

蛍光検出 CMOS イメージセンサを用いた
レンズレス小型デジタル ELISA システムの研究

A Compact Lensless Digital Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)
System Using a CMOS Image Sensor for Fluorescence Detection

博士学位論文

竹原 浩成

2015 年 3 月

奈良先端科学技術大学院大学

物質創成科学研究科

目次

第 1 章	序論	1
1.1	本研究の背景	1
1.2	本研究の目的	4
1.2.1	CMOS イメージセンサの最適化	5
1.2.2	新規構造の吸収フィルタの開発	5
1.2.3	レンズレス小型デジタル ELISA システム	6
1.3	本論文の構成	6
第 2 章	ELISA、デジタル ELISA およびレンズレス蛍光検出システム	7
2.1	はじめに	7
2.2	ELISA の概要	8
2.3	デジタル ELISA 概要	10
2.4	これまでのレンズレス ELISA システム	14
2.4.1	シリコン製ライトガイドアレイ搭載システム	14
2.4.2	ファイバーオプティックプレート搭載システム	18
2.5	考察とまとめ	20
第 3 章	微弱蛍光検出に向けた CMOS イメージセンサ性能の最適化	21
3.1	はじめに	21
3.2	固定パターンノイズの低減	23
3.2.1	設計概要	23
3.2.2	設計パラメータとレイアウトの最適化	25
3.2.3	固定パターンノイズ評価方法	32
3.2.4	固定パターンノイズ評価結果	33
3.3	4T-APS による高感度化	38
3.3.1	設計概要	38
3.3.2	4T-APS 設計とレイアウト	41
3.3.3	出力バッファおよび静電放電 (ESD) 保護回路	45
3.3.4	感度評価方法および結果	47
3.3.5	テンポラリーノイズと検出限界	51
3.4	考察とまとめ	53
第 4 章	蛍光検出のための積層フォトダイオード CMOS イメージセンサ	55
4.1	はじめに	55
4.2	3T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサ	58
4.2.1	設計概要	58
4.2.2	3T-APS 積層フォトダイオード画素レイアウト	60
4.2.3	3T-APS 積層フォトダイオードセンサによる画像取得	62

4.2.4	LED 光源による蛍光観察模擬評価	64
4.3	4T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサ	67
4.3.1	設計概要	67
4.3.2	出力バッファ	68
4.3.3	静電放電 (ESD) 保護回路	72
4.3.4	4T-APS 積層フォトダイオード画素パターンレイアウト	74
4.3.5	4T-APS 積層フォトダイオードセンサによる画像取得	77
4.3.6	LED 光源による評価結果	79
4.3.7	テンポラリーノイズと検出限界	82
4.4	考察とまとめ	86
第 5 章	新規小型デジタル ELISA システムの提案および検証	88
5.1	はじめに	88
5.2	デジタル ELISA における蛍光反応	88
5.3	フルオレセインの蛍光強度	89
5.3.1	イオン化定数の pH 依存性	89
5.3.2	フルオレセインのモル吸光係数と量子収率	92
5.4	デジタル ELISA における励起光、蛍光強度の概算	93
5.4.1	検出目標濃度	93
5.4.2	ランベルトーベールの法則	94
5.5	金属隔壁マイクロピラー吸収フィルタ	96
5.5.1	吸収フィルタ配置時の課題	96
5.5.2	マイクロピラーフィルタを使ったレンズレス ELISA 装置概要	97
5.5.3	マイクロピラー吸収フィルタ透過率計算のモデル	98
5.5.4	反射による減衰	98
5.5.5	吸収フィルタの吸収による減衰	100
5.5.6	マイクロピラー吸収フィルタを透過する蛍光強度の計算	101
5.6	励起光吸収フィルタの検討	105
5.7	光退色現象による励起光強度の制限	107
5.7.1	フルオレセイン水溶液の光退色	107
5.7.2	励起光強度と吸収の速度定数 k_a の関係	109
5.7.3	光退色速度計算 (溶存酸素の光退色への影響)	110
5.8	考察とまとめ	112
第 6 章	吸収フィルタアレイを搭載した小型デジタル ELISA システム	114
6.1	はじめに	114
6.2	反応チャンバー付吸収フィルタアレイ作製プロセス	116
6.3	励起光吸収フィルタ充填ライトパイプアレイの形成	119

6.3.1	金属ライトパイプアレイ	119
6.3.2	マイクロピラー吸収フィルタアレイ	122
6.3.3	蛍光チャンバーアレイ	126
6.4	アライメント機構	129
6.5	考察とまとめ	130
第 7 章	結論	131
7.1	本研究の成果	131
7.2	今後の展開と課題	133
参考文献	135
研究発表目録	145
謝辞	152

第 1 章 序論

1.1 本研究の背景

酵素結合免疫吸着法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)は、抗原-抗体反応を利用し捕獲したターゲットタンパク質 (抗原など) に蛍光物質など検出可能な物質を生成する反応を促進する酵素を結合させ、光学的な観察により定量する方法である。特定の病気に罹った人の血液や体液には、その病気に特有なタンパク質 (バイオマーカー) が微量に含まれているので、ELISA により、それらを検出することで特定の癌やその他の疾病の診断が可能になっている。また、ELISA は疾病の診断のみではなく、食品中のアレルゲンの存在確認や、家庭用の妊娠検査にもその技術が利用されている[1]。

蛍光反応を促進する酵素 (例えば β -galactosidase) を使用した通常の ELISA では、蛍光反応を行うチャンバー容積は μL オーダーであり、ターゲットタンパク質の検出限界濃度は 1 pM 程度である。ELISA の適用範囲を広くするためには、さらに高感度化が望まれており、フェムトリッター (fL) オーダーの蛍光反応チャンバーアレイを用いたデジタル ELISA が提案されている[2]-[5]。Kim らは、デジタル ELISA により $2\text{ aM}(2 \times 10^{-18}\text{ mol/L})$ の PSA (Prostate Specific Antigen、前立腺特異抗原) の検出が可能であることを報告している[6]。実に、通常の ELISA の 100 万倍近い高感度である。デジタル ELISA では最小単位である 1 分子の酵素 (すなわち対応するターゲットタンパク質も 1 分子) しか含まない反応チャンバーの検出が可能になったために達成された感度である。

デジタル ELISA は高感度であるが、 fL チャンバーアレイの蛍光観察には蛍光顕微鏡を使用するため、装置が大きく、高価である。このため患者と直接対峙する臨床現場での検査 (Point of care testing, POCT) には不向きであり、即時診断が困難となっている。著者の研究室では、この点を克服するべく fL チャンバーアレイを CMOS イメージセンサ上に集積化することにより小型化した装置を提案してきている[7]-[9]。これらの装置はレンズのような集光装置を使用しないで (レンズレス)、イメージセンサ表面近傍の様子を直接観察するコンタクトイメージング技術に基づいている。著者の研究室では体内埋植型のコンタクトイメージングデバイス開発が行われており培った技術を活かすことができる[10]-[14]。

一般的に蛍光観察においては、観察対象となる蛍光体の他に (1) 励起光源、(2) 励起光除去フィルタ (3) 蛍光検出器、といった構成要素があるが、コンタクトイメージングにおいても同様の要素が必要となる。本研究では、観察対象

の蛍光体は、デジタル ELISA の fL チャンバーアレイである。

コンタクト蛍光イメージングにおいては、励起光吸収機能は蛍光体と検出器の間に配置することになるため、どのような方式や素材を選ぶかが課題となる。蛍光顕微鏡を使用した通常の蛍光観察では、励起光を狭波長域に抑えるための励起光フィルタと励起光を除去し蛍光成分だけを取り出す蛍光フィルタが使用されている。これらのフィルタには屈折率の異なる薄膜を多層に重ねて作製される干渉フィルタが使用されている。干渉フィルタは所望の波長域をシャープに取り出すのに優れているが、その性能は垂直入射光にのみ有効で、入射角が傾くと透過波長がずれるという欠点がある。蛍光顕微鏡のようにレンズで集光する場合は、垂直入射にできるが、コンタクト蛍光イメージングにおいては、被写体による屈折や反射成分があり入射角度制御が困難となる。また高性能の干渉フィルタは、多層数が多く、その厚さも被写体とセンサの距離を広げる要因になり空間解像度の高い画像取得が困難になる。コンタクトイメージングにおいて干渉フィルタを使用して十分な性能を求める場合、ライトガイド[7]や吸収フィルタ[15]との組み合わせが必要となる。

超小型の統合分析装置、いわゆる μ -TAS (micro-Total-Analysis-System) や Lab-on-chip の分野で蛍光検出が求められることがあり、さまざまなフィルタが検討されている[16]。干渉フィルタの他、特定の波長を吸収する染料や硫化カドミウム (CdS) を使った吸収フィルタが使われている。染料を使った吸収フィルタは母材として樹脂[17],[18]や液体と混合して使用されるが、染料と母材を選別することで、様々な用途、波長域に対応することができる。

蛍光検出器としては CMOS イメージセンサを使用する。その画素面積は、fL チャンバーの面積と拮抗する大きさである。個々の fL チャンバーの蛍光、非蛍光を判別する際に最適な結果を得るために CMOS イメージセンサの機能、性能をカスタマイズすることが望ましい。CMOS イメージセンサは、CMOS イメージセンサ専用の製造プロセスだけでなく、標準的な CMOS 製造プロセスによってさえも作製が可能である。そして、これらの製造プロセスはシリコンファンダリとして商業化されているものなので、設計データを自ら作成することで必要な性能を持つセンサを作製することが可能である。

ここから、デジタル ELISA やそれ以外にも様々な手法によるウイルスやバイオマーカーの微量分析が研究されているので幾つかを紹介していく。

最も精力的に開発が進められている分野の一つが HIV (Human Immunodeficiency Virus, ヒト免疫不全ウイルス) /AIDS (Acquired Immuno-Deficiency Syndrome, 後天性免疫不全症候群) に関わるものである。AIDS 発症の原因となる HIV 感染は、現在では即日の結果が得られる迅速検査法によるス

クリーニング検査（確認検査は必要）も可能であるが、HIV に感染後、検査が陽性になるまでに平均 20 日必要であるといわれている[19]。ELISA によって HIV-1 感染直後に検知するためには、HIV-1 p24 抗原を通常の ELISA では検知できない低濃度（50 aM から 15 fM の範囲）で検知する能力が必要であると考えられている[5], [20]。

ELISA の高感度化のために ELISA と PCR を組み合わせた Immuno-Polymerase Chain Reaction (IPCR) が考案されている[20]。また、HIV-1 p24 抗原については、ナノ粒子を使用したバイオバーコード増幅法で 0.1 pg/mL (4.2 fM) を検出した例もある[21]。

HIV/AIDS の診断方法は、UNITAID が定期的にレポートしている[22], [23]。この中には、HIV 感染に関わる CD4⁺ T リンパ球のカウントや RNA の定量などで診断するための装置（市販品および開発品）がまとめられている。専門の施設に置かれる大規模な設備だけでなく、POCT 用の装置が切望されており、すでに数種の POCT 装置が市販されている。また、ハンディタイプのものも近いことが示されている。

CD4⁺ T リンパ球の定量には、コンタクトイメージング技術が使用されている例がある。CCD イメージャチップ上に、アンチ CD4 抗体を固定化した透明のマイクロ流路で CD4⁺ T リンパ球をトラップしてリンパ球の影の映像からカウントしている[24], [25]。

初期がんの検出やがん治療中の経過観察には腫瘍マーカーの定量が行われる。この定量で使用される代表的な方法が ELISA である。現在は、検出限界や個人差等の課題があり、腫瘍マーカー検査だけでは最終的判断をすることが困難といわれている。そのため、様々な技術が検討されている。先にも紹介した前立腺がんの特異な抗原である PSA では特に多くの研究が行われている。

前立腺摘出手術を受けた患者の PSA 濃度の変化をモニターできれば、再発を確認できることが期待される。PSA を産出する臓器を失った患者は、その絶対的な濃度が低い。定量下限濃度 (LoQ) が 100 pg/mL (3 pM) 程度の通常の ELISA や、10 pg/mL (300 aM) 程度の第 3 世代 ELISA では、正確な PSA 濃度変化を見極めることが困難であったが、1 分子検出可能な SiMoA (Single-Molecule Arrays) と名づけられたデジタル ELISA では、LoQ が 0.035 pg/mL (1 fM) であり、変化の推移を確認できると報告されている[26]。

PSA においては、ジルコニア-ナノ粒子を蛍光プローブとして 0.4 ng/mL を検出した例[27]や、ユーロピウム-ナノ粒子を使って 0.83 pg/mL を検出した例[28]がある。金ナノ粒子で表面増強ラマン散乱を利用して 1 pg/mL が検出できている[29]。DNA をラベルする方法も研究されており、ELISA と同様な反応を利用した immuno-PCR では、0.2 pg/mL が[30]、バイオバーコードアッセイでは、1-10

fg/mL が達成されている[31]。その他の PSA 検出法も D. A. Healy らによりまとめられている[32]。

1.2 本研究の目的

本研究は、小型デジタル ELISA に必要な各要素において、新規構造の提案や最適化を行い、実用的な検査時間で診断できる能力を備えたシステムを作り上げることを目的とする。

世界保健機関 (World Health Organization, WHO) は、理想的な Point-of-care (POC) 診断用ツールの性能について、求められる性能の頭文字をとった「ASSURED」というガイドラインを示している[33]。また、それぞれの項目には、Mabey ら[34]や、McPartlin ら[35]によって分かりやすい解釈が加えられているのでこれらを参考にまとめてみる。

- A: Affordable. 製造コストが低いこと。安価な試薬が使えて、使い捨てができること。小型化により試薬の使用量を低減することも有効である。
- S: Sensitive. 統計的に高感度を示すこと。偽陰性が少ないこと。
- S: Specific. 統計的に高特異度を示すこと。偽陽性が少ないこと。
- U: User-friendly. 最小限の手順、付加ステップで簡単に使えること。最小限の訓練で使えること。
- R: Rapid and robust. 短時間で結果が得られ、治療結果や患者の利便性が改善されること。冷蔵保存が不要であること。
- E: Equipment-free. 前処理無しのサンプルをその場で使用できること。専門施設での検査が不要であること。
- D: Delivered. 必要な場所に持っていけること。よく訓練された人がいない場所、高品質の水や電気が乏しい場所、高温多湿の場所でも使用できること。

「ASSURED」は、発展途上国における性感染症の診断を念頭に作られたものであるが、その内容は、あらゆる国々における様々な診断システムを小規模な医療機関や家庭への普及する際にも当てはまるものと考えられる。

本研究のシステムも、このようなコンセプトを希求するものである。ELISA は非常に広く普及しているため、デジタル ELISA においても一般的で入手しやすい試薬を使用することができる。特殊な材料や検出設備を必要としないことは、「ASSURED」の達成にあたって利点となる。

1.2.1 CMOS イメージセンサの最適化

レンズレス小型デジタル ELISA システムでは、発せられた蛍光を高効率で受けるために、蛍光反応チャンバーと蛍光検出器の距離をなるべく離さないように励起光除去フィルタを挿入する必要がある。このような制約の中では、励起光は完全に除去することは困難なので、ある程度の励起光の漏れは考慮しておかなければならない。また、1つの fL チャンバーの中では、わずか1分子の酵素が蛍光物質の生成を促進しているだけなので、蛍光強度も微弱である。励起光強度の漏れを想定した場合、励起光強度が変化した場合に蛍光が発生したと誤検出する可能性がある。

励起光源の発光強度が変化した場合は、すべての画素出力が同時に変化するので変化量の違う画素を見つけることで正しい検出ができる。このような検出を行う場合、画素毎の特性にバラツキがあると検出が困難となる。

そこで、まず画素間の特性バラツキを小さくすることを行った。すなわち、CMOS イメージセンサでは、固定パターンノイズ (Fixed pattern noise, FPN) と呼ばれるノイズの低減を試みた。

CMOS イメージセンサでは、画素内のトランジスタで受光量によって変化するフォトダイオードの電位を読み取るアクティブ・ピクセル・センサ (APS) 方式が主流であるが、使用されるトランジスタ特性のバラツキが出力に影響して FPN となる。現在の最先端の CMOS イメージセンサは画素サイズが $1 \mu\text{m}^2$ 以下であるが[36]、デジタル ELISA への適用では微細化よりフォトダイオード占有面積を大きくすることが有効であるので、画素サイズは比較的大きい。この画素サイズの大きさを活かした画素や周辺回路のレイアウト設計の最適化によって改善する方法を採った。

さらに、CMOS イメージセンサ、あるいは画素自体に励起光と蛍光を識別する能力があれば、誤検出を回避できる。そこで、シリコン中への光の侵入長が入射光の波長に依存するという性質を利用して波長識別ができる CMOS イメージセンサを開発した。

1.2.2 新規構造の吸収フィルタの開発

これまで提案されたレンズレス小型デジタル ELISA システム (詳細は第2章) は、蛍光源である fL チャンバーから、蛍光検出器である CMOS イメージセンサまでの距離が遠いため受光部に到達する蛍光強度が弱いという問題があった。

この問題を解決するために、蛍光を集光し高効率に受光部に届けるライトパイプ構造の励起光吸収フィルタを考案した。この構造について、特性を理論計算によって検証するとともに、実際に作製するための製造プロセスを開発した。

1.2.3 レンズレス小型デジタル ELISA システム

作製した各要素部品を組み合わせるためのシステムを考案し、プロトタイプを作製した。

1.3 本論文の構成

以下に本論文の構成を示す。

第 2 章では、まず、ELISA の反応および処理手順について説明し、1 分子計測のできるデジタル ELISA の開発動向や特徴について解説する。さらに、これまでに提案されたレンズレス小型デジタル ELISA の概要を説明し、解決すべき課題を明確にする。

第 3 章では、CMOS イメージセンサの基本的な性能の改善について 2 点を述べる。ひとつは、固定パターンノイズ (FPN) の低減について、もうひとつは、感度向上についてである。それぞれ、改善、最適化のために実施した内容の説明と得られた特性について検証する。

第 4 章では、励起光と蛍光を識別することができる積層フォトダイオードを用いた CMOS イメージセンサについて設計内容と特性評価結果を報告する。積層フォトダイオード CMOS イメージセンサは、2 つの製造プロセスで作製している。第 1 回目は、波長識別の機能確認を行った。また、第 2 回目の作製では画素回路の変更で高感度化を行っており、同時に低ノイズ化も達成している。

第 5 章では、レンズレス小型デジタル ELISA システムにおける蛍光検出について、代表的な蛍光物質であるフルオレセインを題材として、励起光と蛍光の強度の関係や、受光部への蛍光到達量について考察する。また、考案した新構造の励起光吸収フィルタの特性をシミュレーションによって予測する。さらに光退色の観測への影響についても言及する。

第 6 章では、第 5 章で提示した装置を作製するための全体プロセスフローを提示した後、要素工程毎に作製方法を解説する。

最後に、第 7 章では、各章の総括を行い、残された課題について議論し、今後の展開について述べる。

第 2 章 ELISA、デジタル ELISA およびレンズレス蛍光検出システム

2.1 はじめに

酵素結合免疫吸着法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)では、ターゲットタンパク質の検出のために、一連の抗原-抗体反応および蛍光または発色物質を生成するための反応が行われた後、光学的観察が行われる。本研究では、蛍光検出を行う ELISA 法を開発ターゲットにしているので、これを中心に説明していく。

