for Proton and Light Sensing using a Hole and Electron Accumulation Technique", IEEE SENSORS 2011 CONFERENCE, Limerick, Island, 2011.10.28-31
9. K. Yamasaki, H. Nakazawa, N. Misawa, M. Ishida and K. Sawada, "PROPOSAL FOR A FILTERLESS FLUORESCENCE SENSOR FOR SNP GENOTYPING", BIODEVICES 2012 - International Conference on Biomedical Electronics and Devices, Vilamoura, Algarve, Portugal, 2012.2.1-4

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称：化学・物理現象検出装置及び検出方法  
発明者：澤田和明他  
権利者：豊橋技術科学大学  
種類：出願  
番号：2011-176495  
出願年月日：2011年8月12日  
国内外の別：国内

名称：化学・物理現象検出装置及び検出方法  
発明者：澤田和明他  
権利者：豊橋技術科学大学

種類：出願  
番号：2011-155688  
出願年月日：2011年7月14日  
国内外の別：国内

名称：化学・物理現象検出装置及び検出方法  
発明者：澤田和明他  
権利者：豊橋技術科学大学  
種類：出願  
番号：2011-147641  
出願年月日：2011年7月1日  
国内外の別：国内

名称：バイオセンサ、電荷転送型センサおよび測定方法  
発明者：澤田和明他  
権利者：豊橋技術科学大学  
種類：出願  
番号：2009-91521  
出願年月日：2009年4月3日  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 2 件)

名称：化学・物理現象検出装置及び検出方法  
発明者：澤田和明他  
権利者：豊橋技術科学大学  
種類：公開  
番号：特開 2013-15379  
取得年月日：2013年1月24日  
国内外の別：国内

名称：バイオセンサ、電荷転送型センサおよび測定方法  
発明者：澤田和明他  
権利者：豊橋技術科学大学, シャープ  
種類：公開  
番号：特開 2010-243299  
取得年月日：2010年10月28日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等  
<http://int.ee.tut.ac.jp/icg/wp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 和明 (SAWADA KAZUAKI)  
豊橋技術科学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：40235461