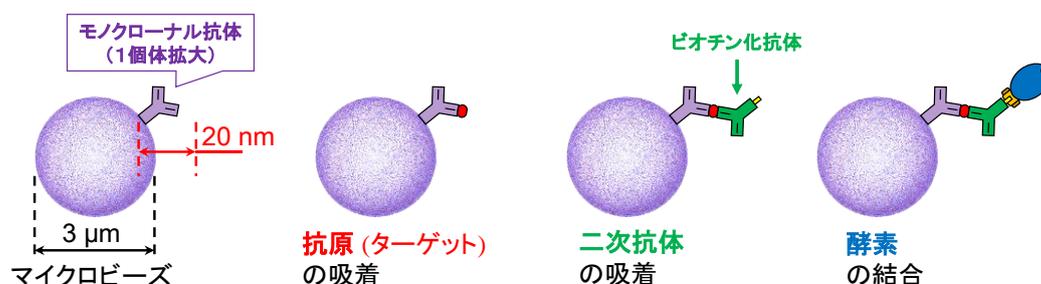
ELISA は、抗原-抗体反応という特異性の高い生化学的反応の特徴を活かして、目的のタンパク質だけを捕獲することと、酵素による蛍光反応促進で高感度化するという特徴を持った分析法である。ELISA には Direct ELISA, Indirect ELISA, Competitive ELISA, Sandwich ELISA といった反応の手法の異なるいくつかの種類がある本章では、最初に、代表例としてマイクロビーズを使ったサンドウィッチ ELISA 法について解説する。

次に、デジタル ELISA のコンセプトを概説する。さらに、デジタル ELISA では、微小反応チャンバーアレイで反応を行うが、その微小反応チャンバーの作製方法や、調整方法、観察方法に関して、種々の提案がなされているので、それらを紹介する。

最後に、これまでに著者の研究室から提案されたレンズレス小型デジタル ELISA 装置を紹介し、それらの課題について述べる。

2.2 ELISA の概要

ここでは、デジタル ELISA でも使用されるマイクロビーズを使った ELISA の一連の反応について図 2-1 にしたがって説明していく。



▶ ビーズに結合した酵素が蛍光基質中で蛍光物質を生成を促進する

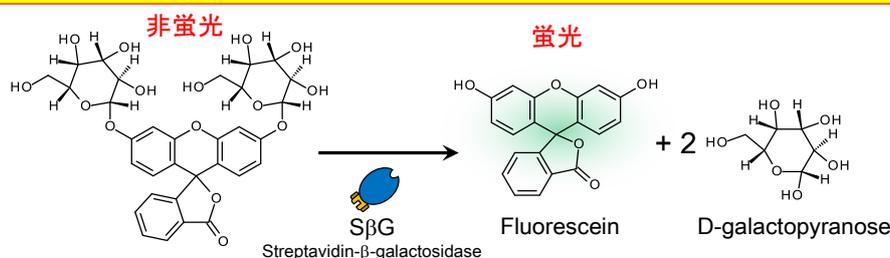


図 2-1 ELISA における代表的な一連の抗原-抗体反応と蛍光反応

マイクロビーズはポリスチレン製の球体で、表面にはターゲットタンパク質に特異的に反応（結合）するモノクローナル抗体が全面に共有結合されている。マイクロビーズの直径は 3 μm 程度のものが使用される。このマイクロビーズに固定化されたモノクローナル抗体は、まずターゲットタンパク質（抗原等）を捕獲する。次に捕獲された抗原に特異的に結合する二次抗体を反応させ、さらにその二次抗体と酵素が特異的に結合される。二次抗体には、ストレプトアビジンを付加した酵素に結合しやすいようにビオチン化されたものが使用される。

図 2-1 上段の一連の反応手順については、Chang らの論文[37]に PSA (Prostate-Specific Antigen, 前立腺特異抗原) をターゲットタンパク質とした場合の詳細が紹介されていたので、引用する。

- ①モノクローナル抗体を表面に結合した直径 2.5 μm のビーズを用意
- ②PBS (Phosphate Buffered Saline, リン酸緩衝生理食塩水) で 1/4 希釈した血漿 (plasma) に少量の PSA を混合した溶液 100 μL を、96 ウェルのプ

レート中で、500,000 個のビーズと混合して培養する。

(ターゲットタンパク質 (PSA) の捕獲)

③ビーズ洗浄

PBS で 5 回、さらに 0.1%-Tween20 で、3 回洗浄

④ビーズを 100 μ L のビオチン化したポリクローナル検出抗体で培養

⑤ビーズ洗浄

PBS で 5 回、さらに 0.1%-Tween20 で、3 回洗浄

⑥100 μ L のストレプトアビジン- β -ガラクトシダーゼ (S β G) で培養

⑦ビーズ洗浄

5 \times PBS+0.1%-Tween20 で、8 回洗浄

※培養時間、試薬の濃度は必要に応じて変化させる

⑧ビーズを 25 μ L の PBS で再懸濁する

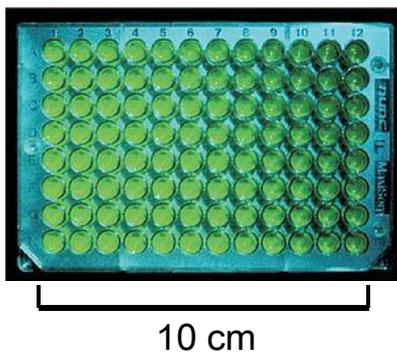
この後、図 2-1 下段の蛍光反応に移る。(上記、手順の例では蛍光基質には RGP (resorufin- β -D-galactopyranoside) が使用されていたが、図 2-1 では FDG (fluorescein fi- β -D-galactopyranoside) を使用したものを例示している)

通常の ELISA では、蛍光反応は、手のひらサイズの 96 個のウェルが並んだマイクロプレートのウェル中で行われる。蛍光基質として FDG (を使用した場合、酵素 (streptavidin- β -galactosidase、S β G) が触媒となり非蛍光の FDG が加水分解され、蛍光物質であるフルオレセイン (fluorescein) を生成する[38]。この反応は、ほぼ等速度で進むので、フルオレセインは時間とともに増加していく。すなわち蛍光強度が上がっていく。

通常の ELISA では、一定時間の蛍光反応の後、反応停止剤を加えて蛍光物質の生成を止めて、専用のマイクロプレートリーダー装置で蛍光強度を測定し、ターゲットタンパク質の濃度を算出する。

通常のELISA

(96ウェル マイクロプレート)



デジタルELISA

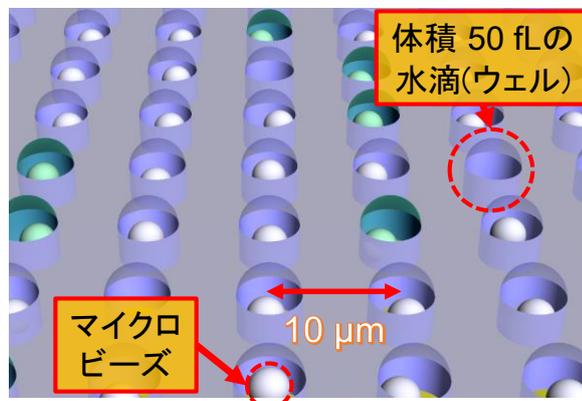
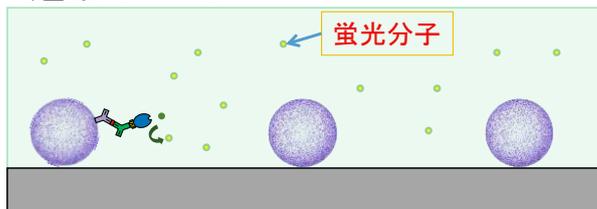


図 2-2 通常 ELISA とデジタル ELISA 反応チャンバーの比較

2.3 デジタル ELISA 概要

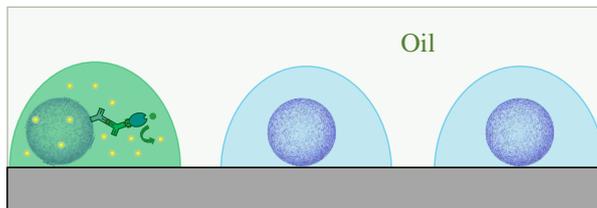
デジタル ELISA では、通常の ELISA と違い蛍光反応を容積がフェムトリッター (fL) オーダーの多数の微小反応チャンバーで実施するのが特徴である。前ページの図 2-2 には、蛍光反応チャンバーのサイズの違いを示した。チャンバーサイズの違いは、蛍光強度に影響をおよぼす。図 2-3 にその様子を示した (デジタル ELISA におけるチャンバーサイズは、マイクロビーズが 1 個だけ入り込めるサイズに設定されている)。酵素の数が少ない場合、チャンバーサイズが大きいと生成された蛍光物質は、希釈されて検出が困難となる (酵素が無くても自然に加水分解されるものもわずかながら存在するため弱い蛍光では、区別することが困難な場合も考えられる[38])。これに対してデジタル ELISA の fL チャンバーでは、蛍光物質が広く拡散することが無く、狭い空間で濃縮されるため蛍光を

▶ 通常の ELISA



- ◆ チャンバーサイズ: μL (10^{-6}L)
- ◆ 蛍光物質が希釈される
低濃度酵素の観察が困難
- ◆ 検出限界: 1 pM ($1 \times 10^{-12}\text{ mol/L}$)

▶ デジタル ELISA



- ◆ チャンバーサイズ: fL (10^{-15}L)
- ◆ デジタルカウント
酵素 1 分子の存在を検出可能
- ◆ 検出限界: 2 aM ($2 \times 10^{-18}\text{ mol/L}$)

図 2-3 ELISA とデジタル ELISA 蛍光検出感度の違い説明図

検出しやすくなっている。そのレベルは、最小単位である 1 分子の酵素による蛍光物質の検出ができるほどである。

通常の ELISA においては、濃度推定は蛍光強度から算出する。一方、デジタル ELISA においては、特にターゲットタンパク質が低濃度の場合、酵素がチャンバー内に存在するか否かという状態になっているので、マイクロビーズを取り込んでいるチャンバー数と蛍光するチャンバー

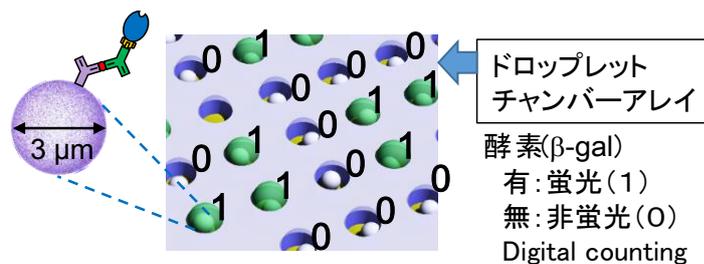


図 2-4 デジタル ELISA におけるデジタル計数説明図

の数をカウントし、その割合から濃度を推定することができる (図 2-4)。

デジタル ELISA で使われる微小反応チャンバーは FDG のような蛍光基質の水溶液で形成される水滴 (ドロップレット) のようなものである。このようなドロップレットは大気中では、すぐに気化して干上がってしまう。それを克服したドロップレット作製の技術について紹介していく。

シリコン鋳型による PDMS チャンバー作製法

1 つ目のドロップレット作製方法は、SOI (silicon on insulator) 基板で作製したパターンを鋳型として PDMS (poly-dimethylsiloxane) で微小チャンバーアレイを作製するものである[2]。この方法は、2005 年に Rondelez、野地らによって発表されたものである。

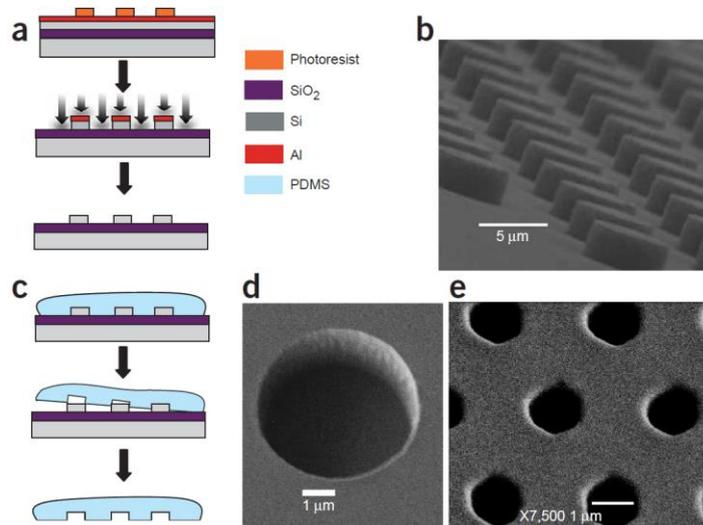


図 2-5 PDMS を使った微小チャンバー[2]

(a),(b) 鋳型作製フローと SEM 像, (c),(d),(e) PDMS 作製フローと SEM 像

使用される PDMS は 2 液を混合することで硬化する透明なシリコン樹脂である。鋳型形状に忠実なパターン形成ができるのが特徴で、硬化した PDMS は、滑らかな表面に密着しやすい。また、親水性の分子との親和性が高くないため、その表面は生体分子に対して保護される状態になる。そのため、代表的な PDMS である Sylgard 184 (Dow Corning Corporation) などが、バイオコンパチブルな材料として生化学分野で非常に頻繁に使用されている[39]。

図 2-5 のようなプロセスによって出来上がった PDMS シートをサンプル溶液が乗った清浄なガラス基板に押し付けることにより密着させチャンバー間を分離させることができる。この方法で作ったチャンバーで酵素による蛍光反応が行われ、チャンバー毎の蛍光強度の分布が求められた。得られた分布がポアソン分布にしたがっていることから微小チャンバー内での酵素 1 分子の反応が検知

できることが認められた。

これと同様の手法を使って、さらに ELISA の抗原-抗体反応から全てを行った後、PDMS を押し付けたアッセイが Wang らによって実施されている [40]。ここでは、蛍光反応に先立って行う必要のある一連の抗原-抗体反応もマイクロ流路技術を使ったチャンバー内で行うことが可能となっている。その結果、96 ウェルのマイクロプレートを使った通常の ELISA の全工程時間（1 晩+6.5 時間）を 125 分にまで減らすことができ、IGF-1R(Insulin-like Growth Factor1 Receptor)検出感度 3.5 fg/mL (21.8 aM) が達成されている（市販の ELISA キットより 5 桁の高感度化）。

光ファイバーバンドルを使った微小チャンバー作製法

2006 年に Rissin らが発表した方法 [4] で、直径 4.5 μm の光ファイバーを束（バンドル）にしたもので微小チャンバーを作製する方法である。光ファイバーのコアとクラッド層のエッチング速度が違うことを利用し微小な孔を掘っている。この孔を反応チャンバーアレイとして使っており、シリコン樹脂に押し付けることでチャンバーの分離を行っている。個々のチャンバーが 1 本の光ファイバーの片端に形成されている状態なので、微小チャンバーで発生した蛍光を光ファイバーの反対端から蛍光顕微鏡によって観察することが可能になっている。同じ研究グループは、2010 年、同様の装置を使って、微小チャンバーにマイクロビーズを酵素の固定化のために使用したデジタル ELISA の発表を行っている [5]。さらに 2011 年には、デジタル計測とアナログ強度測定を組み合わせた測定濃度範囲の広い装置の発表も行っている [41]。

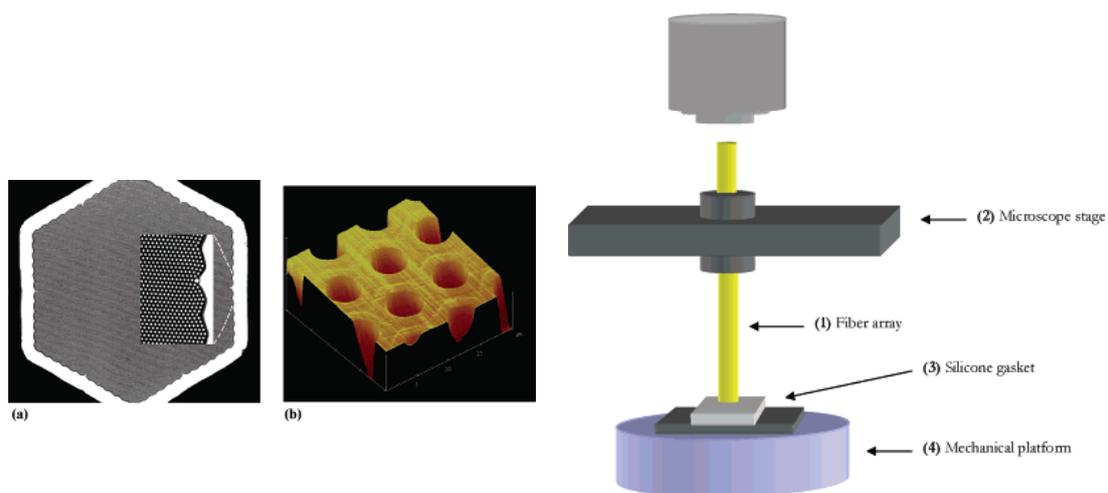


図 2-6 光ファイバーバンドルによる微小チャンバーの作製 [4]

- (a) 微小チャンバーアレイの作製された光ファイバーバンドル端面写真
- (b) 微小チャンバーアレイの AFM 像、(右側) 察装置（下側にチャンバアレイ）

ドロップレットによる微小チャンバー作製法

2010 年に榊原、野地らによって発表された方法[3]で、ここまでに紹介した方法がチャンバー間分離を固相で実施していたのに対し、液相で分離しているのが特徴である。疎水性表面に親水性部分を作製しそこに蛍光基質水溶液のドロップレットを形成しようとするもので、親水性のガラス基板の上に疎水性のアモルファスフッ素樹脂 CYTOP (Asahi glass Co., Ltd.) をコーティングした後、フォ

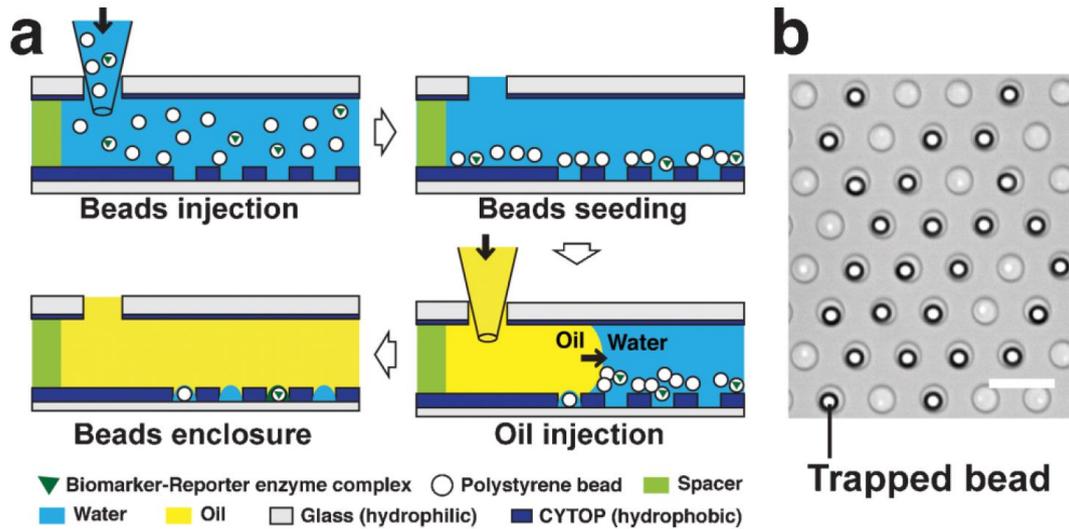


図 2-7 親水性と疎水性を利用したドロップレット作製[6]

(a) ドロップレット作製手順、(b) 作製後の顕微鏡写真

トリソグラフィとドライエッチングによって、パターン形成して作製されている。この方法を使って、2011 年にはマイクロビーズを使ったデジタル ELISA への適用が報告されている[6], [42]。ドロップレットの形成方法は、まず、蛍光基質水溶液で作製した CYTOP パターンを満たし、それをオイル（フッ素系不活性液体）フロリナート FC-40 (3M Co., Ltd.) で置換することで親水性部分にドロップレットが残る。図 2-7 にマイクロビーズのチャージも含めたドロップレット作製の方法を示した。

本研究のレンズレス小型デジタル ELISA システムでは、このドロップレット作製方法を踏襲している。

デジタル ELISA 用のドロップレット作製方法については、DVD (光ディスクメディア) 製造技術を応用した自動化[43]や EWOD (Electrowetting-on-dielectric) 技術[44]–[47]を使ったマイクロビーズ充填率向上の取り組み[48]もなされている。

2.4 これまでのレンズレス ELISA システム

前ページの図 2-7 で紹介したデジタル ELISA システムにおける実際のドロップレット作製の様子を図 2-8 に示した[6]。この写真で分かるように、蛍光反応チャンバーアレイは非常にコンパクトである。しかしながら、蛍光観察には蛍光

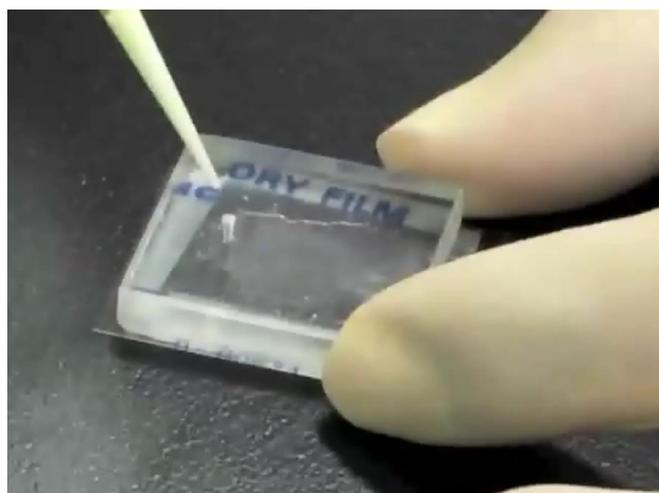


図 2-8 デジタル ELISA ドロップレット調整の様子[6]

顕微鏡が用いられているので、全体のシステムとしては大きなものになっている。著者の研究室では、蛍光顕微鏡の機能を CMOS イメージセンサで置き換えることで小型化を図ってきた。ここで、これまでに提案された小型システムを紹介する。

2.4.1 シリコン製ライトガイドアレイ搭載システム

蛍光源としてのドロップレット反応チャンバーアレイに、励起光吸収フィルタと、蛍光検出器としての CMOS イメージセンサを集積化することで小型化を達成している。それぞれの機能を、どのような形状や機能で作製していくかによって、それぞれに特徴のあるシステムができあがる。

最初に紹介するのは、シリコンで作製したライトガイドアレイ (Light guide array, LGA) を利用したシステムである。LGA 構造は、コンタクトバイオイメージングのために開発されたものである[13]。コンタクトイメージングにおいては被写体がイメージャから離れるとボケた画像になりやすいが、それを改善するために、直進光のみを CMOS イメージセンサの画素に取り込もうとしたものである。LGA 構造の電子顕微鏡 (SEM) 像を図 2-9 に示す。LGA は、シリコン基板に CMOS イメージセンサの画素アレイに対応した円形の垂直貫通孔アレイを

形成したものである。高アスペクト比のシリコン貫通孔は D-RIE (deep reactive

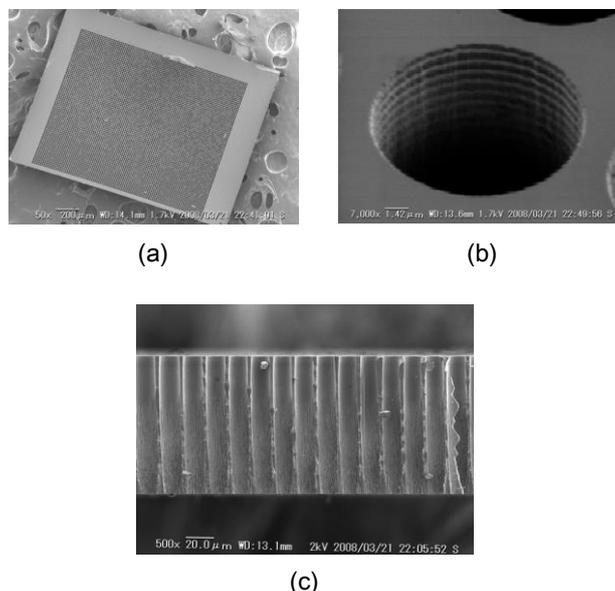


図 2-9 シリコン貫通孔型ライトガイドアレイ (LGA) の SEM 像[13]
 (a) LGA プレート、(b) 孔部拡大、(c) LGA プレート断面

ion etching) 装置を使用して作製されている。

LGA は、直進光を選択的に通す特性があるので、CMOS イメージセンサ表面に貼り付けることによって、距離の離れた被写体であっても空間分解能の高い画像が得ることができる (図 2-10)。

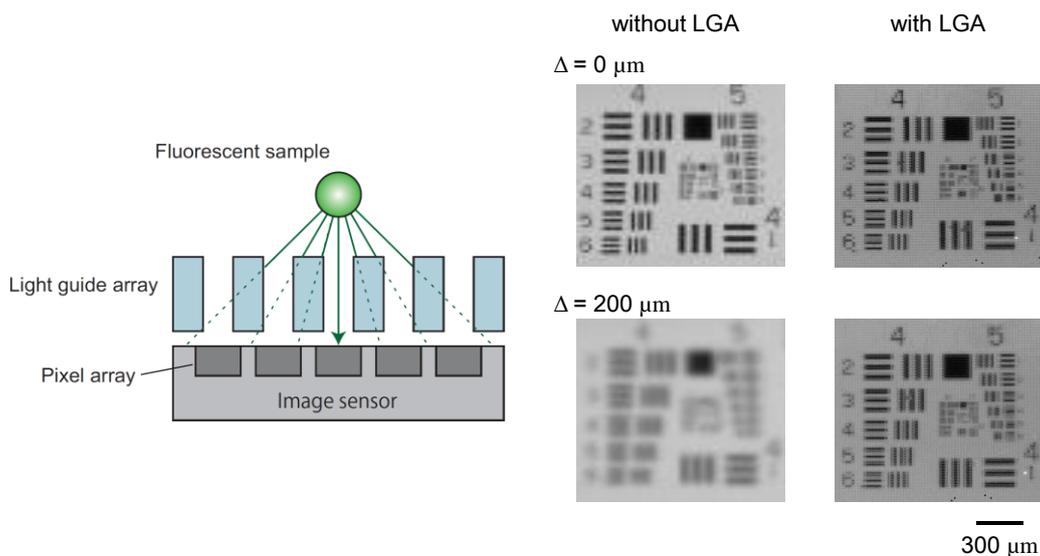


図 2-10 LGA による解像度向上原理図と撮像結果 (Δ は被写体と LGA の距離) [13]

デジタル ELISA への適用に当たって、このような特性を持つ LGA を干渉フィルタと組み合わせることによって励起光を除去しようとしたのが、ここで紹介するシステムである。

多層膜によって作られた干渉フィルタの透過波長は垂直入射光に対して最適化されている。図 2-12 には、一般的な干渉フィルタ透過光の入射角依存性を示

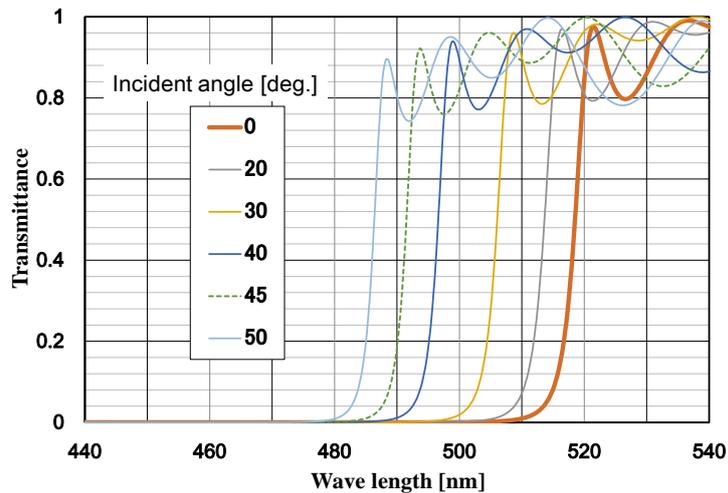


図 2-12 一般的な干渉フィルタの光の入射角依存性 (シミュレーション)

した。なお、この図は参考文献[49]に示された 35 層膜フィルタを真似た構成のフィルタの特性を RCWA 法による回折光学素子設計・解析ソフトウェア DiffractMOD (RSOFT) でシミュレーションしたものである。入射角 45°で垂直入射時に比べて、透過波長が 30 nm 程度短波長側にシフトしているのが分かる。マイクロビーズを使ったデジタル ELISA においては、装置自体の反射や屈折によってフィルタへの入射角が変化するような状況が考えられるため、干渉フィ

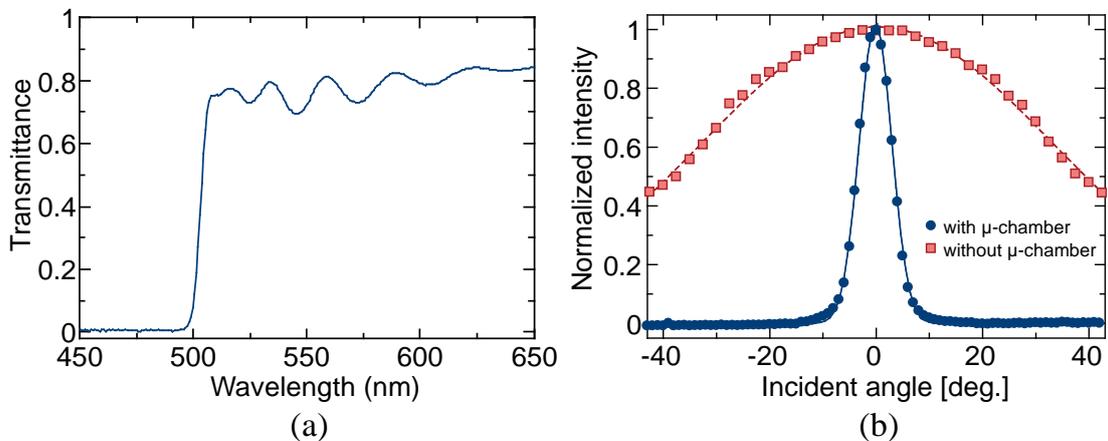


図 2-11 (a)使用した干渉フィルタの特性 (垂直入射)、(b) LGA 透過光の入射角依存性[7]

ルタだけでは遮蔽しようとした励起光が透過してしまう可能性がある。

そこで、LGA を使って垂直光だけを干渉フィルタに導くような構造が考えられた。LGA の透過光強度の入射角度依存性は、図 2-11(b)に示したように、垂直入射光を選択的に透過する。一方、干渉フィルタは図 2-11(a)のような特性をもっている。これらを組み合わせると LGA を透過した垂直入射成分が干渉フィルタを通過する構造の作製が可能で、励起光が効果的に除去できると考えられる [7], [50]。この考えを基にして、図 2-13 のようなデジタル ELISA 用システムが考案された。ここでは、LGA の開口部において、ドロップレットを形成し蛍光反応チャンバーアレイとして使用することも提案されている。なお、図 2-13 では、LGA、干渉フィルタおよび CMOS イメージセンサが離れて描かれているが、実際にはこれら 3 つの要素は密着した構造となっている。

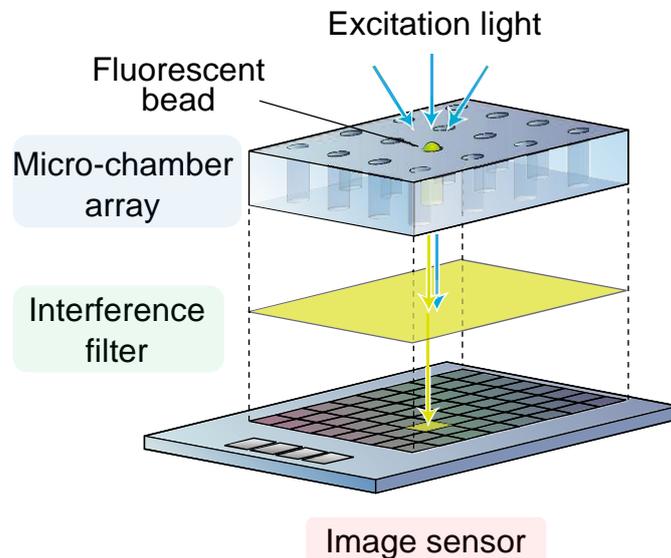


図 2-13 LGA、干渉フィルタで構成した小型デジタル ELISA システム[7]

この構造のシステムでは、実際にドロップレットが形成され、酵素アッセイまで実施されているので、その結果を示す[51]。実験は、実際のデジタル ELISA に

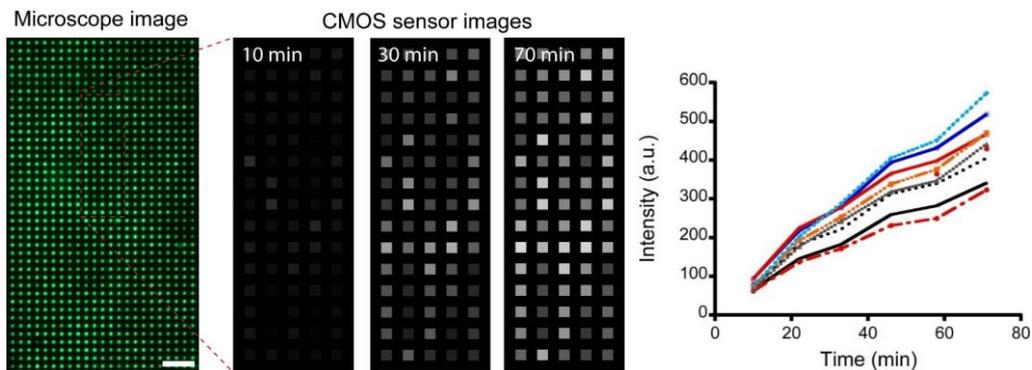


図 2-14 LGA 型デジタル ELISA による酵素アッセイ観察結果[51]

よる検査における蛍光反応の部分だけを模擬的に実施したもので、蛍光基質として fluorescein di- β -D-galactopyranoside (FDG) の水溶液を用い、その中に酵素として β -galactosidase (β -gal) を所定の濃度で混入して蛍光反応を進め、蛍光物質としてフルオレセインを生成するという系で行われた。図 2-14 には、蛍光顕微鏡による観察結果と、 β -gal 濃度を 10 nM とした時の CMOS イメージセンサで得られた画像の経時変化を示した。10 nM は、各ドロップレットの体積を 50 fL と仮定すると 1 つのドロップレット当たり酵素が約 300 個存在する濃度である。蛍光顕微鏡像からは、ドロップレットが LGA 上に分離して形成されていることが分かる。また、CMOS イメージセンサの画素値が時間とともに上昇していることから、ドロップレット中で進行する蛍光反応の様子がモニターできていることが分かる。

フルオレセイン水溶液を使った別の実験では、フルオレセイン濃度が 50 μ M 以上で検出可能という結果が出ている。デジタル ELISA ではドロップレット中に 1 分子しか酵素がない場合でも検知するのが目標である。実用的には、30 分程度の蛍光反応時間で検出できるのが望ましく、1 分子の酵素が 1 つのドロップレット中、30 分間で生成するフルオレセイン濃度は約 1 μ M 程度であるので、約 50 倍の感度向上が必要である。

このシステムでは、いくつかの課題が挙げられる。ドロップレットの作製には成功しているものの、蛍光顕微鏡像でも見られるような蛍光強度ムラがある。これはドロップレットの深さ方向のサイズが制御できないことが大きな要因であると考えられる。また、シリコンによる LGA は、蛍光もかなり吸収してしまうため CMOS イメージセンサに届く蛍光が弱くなっていると考えられる。感度向上のためには、このような点を改善あるいは変更していく必要がある。

2.4.2 ファイバーオプティックプレート搭載システム

このファイバーオプティックプレート (FOP) を使用したシステムでは、蛍光体としては、図 2-8 に示したような通常のドロップレット型デジタル ELISA の蛍光反応チャンバーアレイを使用する。励起光除去は、①蛍光反応チャンバーアレイの基板であるガラスと空気の屈折率の差を利用した全反射と、②染料をドープした接着剤による吸収の組み合わせで行う。蛍光観察は CMOS イメージセンサで行うが、LGA を使用したシステムと異なるのは、チャンバーと画素が 1 対 1 で対応しておらず、1 つのチャンバーから発せられる蛍光を複数の画素で受光することになることである。したがって CMOS イメージセンサが受ける画像はボケた画像になるため、空間解像度を上げるために、画像処理技術 (デコンボリューション) による高解像度化が必要となる [8], [52]。

図 2-15 にシステムの概念図と実際に組み立てられた装置の写真を示した。FOP は、CMOS イメージセンサチップの패드から出るワイヤーを避け、蛍光反応チャンバーアレイを配置するスペースを設ける役割を果たしながら、この部分では、蛍光の広がりを抑えることができるので、蛍光体から検出器までの距離を実質的に抑える役割も果たしている。プリズムを使用することでガラスと

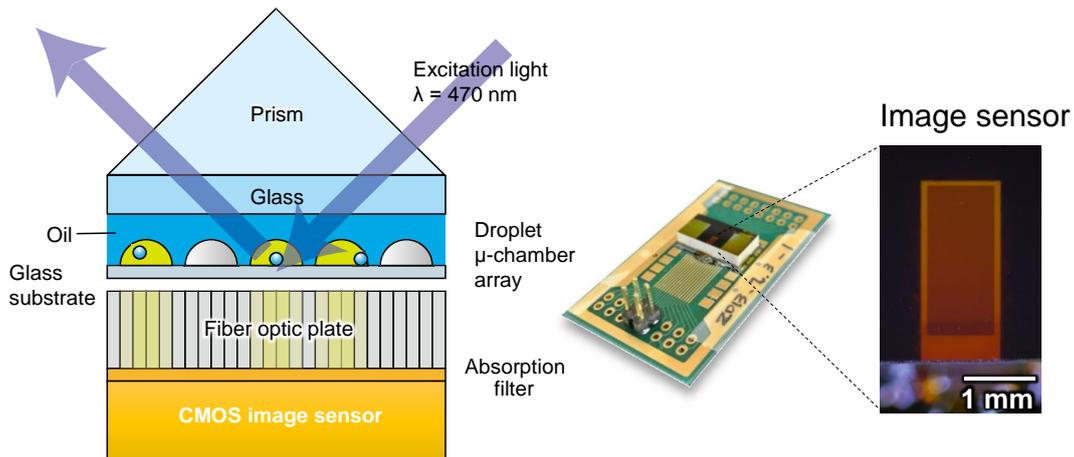


図 2-15 FOP を使った小型 ELISA システム模式図と作製デバイスの写真[8]

空気の界面で全反射する角度を作り出すことができるため大部分の励起光を反射によって除去できる。ドロプレットやマイクロビーズで乱反射する励起光は CMOS イメージセンサ方向に抜けていくので、その成分を吸収フィルタで取り除いている。

図 2-16 には、模擬的に蛍光ビーズを使用して行った蛍光観察の様子と、CMOS イメージセンサ像（画像処理前後）、および対応する蛍光顕微鏡像を示した。画像処理によって蛍光顕微鏡像に近い画像が得られている。この結果から、

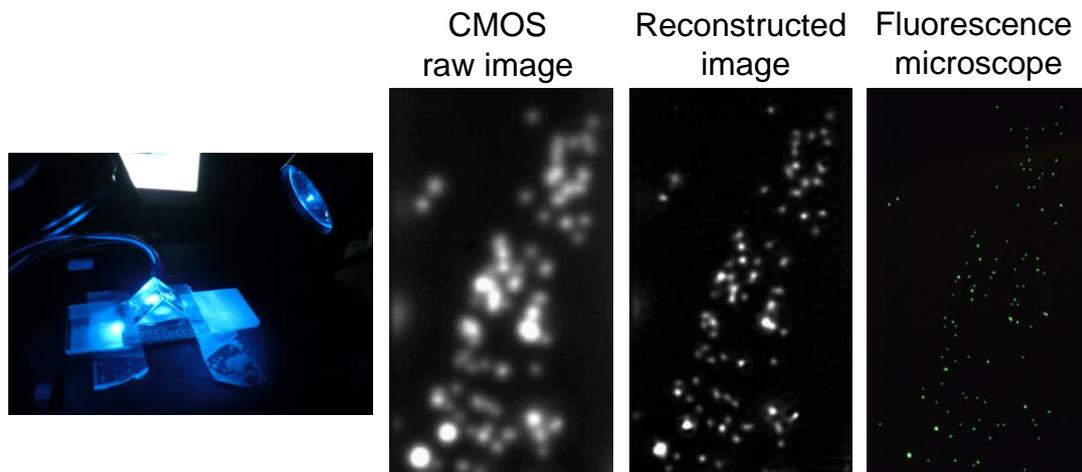


図 2-16 FOP 搭載デジタル ELISA システムによる観察の様子と取得画像[8]

空間分解能は 35 μm と求められた。すなわち、反応チャンバーの配列ピッチを 35 μm 以上に広げる必要がある。

このシステムでは、1 分子酵素検出に対応する酵素アッセイが実施された。LGA 型システムで実施した実験と同様であるが、酵素 $\beta\text{-gal}$ 濃度を pM オーダーに下げると、ドロップレット体積が非常に小さいので、各ドロップレットは、ポアソン分布にしたがって 0 個から数個の $\beta\text{-gal}$ 分子を含むこととなる。この状態で 18 時間蛍光反応を行った後、蛍光検出ができた。すなわち 1 分子計測は達成できたといえる。なお、この観察時には、CMOS イメージセンサ感度を上げるため、暗電流を低減するためにペルチェ素子によって冷却しながら長時間露光が行われた。但し、こうした測定環境下でも検出下限濃度は、10 μM 程度であり、目標には 1 桁不足していた。

FOP による蛍光の広がり抑制効果はあるものの、蛍光反応チャンバーアレイの基板ガラス厚は 50 μm 程度、吸収フィルタ厚は 20 μm 程度あり、CMOS イメージセンサに到達する蛍光強度が低くなってしまうのが課題である。

2.5 考察とまとめ

抗原-抗体反応を利用してターゲットタンパク質を検出する ELISA は高感度で高特異度なツールであり、癌の早期検出・経過観察や、その他の疾病の診断などに広く利用されている。この特徴をさらに発展させて超高感度化したものがデジタル ELISA である。通常の ELISA の 100 万倍の超高感度化は、微小な蛍光反応チャンバーアレイの作製と各チャンバー内での 1 分子検出を可能にすることで達成されている。

デジタル ELISA においては、蛍光反応チャンバーアレイはすでに小型であるが、その検出は蛍光顕微鏡を使って行われている。観察ツールを CMOS イメージセンサで置き換え、さらに、蛍光反応チャンバーアレイ、励起光除去フィルタおよび CMOS イメージセンサを集積することで小型化する取り組みがなされている。これまでに、ライトガイドアレイを使用したシステムや、ファイバーオプティカルプレートを搭載したシステムが提案されており、必要な機能を備えていることが確認されている。

しかしながら、これらのシステムは、蛍光検出感度が十分ではなく、実用的なレベルに引き上げるためには、さらに改善あるいは変更が必要である。感度向上のためには、まず、蛍光検出器である CMOS イメージセンサの性能をデジタル ELISA に向けて最適化する必要がある。さらに、微弱な蛍光を高効率で CMOS イメージセンサに取り込む方法や、励起光除去の方法を見直していく必要がある。

第 3 章 微弱蛍光検出に向けた CMOS イメージセンサ性能の最適化

3.1はじめに

前章で紹介した画像処理 (デコンボリューション) を利用したレンズレスデジタル ELISA 装置では、デジタルカメラやデジタルムービーと同様、撮影した画像が高品位であることが必要となる。高品位画像を得るためには、暗いところから明るいところまで広範囲にわたる感度の均一性が望まれる。これにより、適切なコントラストの画像を得ることができる。

また個々の画素感度のバラツキが大きいと撮像画像に固定されたノイズが残ってしまう。特にアクティブ・ピクセル・センサ (APS) 構成の CMOS イメージセンサでは、画素毎、カラム毎にアンプ回路があり、それらの回路を構成するトランジスタ特性のバラツキが画素出力値に反映される。デジタル ELISA の場合は静止画像を取得するため、時間によりランダムに現れるテンポラリーノイズは、複数画像の積算または平均化によって低減することが可能である。したがって、固定されたノイズのほうが大きな問題となる。

CMOS イメージセンサにおける固定パターンノイズ (FPN) は、オフセット FPN とゲイン FPN に分けることができる。

オフセット FPN は、主にアンプ回路を構成する MOS トランジスタのしきい値電圧 (V_{th}) のバラツキによるものである。オフセット FPN は、暗時の出力電圧を画素毎あるいはフレーム毎に補正をかけることが可能であり、イメージセンサチップに内蔵された相関二重サンプリング (Correlated Double Sampling, CDS) 回路などによって補正される場合が多い[53], [54]。CDS 回路は、元来は CCD 型イメージセンサのリセットノイズ低減のために適用された回路であるが[55]、CMOS イメージセンサにおいては、同時にオフセット FPN の除去にも貢献する。なお、著者の使用している CMOS イメージセンサでは、画素毎の暗時出力電圧をバッファし、出力値との差分をとることで補正を行っている。

ゲイン FPN は、主にアンプ回路の MOS トランジスタのオン電流のバラツキによって生ずる。こちらは、上記の CDS 回路等による補正ができない FPN である。従って、ゲイン FPN を低減するには MOS トランジスタの特性バラツキを低減することが有効になる。本研究では、画素内の回路やカラムアンプ部の回路を構成する MOS トランジスタのチャンネル長とチャンネル幅の最適化やパターンレイアウトの最適化によるバラツキの低減を試みた。

微弱な蛍光を検出するためには、高感度化が必要である。蛍光フォトン 1 個で出力電圧を何 μV 上昇させることができるかが尺度となる。デジタル ELISA 用の CMOS イメージセンサでは、比較的大きなサイズのフォトダイオードで蛍光フォトンを受けることになるが、フォトダイオードのサイズが大きくなることでその寄生容量が大きくなる。このため光キャリアの数と寄生容量によって決定される出力電圧変化が小さくなる。すなわち感度低下を引き起こすことになる。フォトダイオードの寄生容量の影響を受けないようにするには、現在では、殆どの一般的な CMOS イメージセンサで使用されている 4T-APS (four-transistor active pixel sensor) を使うのが効果的である。4T-APS では、フォトダイオードに蓄積した光キャリアを小面積で低容量の PN 接合容量(浮遊容量、floating diffusion、または FD) に転送することで出力電圧変化を大きくすることで、感度を上げている。この転送機能がない 3T-APS では、画素内に、3つのトランジスタ(ソースフォロワ、リセットスイッチ、選択スイッチ)が存在するが、転送スイッチとして画素内のトランジスタが1つ増えて4つのトランジスタを持つことになる。フォトダイオードから FD に光キャリアを完全転送できれば感度はそれぞれの寄生容量 C_{PD} と C_{FD} の比に比例して上げることができる。シリコンファンダリ等で利用できる CMOS イメージセンサ用のプロセスは、完全転送のできる埋め込みフォトダイオードを標準デバイスとして搭載している。これを利用して、特に感度向上を重点に画素設計を行った。

フォトダイオードの電圧変化を読み取り出力するために画素部、カラム部、出力部の3段階のアンプ(ソースフォロワ回路)が構成されている。これらのうち2段目と3段目のソースフォロワ回路においてバックバイアス効果を低減できる構造に変更しアンプゲインを向上した。これも高感度化に貢献している。

3.2 固定パターンノイズの低減

3.2.1 設計概要

作製した CMOS イメージセンサのブロック図を図 3-1 に示す。コンタクトイメージングのために、組立工程などの利便性を考慮し、入出力パッドは最小限の数に抑えている。すなわち、電源 (V_{DD})、グランド (GND)、クロック入力 (Clk) および出力 (Out) の 4 端子となっている。出力はアナログ信号を出力するので、外付けの A/D コンバータ (ADC) によってデジタル信号に変換し画像を得ることになる。

図 3-2 には、作製した CMOS イメージセンサチップ外観を、表 3-1 には、諸元を示した。

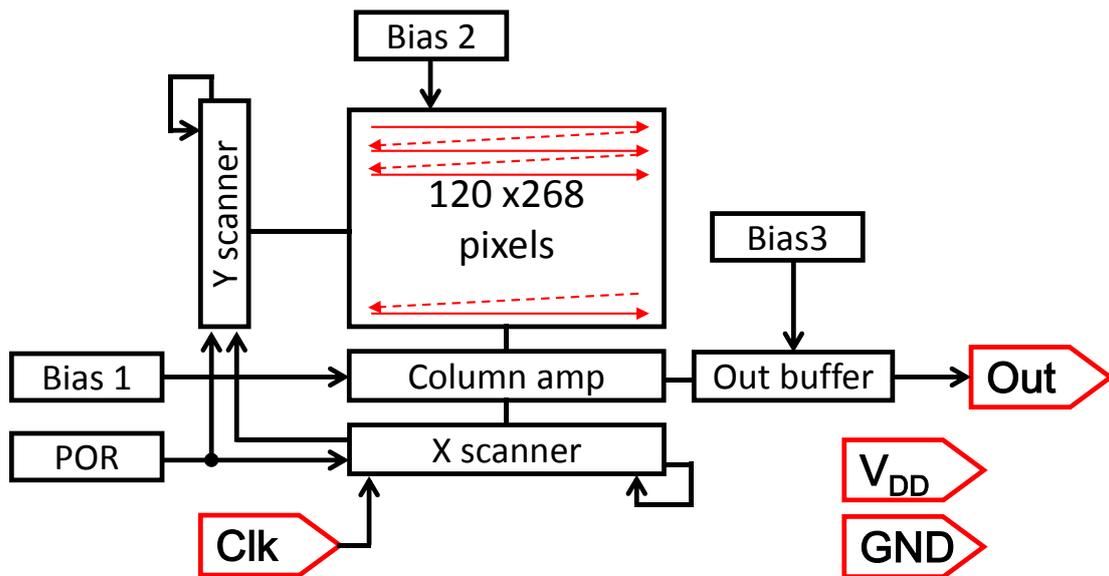


図 3-1 作製した CMOS イメージセンサのブロック図

チップは、製造を Austriamicrosystems (AMS) 社に委託し、 $0.35\ \mu\text{m}$ 標準 CMOS プロセス (2 層ポリシリコン、4 層配線) を使用して作製した。電源電圧は 3.3V 単一電源とした。画素数は 120×268 で作製している。フォトダイオードは、P 型基板と N 型ウェルによる PN 接合で形成している。この N 型ウェルは、P チャネル MOS トランジスタの基板を形成するための N 型層であり、本プロセスで一番深い N 型層である。画素サイズは $7.5 \times 7.5\ \mu\text{m}^2$ であり、画素中のフォトダイオードの占める面積割合 (フィルファクタ) は 44% となっている。

画素の読み取り方式は3トランジスタ構成のアクティブ・ピクセル・センサ (3T-APS) である。この方式では、フォトキャリアの蓄積によって変化するフォトダイオードのカソード (N型ウェル) 電位を Nch MOS トランジスタによって読み取る形をとっている。

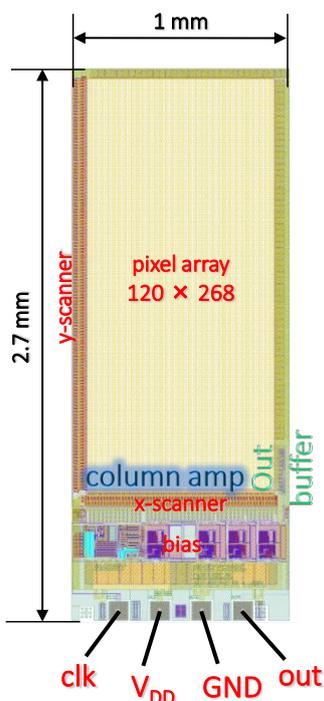


図 3-2 固定パターンノイズ低減 CMOS イメージセンサチップ外観

表 3-1 固定パターンノイズ低減 CMOS イメージセンサ諸元

プロセス	0.35 μm 2-poly 4-metal 標準CMOSプロセス
電源電圧	3.3 V
チップサイズ	1050 μm \times 2700 μm
画素数	120 \times 268
画素読み出し方式	3-Trアクティブピクセルセンサ
フォトダイオード	n-well – p-sub
画素サイズ	7.5 \times 7.5 μm^2
フィルファクタ	44%

3.2.2 設計パラメータとレイアウトの最適化

図 3-3 に「画素→カラムアンプ→出力」の回路図を示した。

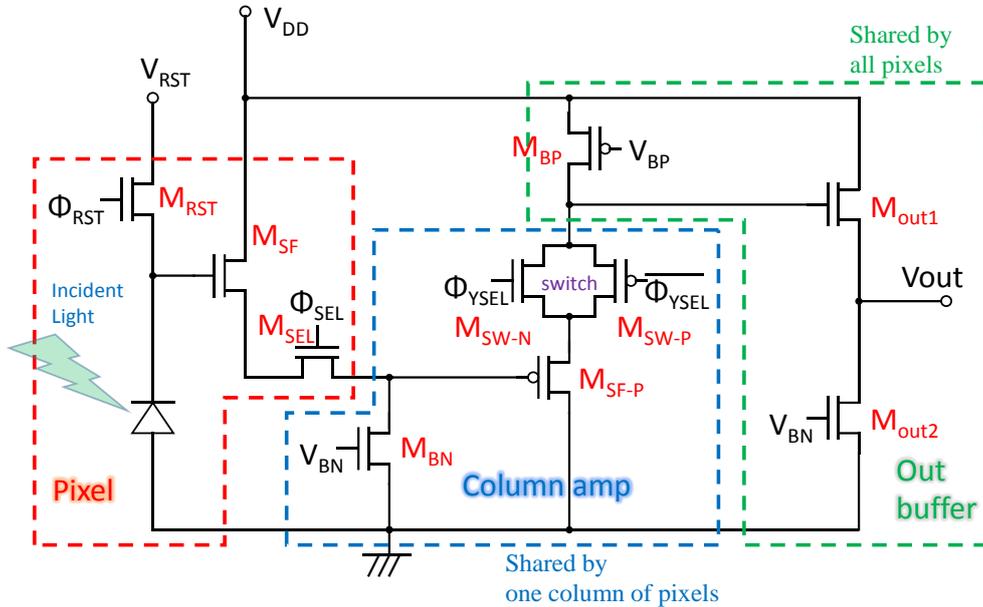


図 3-3 3T-APS CMOS イメージセンサ回路図（画素→カラムアンプ→出力）

画素内の Nch MOS トランジスタ M_{SF} はフォトダイオードのカソード電位をモニターしており、 M_{SEL} がオンすると M_{BN} とともにソースフォロワ回路を形成し、カラムアンプ部の Pch MOS トランジスタ M_{SF-P} に電位情報を伝達する。カラムアンプ部の CMOS スイッチがオンすると M_{SF-P} と M_{BP} で形成されるソースフォロワ回路が動作し、出力バッファの Nch MOS トランジスタ M_{out1} に伝達され、 M_{out2} と形成されるソースフォロワ回路を介して、 V_{out} 端子に出力される。

M_{SF} は画素毎に存在するが、これらのバラツキは画素 FPN の原因となる。またカラムアンプ部は、画素アレイの縦 1 列毎に共有されているため、カラムアンプ部のトランジスタ特性のバラツキは撮像画像の中では、縦スジのように見えるカラム FPN の原因となる。

MOS トランジスタのバラツキは、アナログ回路におけるマッチングバラツキ特性を見積もるために研究されており、バラツキの標準偏差が $1/\sqrt{L \cdot W}$ に比例することが知られている[56]–[58]。

すなわち、画素間のバラツキを低減するためには、より大きなトランジスタを使用するのが望ましい。しかしながら、画素サイズは、出来る限り小さく、フィルファクタは出来る限り大きくするのが高解像度化や高感度化に有効であるため、トランジスタサイズの大きな拡大は難しい。従って、サイズ拡大を極力抑えながらバラツキ低減する方法を考える必要がある。

画素設計

MOS トランジスタではチャンネル長が最小に近くなるとショートチャンネル効果によるしきい値の低下など特性変動量が大きくなる。このため今回は、従来使用されていた、デザインルールで許される最小チャンネル長である $0.35\ \mu\text{m}$ を使用せず、 $0.40\ \mu\text{m}$ に拡大した。

さらに、MOS トランジスタのゲートを形成するポリシリコンパターンのレイアウトについても製造上のバラツキを抑制するように工夫した。実際の製造では、パターンの疎密によってリソグラフィ工程や、ドライエッチ工程でのマイクロローディング効果などにより、加工出来ばえが変化する。これらのバラツキを抑制するためにポリシリコンのダミーパターンを置き、疎なパターンにならないようにした。従来の画素レイアウトと今回のものの比較を図 3-4 示した。赤い帯状のパターンが MOS トランジスタのゲート電極を形成するポリシリコンのパターンである。

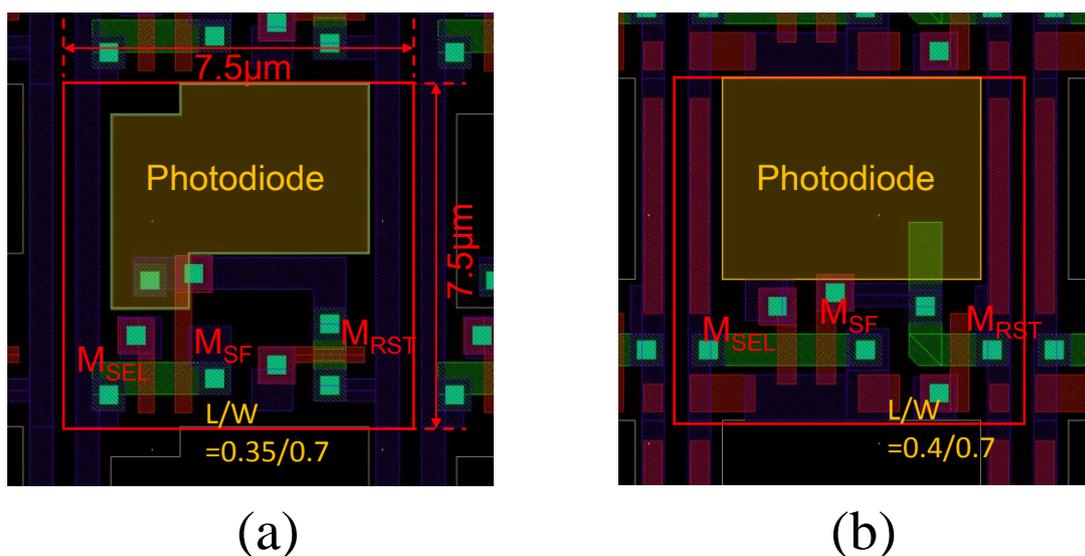


図 3-4 従来画素(a)と新規画素(b)のレイアウト比較

カラムアンプ部設計

カラムアンプ部は、画素に比べるとサイズの制限が少ないので、まずサイズの検討を行った。カラムアンプ部は、初段ソースフォロワ回路のバイアス電流を生成する M_{BN} 、ピクセルの電位情報を受け取る M_{SF-P} およびカラムを選択するための CMOS スイッチ (M_{SW-N} , M_{SW-P}) で構成されている。

M_{BN} は画素内の M_{SF} とともにソースフォロワ回路を形成しており、バイアス電流を供給している。今回チャンネル長を 0.35 から $2.0 \mu\text{m}$ に、チャンネル幅を 0.7 から $2.5 \mu\text{m}$ に拡大した。これにより、 $L \cdot W$ (ゲート面積) は、 0.245 から $5.0 \mu\text{m}^2$ へ約 20 倍になっている。従って、 M_{BN} に起因するバラツキの標準偏差は面積比の平方根の約 4.5 分の 1 に減少することが予想される。

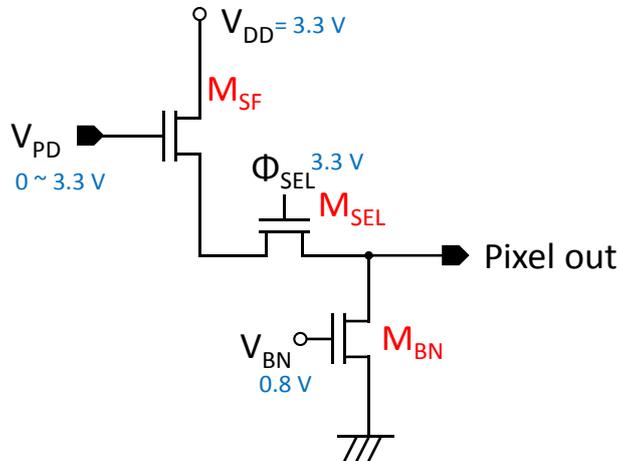


図 3-5 初段ソースフォロワ回路図

図 3-5 に示した回路図でソースフォロワ回路の出力電圧 (pixel out) とバイアス電流のシミュレーションを行った。この回路図中の M_{BN} は個々のカラムで共有されている。シミュレーション結果を図 3-6 に示す。(バイアス電圧 V_{BN} は、

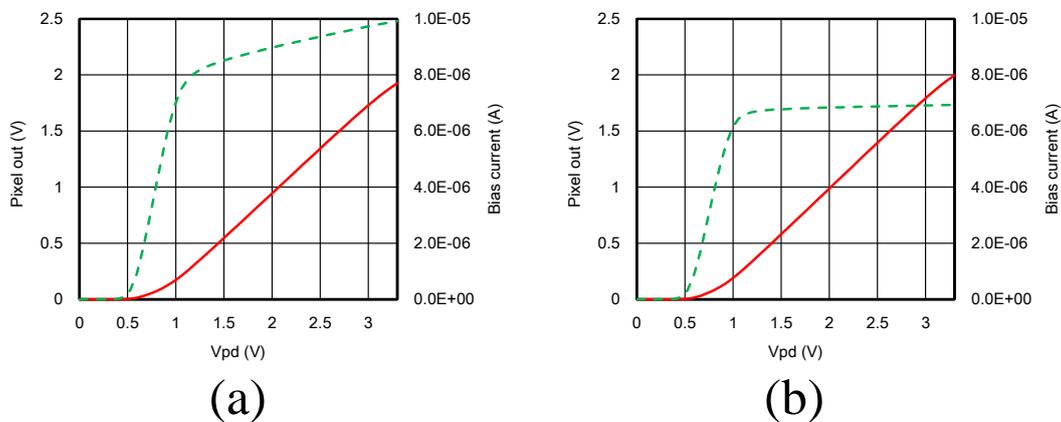


図 3-6 画素出力電圧シミュレーション結果

M_{BN} channel size ($L/W =$ (a) $0.35 / 0.7$, (b) $2.0 / 2.5$ [unit: μm])

Nch MOS トランジスタのしきい値電圧 (0.6 V) に 0.2 V を加えた 0.8 V に設定している)。

チャンネル長の拡大により、バイアス電流の入力電圧依存性が低減しているため、ゲインが 0.8 程度から 0.82 程度に向上している。ところで、理想的なソースフォロワ回路ではゲインは 1 であるが、シミュレーション結果で 0.8 程度に下がっている主な理由は、 M_{SF} のバックゲートが GND に接続されているためソース電位の変化によってしきい値電圧が変化する現象 (バックバイアス効果) に依るところが大きい。

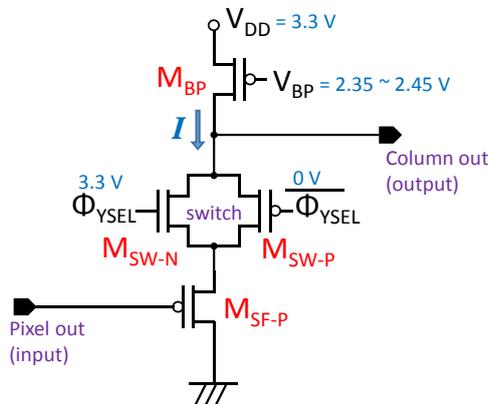


図 3-7 2 段目ソースフォロワ回路図

カラムアンプ部では、カラム選択のために CMOS スイッチが使用されている。このスイッチのオン抵抗が特性に大きな影響を与えていた。CMOS スイッチは、 M_{BP} と M_{SF-P} で構成されるソースフォロワ回路のバイアス電流の通り道となっているため、オン抵抗が高くと出力電圧が変化する。図 3-7 に示すような回路で出力電圧 (Column out) のシミュレーションを行った。

表 3-2 には、カラムアンプ部に使用したトランジスタの従来と今回改善した設計パラメータ (チャンネル長および幅) をまとめた (M_{BP} は出力バッファ部に配置しており、初段ソースフォロワ回路の M_{BN} は、カラムアンプ部に配置されている)。

表 3-2 設計パラメータ比較 (従来と新規)

Tr Name	従来		新規	
	L (μm)	W (μm)	L (μm)	W (μm)
M_{SW-N}	0.35	0.7	0.4	2.5
M_{SW-P}	0.35	0.7	0.4	9.8
M_{SF-P}	0.7	20.0	0.7	19.6
M_{BN}	0.35	0.7	2.0	2.5

図 3-8 に、回路シミュレーション結果を示す。従来のものは、特に M_{SF-P} の抵抗が高く出力電圧の変化を制限している。このため出力電圧が高いときのゲインが低くなっている（実際のイメージセンサにおいては、低照度時のゲインが低いことになる）。

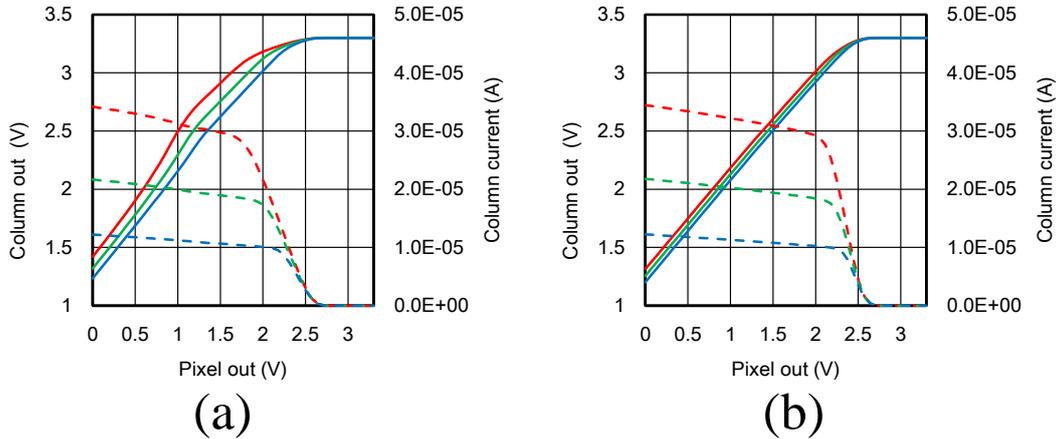


図 3-8 2 段階ソースフォロワ回路（カラム出力）シミュレーション結果
 (a) 従来設計、(b) 新規設計 ($V_{BP}=2.35\text{ V}$ (赤), 2.40 V (緑), 2.45 V (青))

今回、 L/W (単位 μm) を $0.35/0.7$ (N_{ch} , P_{ch} とも) から $0.4/2.5$ (N_{ch}), $0.4/9.8$ (P_{ch}) と変更することにより出力ゲインの線形性を大幅に改善することができた。さらにバイアス電圧 V_{BP} についても、従来の 2.35 V から 2.4 V に変更することで、バイアス電流を低減しており、このことも CMOS スイッチのオン抵抗の影響を低減している。（ P_{ch} MOS トランジスタのしきい値は約 -0.65 V であるので、 $(2.4 = V_{DD} - (|V_{th}| + 0.25))$ となっている）

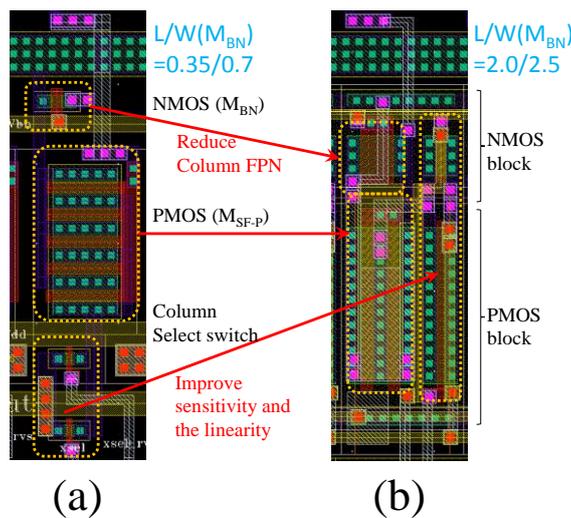


図 3-9 カラムアンプ部レイアウト比較 (a) 従来、(b) 新規

ここまで説明したカラムアンプ部のレイアウトを図 3-9 に示した。トランジスタサイズは大きくなっているが、レイアウトの工夫により、従来のものとほぼ同じ面積内に収まっている。プロセスの出来ばえバラツキを低減するためにゲートのポリシリコンパターンは互いに隣接するように配置している。微細加工において、孤立パターンと密集パターンで出来ばえ寸法や、バラツキに違いがあり、特に孤立パターンにおいて寸法バラツキが起こりやすいが、今回のようなレイアウトにより製造バラツキの低減が期待できる。

出力バッファ設計

出力バッファは、Nch MOS トランジスタ (M_{out1} および M_{out2}) で構成されるソースフォロワ回路になっている。今回、静電放電 (ESD) に対して高耐量にすることで、組み込み時等に破壊しにくい構成にした。 M_{out1} および M_{out2} は、直接外部パッドにつながる素子である、十分な ESD 耐量を得るにはチャンネル幅 $40\ \mu\text{m}$ ではサイズが小さすぎるので、図 3-10 に示すようにオフ状態の Nch MOS トランジスタを並列接続した。ESD イベント時の Nch MOS の放電経路は、通常、ドレインからソース方向は寄生 NPN トランジスタのブレークダウンを使い、逆方向は、ドレインと P 型基板 (あるいは P 型ウェル) で形成されるダイオードを使って形成するが、 M_{out1} は、ソースが P 型ウェルと別電位であるためこのダイオードの経路が使用できない。そのため、逆方向も寄生 NPN を使用した。逆方向の寄生 NPN を有効に働かせるために、ソース側にもバラスト抵抗領域 (ゲートポリシリコンからソースコンタクト窓までの距離と広げ抵抗成分を持たせる) を設けた構造にしている。

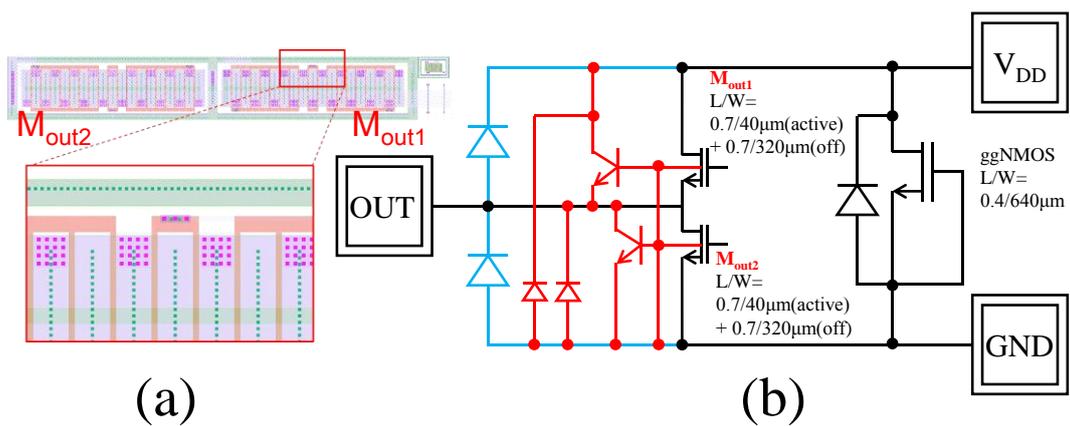


図 3-10 出力バッファ (a)レイアウト, (b)等価回路図 (寄生素子を含む)

出力電圧のフォトダイオード電位 (V_{PD}) 依存性のシミュレーション結果を図 3-10 に示した。 M_{out1} および M_{out2} はアクティブ部のチャンネル長および幅は変化していないので、出力バッファの特性は変化しないが、ここでは、ここまでで説明した画素、カラムの回路特性も含めた形で比較している。大幅な出力リニアリティの向上が見られる。

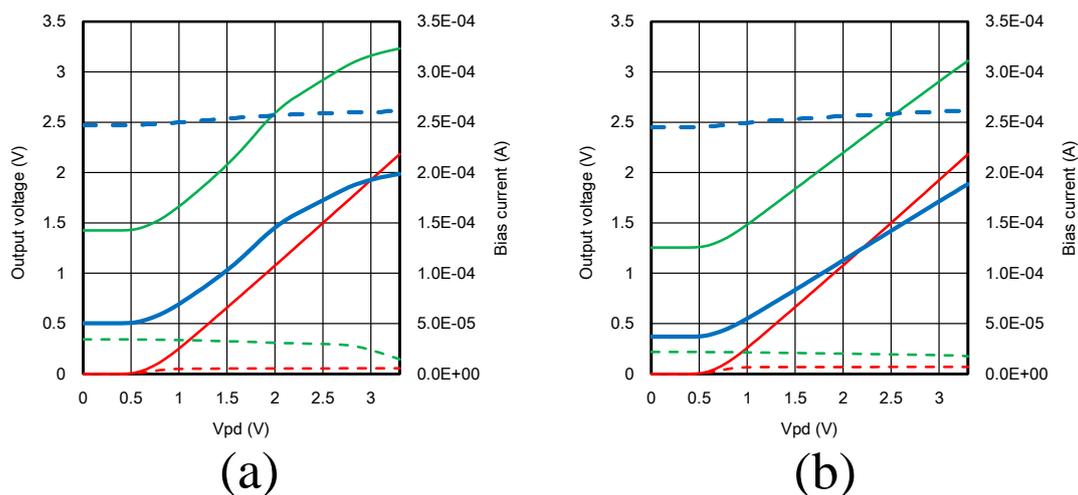


図 3-11 従来(a)と新規(b)のフォトダイオード電位に対する出力シミュレーション結果 Pixel_out(赤)、Column_out (緑)、Chip_out (青)、(破線は対応するバイアス電流)

3.2.3 固定パターンノイズ評価方法

FPN 評価は、図 3-12 に示すような評価系によって行った。光源に輝度箱（京立電機株式会社、LB-8110）を用いた。この評価では光源とセンサの距離が近かったため、センサからの反射光の影響がありセンサ表面内で照度の分布（ムラ）が見られた。このため固定パターンノイズの評価では、隣接差分をとることで照度ムラの影響を排除した。センサは外部からのクロックによりフレームレートを制御し、30 fps の動画撮影により画素値情報を得た。

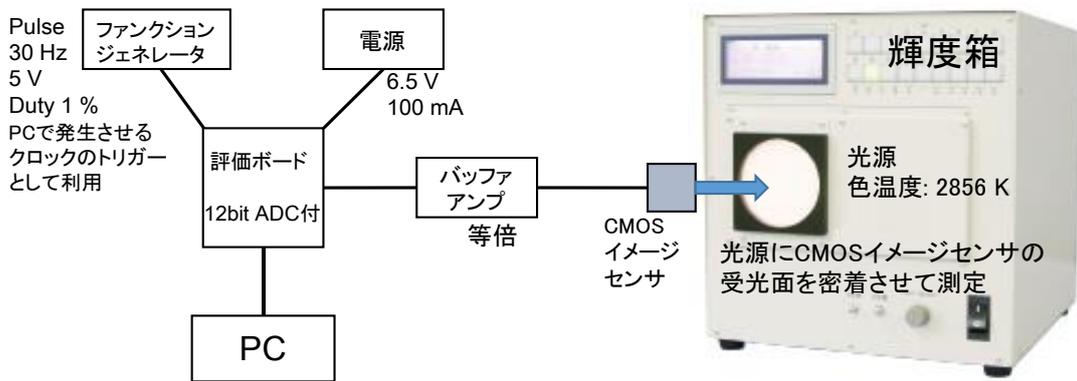


図 3-12 固定パターンノイズ評価装置の構成

照度－出力特性評価では、センサ中心付近から 30 画素を抽出し、平均値を取得した。

固定パターンノイズの評価は、飽和画素値の 50 %になる照度で評価を行った。画素値は暗時をゼロとした任意の値である。暗時のデータは、暗時ランダムテンポラリーノイズを低減するために各画素 100 フレームの平均値を用いてゼロ点を決定した。明時（飽和 50%照度）についても 100 フレームの平均値を取り、ランダムテンポラリーノイズの影響を排除した。固定パターンノイズの計算方法については次節に詳しく提示する。

3.2.4 固定パターンノイズ評価結果

まず、照度に対する出力特性の評価結果を示す。図 3-13 には、従来のセンサと新規センサの特性を示した。シミュレーション結果で予想されたように、出力のリニアリティが大幅に改善していることが分かる。特に、暗い部分での感度が向上している。出力リニアリティの向上はデジタル ELISA の観察においては、漏れ出した励起光の強度が変化しても広い領域で差分が安定して得られることを意味しており、微弱な蛍光を検知するために有利である。

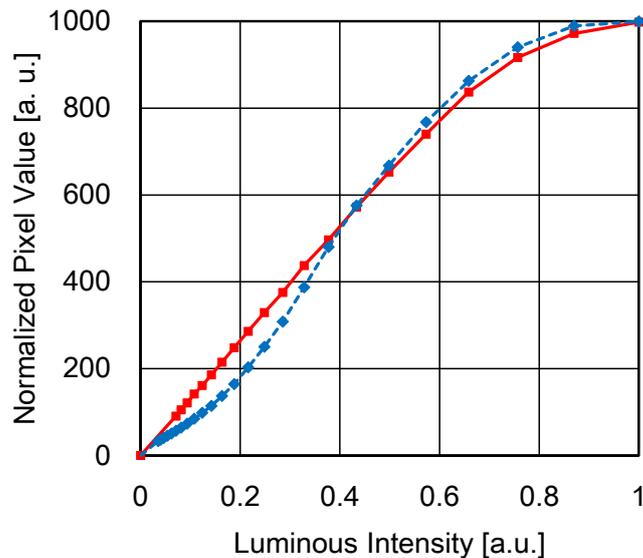


図 3-13 照度に対する出力画素値の比較
従来品 (青)、新規開発品 (赤)

固定パターンノイズは、写真画像を見ることで直感的な理解をすることができる。そこで、従来および今回の CMOS イメージセンサにバリフォーカルレンズを取り付け簡易のデジタルカメラを作製し撮影した画像の比較を実施した。取得画像を図 3-14 に示した。違いを分かりやすくするために比較的暗い条件での撮影で、どちらも同じ条件下での撮影結果である。従来センサは低照度時の感度が低いため暗い画素になっている。また、縦スジが入っているように見えるが、これがカラム固定パターンノイズ (カラム FPN) である。これまでの説明で示したようにカラムアンプ部のトランジスタ特性のバラツキによって発生するものである。画像より設計改善により固定パターンノイズが大幅に改善していることは明らかであるが、ここから定量的に比較を行っていく。

前節に示した評価方法で測定したデータを、El Gamal らの方法を参考に計算する。[53]

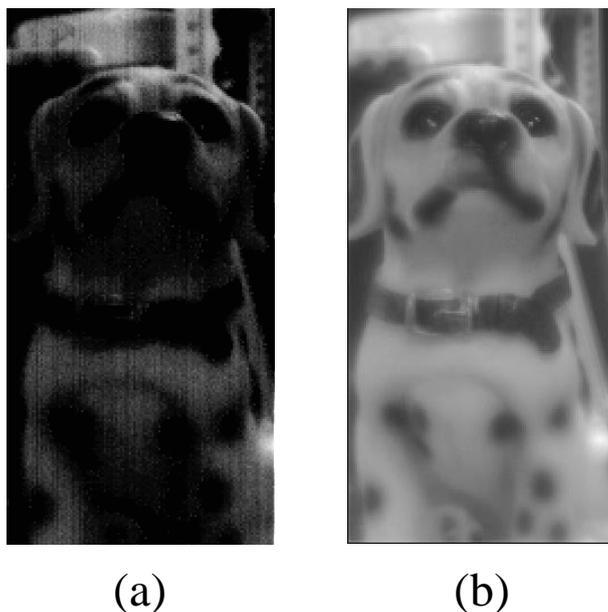


図 3-14 取得画像比較 (同一条件化で撮影) (a) 従来品、(b) 新規開発品

ここで、簡略化のため 2 つの仮定をおく。

- ①カラム FPN とピクセル FPN のバラツキは独立、
- ②隣接ピクセルの影響が無い (独立なバラツキ)。

各画素出力でランダムに発生するテンポラリーノイズの除去のために前節で示したように、画素値データは 100 フレームの平均値を使用する。

図 3-15 のような仮想の画素数のセンサを評価する際、センサ表面を理想的に

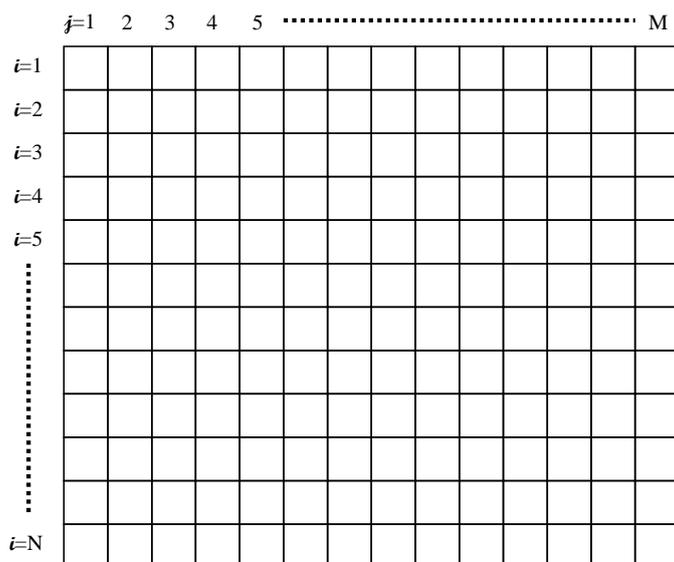


図 3-15 固定パターンノイズ (FPN) 計算説明用の仮想画素数イメージセンサ

均一照射できた場合は、比較的簡単に FPN のバラツキ（分散や標準偏差）を求めることができる。

まず、各画素の画素値から全画素の画素値の平均値を引いて各画素値のバラツキ成分のみを抽出しておく。（ i 行 j 列の値を F_{ij} とする）

1 列（カラム）内では画素毎のバラツキがランダムに発生していると考えられるので、同一カラム内の多数の画素値の平均は、カラムアンプ起因の変位を抽出したのものになると考えられる。

$$\bar{Y}_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N F_{ij} \quad (3-1)$$

次に、カラム毎に計算したカラムアンプ起因の FPN 成分を引くとカラム FPN 成分が除去されて画素毎のバラツキを抽出したことになり画素 FPN が計算できる。

$$\bar{X}_{i,j} = F_{i,j} - \bar{Y}_j \quad (3-2)$$

これらの値を使って、カラム FPN の標準偏差 σ_Y や分散 σ_Y^2 および画素 FPN の標準偏差 σ_X や分散 σ_X^2 を求めることができる。

$$\sigma_Y^2 = \frac{1}{M-1} \sum_{j=1}^M \bar{Y}_j^2 \quad (3-3)$$

$$\sigma_X^2 = \frac{1}{M(N-1)} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M \bar{X}_{i,j}^2 \quad (3-4)$$

今回センサ表面で光の照射強度が、なだらかな傾斜をもっていた。照射バラツキが本来の FPN に付加されてしまうので、これを除去するために隣接画素間の差分を利用した。照射強度は隣接画素間ではほぼ一定と考えられるので、照度ムラをキャンセルすることができる。この作業では、まず、カラム FPN の要素を消してしまわないように隣接カラムにある隣接画素の差分をとって照度バラツキをキャンセルした。但し、この処理を行うと同等のバラツキをもつ 2 つの独立な数値の差分になるのでそのバラツキの分散は本来の FPN のバラツキの 2 倍になっている。標準偏差については、差分の標準偏差の平方根をとることで、単画素に対応した標準偏差に変換することができる。このような手法で、カラム FPN と画素 FPN のバラツキを評価した。これらの結果を図 3-16 にカラースケールを使って図示した。この図では、平均値が黄色、高画素値が赤、低画素値が青に近くなるよう設定している。(a)は、カラム FPN 成分と画素 FPN 成分を区別無く表示したもので、(b)は抽出したカラム FPN 成分を引くことで、画素 FPN 成分だけになっている。

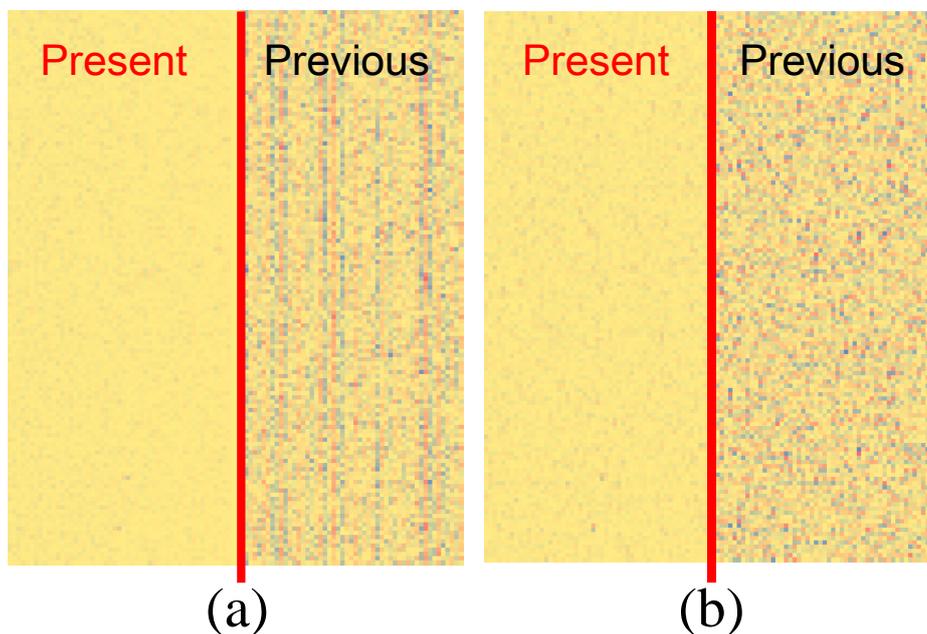


図 3-16 固定パターンノイズ (FPN) 比較 (カラースケール像)
 (a) トータル FPN (Column + Pixel) 比較、(b) Pixel FPN 比較

また、図 3-17 には、カラム FPN 成分の新旧比較を行っている。

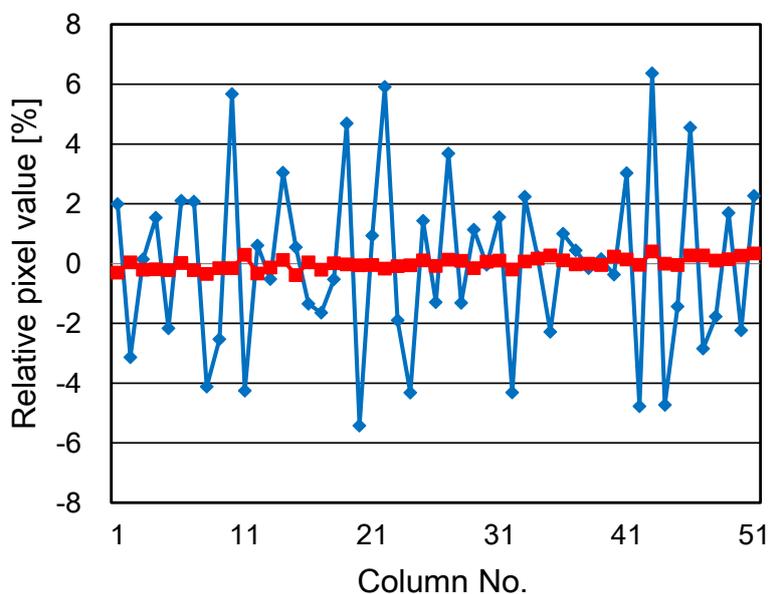


図 3-17 カラム FPN 成分比較、従来品 (青)、新規開発品 (赤)

表 3-3 にまとめたように、特にカラム FPN 成分のバラツキの改善が大きいことがわかる (約 1/16)。なお、この表では、測定した照度 (飽和画素値の約 1/2 の

画素値になる照度) での全画素平均画素値に対する相対標準偏差を示している。これは、カラムアンプ部の Nch MOS トランジスタ M_{BN} および CMOS スイッチ部の M_{SW-P} 、 N_{SW-N} の大幅なサイズアップが効いていると考えられる。

画素 FPN は約 1/5 に低減している。トランジスタサイズ変更から考えられる以上に改善されており、製造プロセスバラツキの影響を受けにくいレイアウトに改善した効果があったと考えられる。

表 3-3 平均画素値に対する相対標準偏差

	新規センサ	従来センサ
カラム FPN $\overline{\sigma}_Y$	0.13 %	2.1 %
画素 FPN $\overline{\sigma}_X$	0.57 %	2.5 %

3.3 4T-APS による高感度化

3.3.1 設計概要

4T-APS CMOS イメージセンサは CMOS イメージセンサ専用の製造プロセスを使用して作製した。具体的には、次に示す 2 種類の製造プロセスを使用して作製した。

①TSMC 社 0.18 μm CMOS イメージセンサ用プロセス

(ポリシリコン 1 層、メタル配線 6 層)

- 埋め込みフォトダイオード
- 素子分離構造：STI (Shallow Trench Isolation)
- CMOS：1.8 V 系および 3.3 V 系 (ゲート酸化膜厚はそれぞれ最適厚)
ゲートポリシリコン (N⁺ for NMOS, P⁺ for PMOS)
→ 表面チャンネル型 CMOS
- コバルトサリサイド (Co-salicide) による低寄生抵抗化
非サリサイド領域形成可能
- MIM 容量搭載可能

②大学連携プロジェクト(spro) 0.18 μm CMOS イメージセンサ用プロセス

(ポリシリコン 2 層、メタル配線 5 層)

①プロセスと同様の特徴に加えて、

- CMOS：低 V_{th} 素子やアナログ回路に適したポケット注入無し素子
- 深い N 型ウェル (DNW) 層によりデジタル/アナログ分離が可能
- 作製に使用するシリコンウェーハは N 型基板上に
P 型エピタキシャル素を形成したもの。

TSMC プロセスで作製した 4T-APS CMOS イメージセンサのブロック図を図 3-18 に示す。スキャナ部を 1.8 V 系 CMOS 回路で構成したため、画素内の 3.3 V 系 CMOS 回路を制御するためにシフトレジスタにより昇圧した信号を送る形になっている。spro プロセスでは、電源を 3.3 V の単一電源としたためスキャナ部を 3.3 V 系 CMOS 回路で構成したためシフトレジスタは入っていない。

ブロック図中には、転送ゲート信号が記入されていないが、一行前のリセット信号により転送ゲート (M_{TR}) がオンしてフォトダイオードに蓄積した電子が FD

図 3-19 に画素から出力端子までの回路図を示す。3T-APS では、 M_{SF} がフォトダイオードのカソード電位を直接読み取っていたが、4T-APS では、 M_{TR} がオンした時に電子を FD に転送して、 M_{SF} でその電位を読み取るようになっている。この点以外は、前項で示した 3T-APS の回路と同様である。

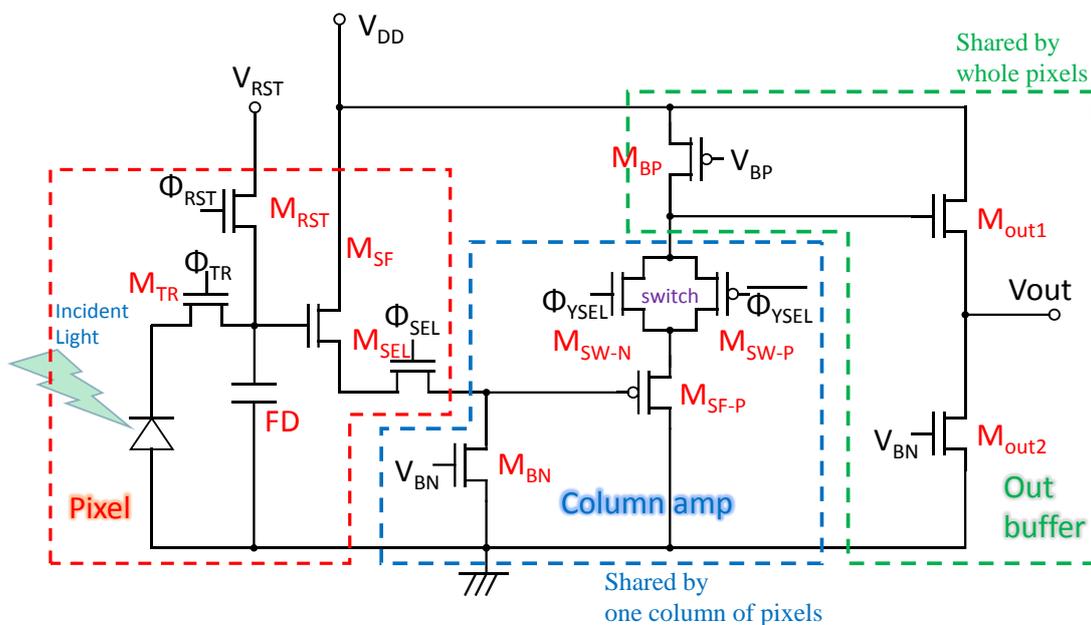


図 3-19 4 T-APS CMOS イメージセンサ回路図 (画素→カラムアンプ→出力)

3.3.2 4T-APS 設計とレイアウト

画素設計 (TSMC プロセス)

0.35 μm CMOS プロセスで作製した 3T-APS に比べてデザインルールของ小さい 0.18 μm になったことで画素中の MOS トランジスタのサイズが低減できるためフォトダイオードの占有面積 (フィルファクタ) を大きくすることができた。画素中には、ロジックで使用されるものより若干しきい値電圧 (V_{th}) の低いタイプのトランジスタを使用した。このため、チャンネル長はデザインルール上の最小寸法が 0.6 μm となっており、自動的に最小加工可能寸法より大きくなる。このことは、トランジスタのバラツキを抑え、固定パターンノイズ (FPN) を低減することに繋がる。高感度化が主目的であるので FD サイズは小さいほうが望ましいが、サイズバラツキが寄生容量のバラツキに反映され FPN となるので、最小サイズは避けた。画素中の主要な素子の設計パラメータを以下にまとめた。

画素サイズ : $7.5 \times 7.5 = 56.25 \mu\text{m}^2$

フォトダイオードサイズ : $5.32 \times 5.24 + \alpha$ (突き出し部) = $28.0748 \mu\text{m}^2$
(フィルファクタ : 49.91 %)

FD サイズ : $0.48 \times 1.06 = 0.509 \mu\text{m}^2$

M_{SF} サイズ : $L/W = 0.7 \times 0.8 = 0.56 \mu\text{m}^2$

M_{SF} は、STI 応力の影響を受けにくい場所に配置した[59]。画素レイアウトを図 3-20 に示す。

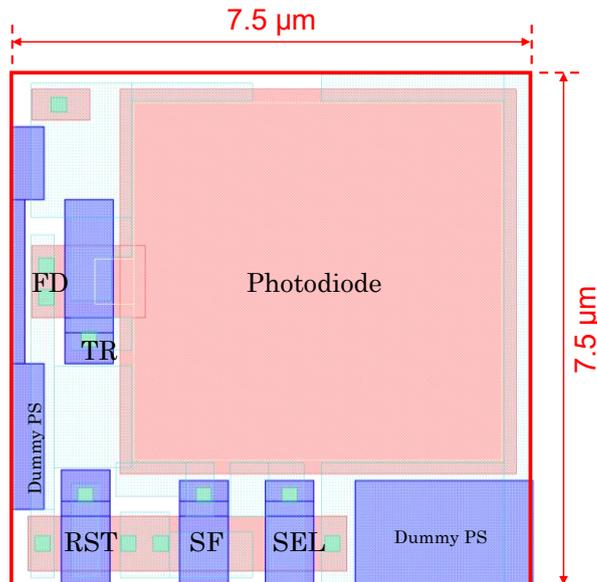


図 3-20 4T-APS (TSMC) 画素レイアウト

画素設計 (spro プロセス)

TSMC プロセスで設計したものと基本コンセプトは同じであるが、デザインルールの差異があるため、形状が変わっている。図 3-21 に画素レイアウト図と対応する断面模式図を示した。主要設計パラメータを以下に示す。

画素サイズ : $7.5 \times 7.5 = 56.25 \mu\text{m}^2$

フォトダイオードサイズ : $5.32 \times 5.24 - \alpha$ (凹部) = $27.8286 \mu\text{m}^2$

(フィルファクタ : 49.47 %)

FD サイズ : $0.48 \times 1.0 = 0.48 \mu\text{m}^2$

M_{SF} サイズ : $L/W = 0.6 \times 0.8 = 0.48 \mu\text{m}^2$

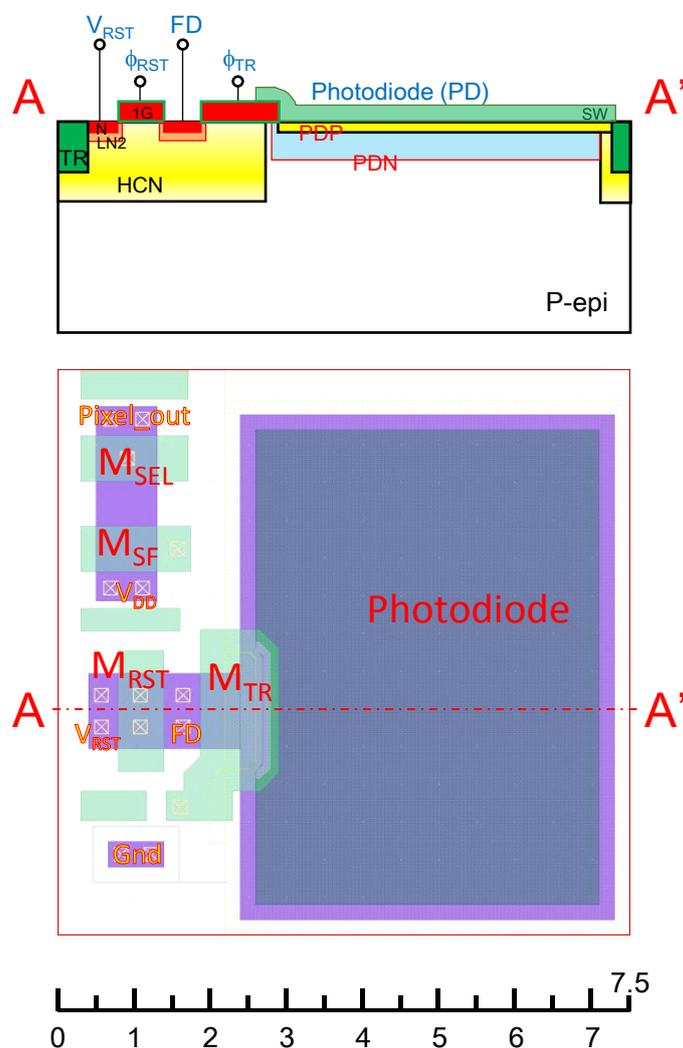


図 3-21 4T-APS(spro) 画素レイアウト(下段)および断面図(上段)

コラムアンプ部設計 (TSMC プロセス)

本プロセスでは、0.35 μm CMOS プロセスで作製した 3T-APS と同じ回路を形成した時に、ソースフォロワ回路のゲインが低下することが回路シミュレーション結果で見受けられた。ソースフォロワ回路のゲインが低下する原因はバックバイアス効果によるしきい値電圧 (V_{th}) の変動である。図 3-22 に AMS 社

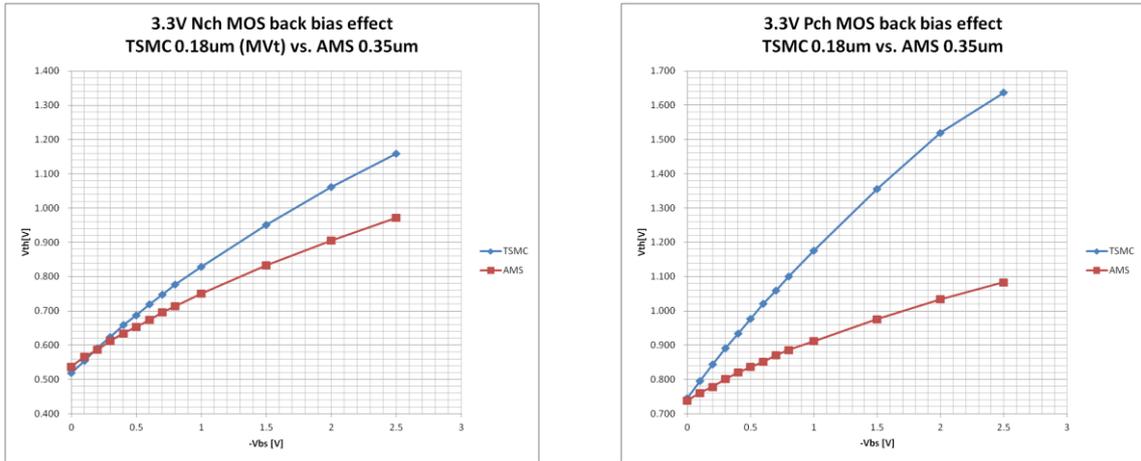


図 3-22 Nch MOS トランジスタ しきい値電圧のバックバイアス依存性比較
TSMC 0.18 μm プロセス(左)、AMS 0.35 μm プロセス(右)

0.35 μm プロセスとの V_{th} のバックバイアス依存性を比較したグラフを示した。特に Pch MOS トランジスタの V_{th} 変動量が大きくなっていることが分かる。

コラムアンプ部には 2 段目のソースフォロワを形成する Pch MOS トランジスタ M_{SF-P} があり、このバックバイアスがソース電位ではなく V_{DD} 電位になっていることが問題である。ソース電位に変更するためには、 M_{SF-P} と M_{BP} の基板 (ボ

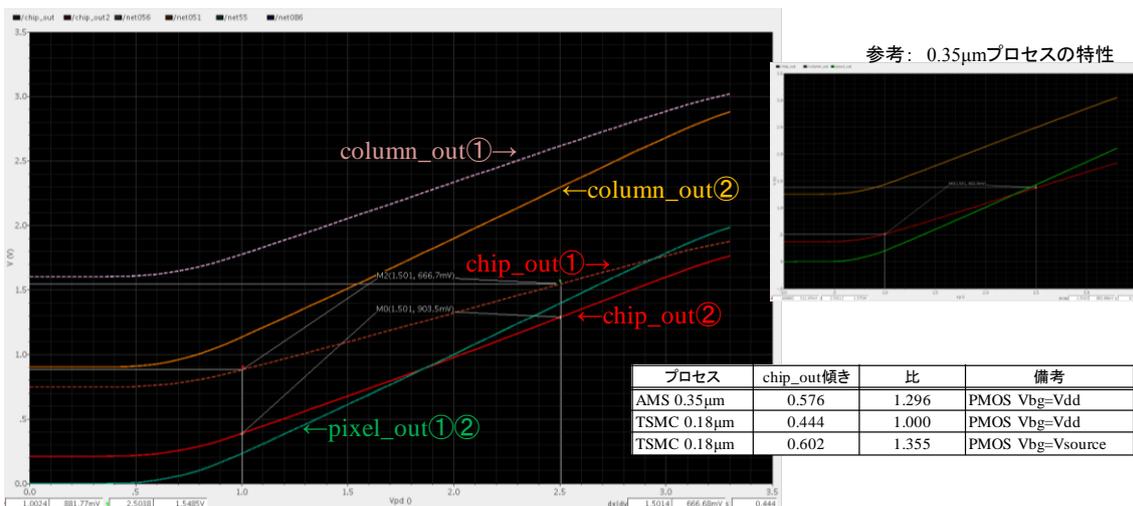


図 3-23 各ノードの出力波形比較
(Pch MOSFET 定電流源の基板(Nwell)電位 : ① V_{DD} 、②Source)

ディ) である N 型ウェル層 (NW) を互いに分離する必要がある。0.18 μm プロセスでは、ウェル層の最小デザインルールも縮小されているため画素ピッチ (7.5 μm) 内でこのレイアウトを達成することが可能であるので採用した。M_{BP} の基板電位を V_{DD} からソース電位に変更した際のカラムアンプ出力のゲイン比較を図 3-23 に示した。

この回路で使用するためのソース電位 $V_S = \text{基板電位 } V_B$ とした Pch MOS トランジスタ M_{BP} のレイアウトを図 3-24 に示す。動作時に P 型基板 (P-sub) -NW 間での充放電も必要となるため、NW コンタクトと P 型基板コンタクトを並走させることで寄生抵抗値を下げる対応を行った。

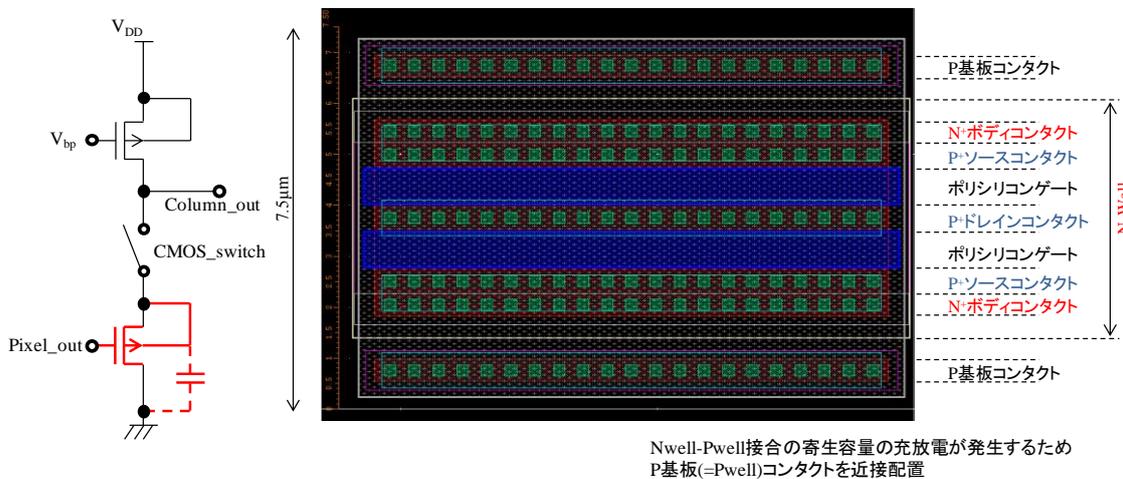


図 3-24 $V_B = V_S$ Pch MOS レイアウト

カラムアンプ部設計 (spro プロセス)

spro プロセスにおけるカラムアンプについては、TSMC プロセスの場合と同様に M_{SF-P} のバックバイアスがソース電位と等しくなるよう設計し、ゲイン向上を図っている。

3.3.3 出力バッファおよび静電放電 (ESD) 保護回路

ESD 保護ネットワーク (TSMC プロセス)

今回使用した TSMC 0.18 μm CMOS イメージセンサ用プロセスは、3.3V および 1.8V 用回路が構成でき、それぞれに対応した ESD 保護素子が用意されている。3.3V 回路は、3.3V の ggNMOS (grounded gate Nch MOSFET) および ggPMOS (grounded gate Pch MOSFET)、1.8V 回路は、1.8V の ggNMOS および ggPMOS で保護するのが基本である。また、ゲート入力パッドでは、CDM (Charged Device Model) のような低抵抗で印加されるサージにも耐性を持たせるため、2 段の ESD 保護形態を採ることが推奨されている。

ミックストシグナル集積回路では、ノイズ低減のためアナログとデジタルで電源、GND を分割する場合がある。CMOS イメージセンサチップも、アナデジ混載であるため同様に電源、GND の分割を行う場合がある。今回は、GND を共通にし、3.3V 電源をデジタル (D) とアナログ (A) で別端子から供給する形をとったので図 3-25 のような ESD 保護ネットワークを構築した。

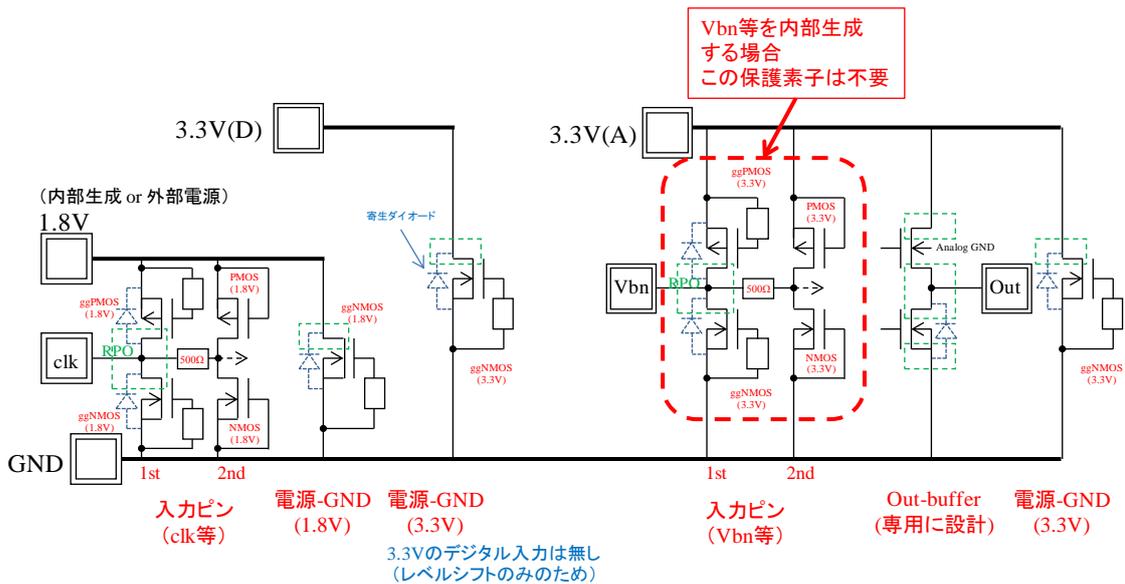


図 3-25. ESD 保護ネットワーク (TSMC プロセス用)

出力バッファ (TSMC プロセス)

出力バッファは、3T-APS CMOS イメージセンサと同様に出力バッファとしての機能と ESD 保護素子としての機能を合わせ持った素子としている。素子のレイアウトを図 3-26 に示した。

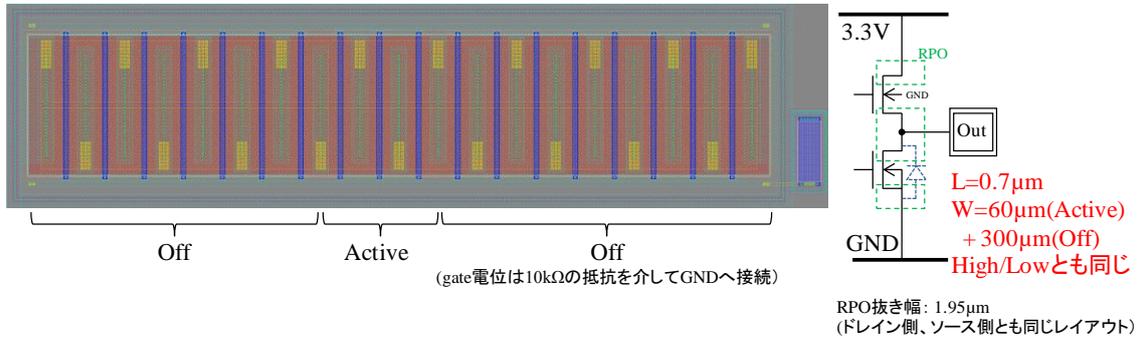


図 3-26. 出力バッファ用 Nch MOSFET

※非サリサイド化しているところを図中では「RPO (非サリサイド化用マスク名)」で示している。

出力バッファ (spro プロセス)

出力バッファは Nch MOS トランジスタによるソースフォロワで構成されるが、これについてもカラムアンプ部の Pch MOS トランジスタの場合と同様、バックバイアス効果を排除できればゲインを向上することができる。spro プロセスは Nch MOS トランジスタブロックを CMOS イメージセンサチップ全域の下地として存在する P 型エピタキシャル層 (GND 電位) から分離することができる深い N 型ウェル層 (DNW) を有しているため、Nch MOS トランジスタ M_{OUT1} のバックバイアスをソース電位にすることが可能である。

この部分は、次章で説明する 4T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサと共通であるので、詳細説明は、そちらで行う。

3.3.4 感度評価方法および結果

感度評価は中心波長 525 nm の LED (Stanley Electric Co., Ltd., UG5305S) を光源として実施した。使用した LED の発光スペクトルを図 3-27 に示す (Otsuka Electronics Co., Ltd., Multi Channel Photo Detector MCPD-3700 で測定)。この波長は、デジタル ELISA において蛍光物質として使用される代表的な化合物である

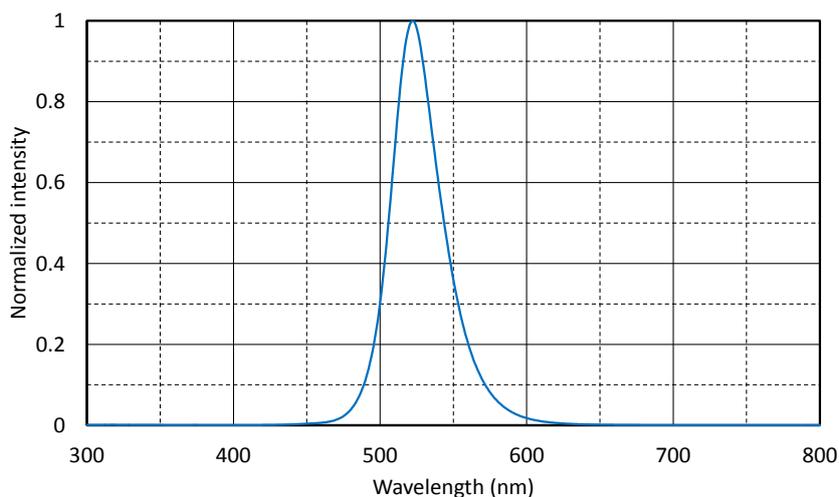


図 3-27 使用した 525 nm LED の発光スペクトル

フルオレセインの蛍光スペクトルに近いので選定したものである。

LED 光を CMOS イメージセンサ全面に均一に照射するために図 3-28 のような LED 光源付きミニ暗室ボックスで直径 2 cm の拡散板を介して照射している。

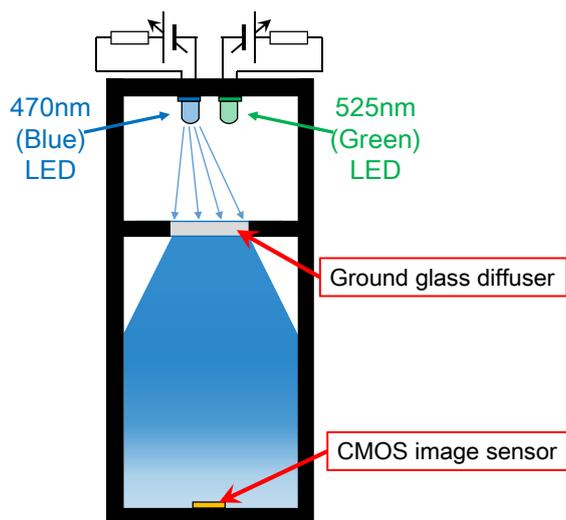


図 3-28 LED 光源付きミニ暗室ボックス 模式図

装置は、2色の LED (各 3 個) を備えているが、ここでの評価では 525 nm LED

のみを点灯させて使用している。拡散板 (Ground glass diffuser) と評価対象となる CMOS イメージセンサの距離は 16 cm としている ($F = 16 / 2 = 8$)。ミニ暗室ボックスは黒色のアクリル板を加工して作製しているが、かなり反射するので、ボックス内壁は、黒色の導電性スポンジで内張りしている。

LED を発光させた状態でミニ暗室ボックスを白色机上で持ち上げた様子を図 3-29 に示した。ミニ暗室ボックスの開口部は一辺 5.7 cm の正方形である。評価する際には、CMOS イメージセンサは開口部の中心にセットする。

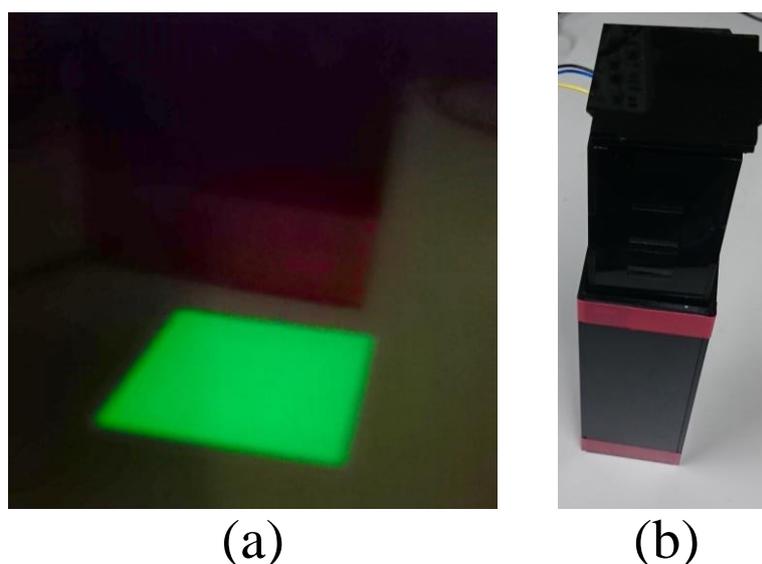


図 3-29 LED 光源付きミニ暗室ボックス
(a) 持ち上げて白色机に照射した様子、(b) 装置全景

光源の光強度測定

光強度測定は、上記のミニ暗室ボックスの中央部にパワーメータ (Thorlabs Inc, PM100USB, 受光部は直径 9.5 mm の円形) を実際の評価時に CMOS イメージセンサが配置される場所に置き測定した。パワーメータの受光部には、ほぼ空間的に均一に照射されているので、測定された光強度と受光部面積から光強度に換算することができる。LED 電流値と測定された光強度には再現性のよい相関があるので、CMOS イメージセンサ評価時は LED 電流値から光強度を換算することができる。

感度評価結果

2つの製造プロセスによって作製した 4T-APS CMOS イメージセンサの感度測定を行った。同時に、前項で説明した 3T-APS CMOS イメージセンサも測定し比較した。それらの結果を図 3-30 に示す。撮像はフレームレート 20 fps の動画撮影モードで行った結果であり、横軸は、単位面積 (m²) 当たりの光強度 (W/m²)

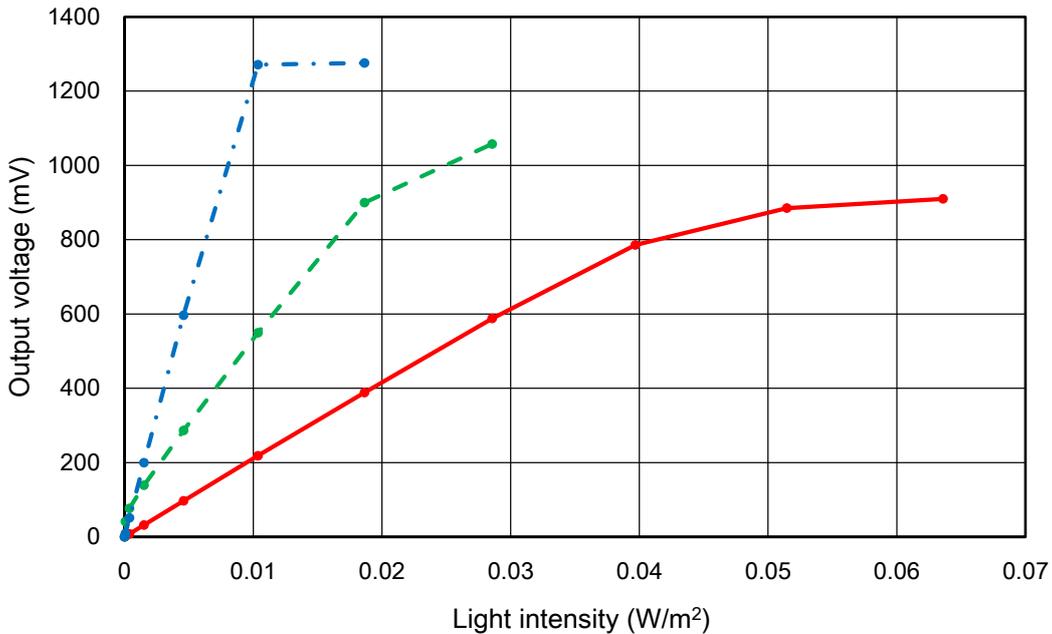


図 3-30 光強度と出力電圧の関係

(赤実線)3T-APS、(緑破線)4T-APS(TSMC)、(青一点鎖線)4T-APS(spro)

としている。また、縦軸は、アナログ出力を AD 変換した画素値を実際の電圧変化量に換算して表示している。

小型デジタル ELISA 装置における蛍光検出の場合は、蛍光光子が何個フォトダイオードに入射されるのかを把握しておくシステム設計時に便利である。入射光波長を 525 nm の単波長であるという近似を行うと撮像時間（フレームレート）とフォトダイオードの面積から1つのフォトダイオードに入射する光子の数を算出することができる。1個の光子のエネルギー E は、

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (3-5)$$

で表される。ここで h はプランク定数、 c は光速、 λ は光の波長である。

波長 525 nm の場合、1 個の光子エネルギーは 3.78×10^{-19} [J]となる。この

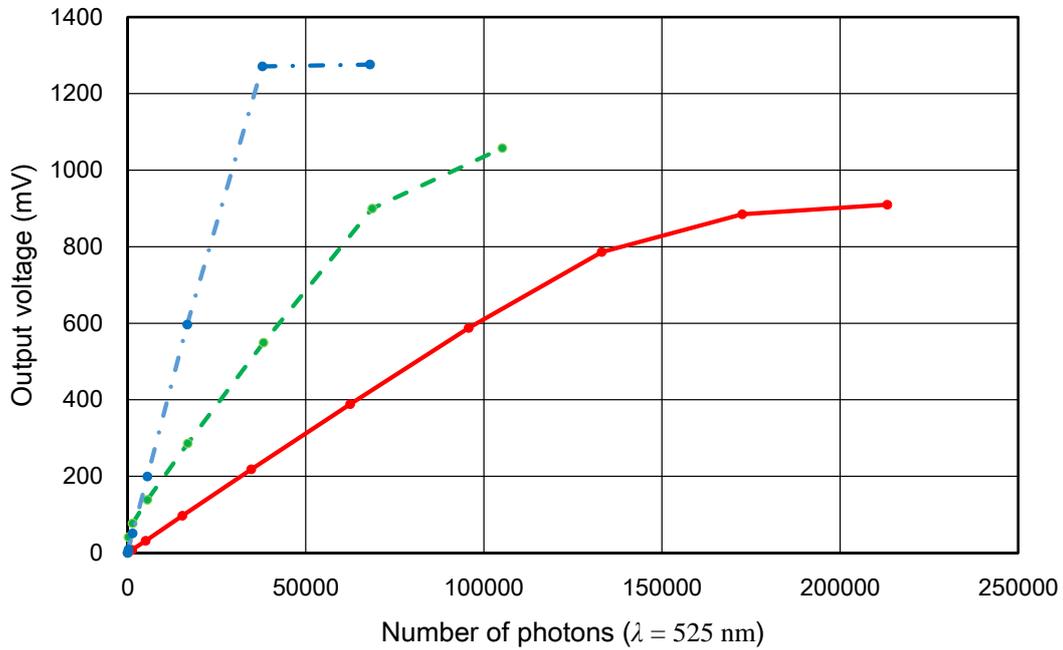


図 3-31 入射光子数と出力電圧の関係

(赤実線)3T-APS、(緑破線)4T-APS(TSMC)、(青一点鎖線)4T-APS(spro)

値を用いて、光強度を 1 フレーム当たりフォトダイオードの面積に入射される光子数に換算できる。図 3-31 には、横軸を光子数に換えたグラフを示した。また、表 3-4 には、これらのグラフ作成の元データを示した。

表 3-4 光強度と出力電圧の関係一覧表

PD面積 (μm^2)	3T-APS		4T-APS (TSMC)		4T-APS (spro)	
	24.56		28.0748		27.8286	
光強度 (W/m^2)	光子数 (*)	出力電圧 (mV)	光子数 (*)	出力電圧 (mV)	光子数 (*)	出力電圧 (mV)
0.000.E+00	0	0.0	0	0.0	0	0.0
6.667.E-05	224	1.6	246	41.3	243	9.2
3.748.E-04	1257	8.1	1381	76.9	1369	50.9
1.512.E-03	5069	31.9	5570	138.8	5521	199.5
4.580.E-03	15354	97.0	16872	286.2	16724	596.6
1.036.E-02	34725	218.4	38157	549.5	37823	1271.1
1.864.E-02	62483	388.7	68659	899.8	68057	1275.8
2.855.E-02	95735	587.8	105198	1057.8		
3.969.E-02	133055	785.9				
5.145.E-02	172504	885.0				
6.360.E-02	213229	909.9				

(*) 1フレーム当たり1つのフォトダイオードに入射する光子数

光強度が 1.5 mW/m^2 程度ところでのフォトン数に対する出力画素値の変化量からこれらのセンサのフォトン→出力変換ゲインを算出すると、3T-APS(AMS)、4T-APS(TSMC)および 4T-APS(spro)でそれぞれ 6.3、17 および $36 [\mu\text{V}/\text{photon}_{525}]$ となった。

3.3.5 テンポラリーノイズと検出限界

静止した被写体のムービー画像からノイズ性能を見積もることができる。

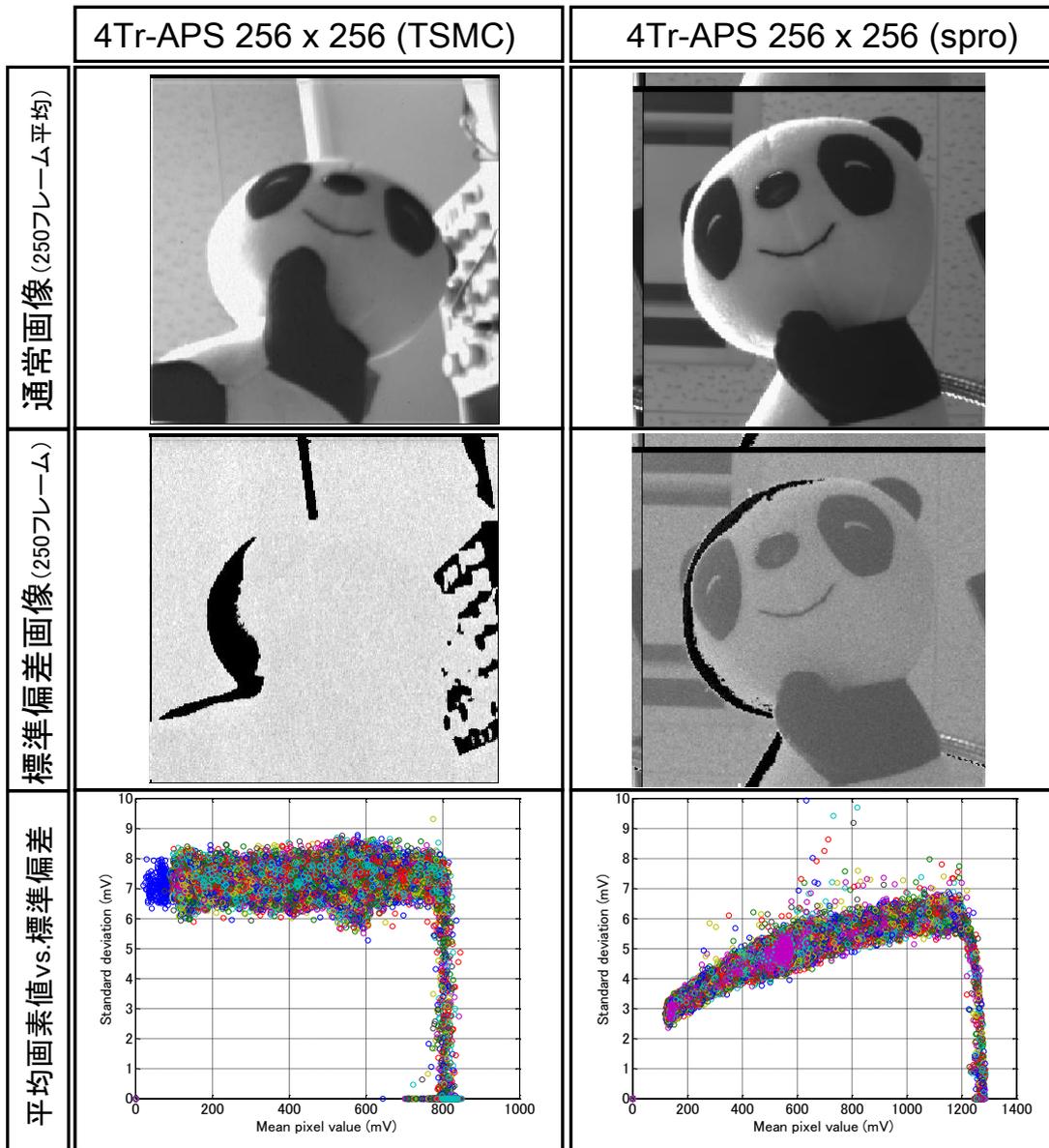


図 3-32 テンポラリーノイズの比較

図 3-32 に、固定した被写体（パンダ）の連続 250 フレームの画像（20 fps）から得られた平均値画像と画素毎の時間変動バラツキ（テンポラリーノイズ）の標準偏差を画像化したものを示した。標準偏差画像は、標準偏差の大きい画素を明るく、小さい画素を暗く表示するように設定している。最下段のグラフは、各画素の平均値と標準偏差をプロットしたもので、256×256 画素分すべてがプロットされている。

4T-APS(spro)は、画素値が高いほどノイズレベルが上昇している。これは、光ショットノイズによるものと考えられる。光ショットノイズは、入射光子数のゆらぎでありポアソン分布で仮定されるので、画素値の平方根に比例して大きくなる。暗時のバラツキは、暗電流ショットノイズや読み取り回路から発せられるバラツキであると考えられる。

4T-APS(TSMC)の場合、画素値に依らずバラツキが大きくなっている。これは、回路設計に起因するものである。リセット電位と 2 段目ソースフォロワ回路の Pch MOS トランジスタ M_{BP} へ供給する電位を同電位に設定しラインを共用したことで、リセット信号がノイズ源になっていることが大きな原因であると考えている。

テンポラリーノイズレベルとフォトン→出力変換ゲインが算出されたので、検出限界を見積もることができる。波長 525 nm の蛍光の変化が何個のフォトンが入射されたときに検出可能かを、変化量がノイズの標準偏差 (σ) を超えたら検出可能として計算した。Dark（画素値 0）の場合と、飽和画素値の 50% の明るさの場合での最小検出可能フォトン数を表 3-5 にまとめた。

表 3-5 フォトン→出力変換ゲインと蛍光検出限界

	3T-APS (AMS)	4T-APS (TSMC)	4T-APS (spro)
フォトン→出力変換ゲイン($\mu\text{V}/\text{photon}_{525}$)	6.3	17	35.7
飽和画素値(mV)	800	800	1200
時間ノイズ標準偏差 σ @dark (mV)	0.7	7.2	1.7
検出可能最小フォトン数@dark	110	420	48
時間ノイズ標準偏差 σ @50% (mV)	1.9	7.3	5.0
検出可能最小フォトン数@50%	300	430	140

※ @50% : 飽和画素値の50%の光強度の場合

※ 検出可能最小フォトン数 = σ/gain

4T-APS(spro)の蛍光検出能力が一番高いことがわかる。これは 3T-APS に比べてノイズは高くなっているが、それ以上に感度が上がっているためである。

4T-APS(spro)での飽和画素値の 50%光強度の場合、140 個のフォトン入射がないと検出できないということになるが、これは、単独フレームの情報で検出使用とした場合のフォトン数である。テンポラリーノイズは平均値一定のままランダムに発生するノイズと考えられるため、複数フレームを積算することで検出限界を改善することが可能である。N フレーム積算するとノイズは \sqrt{N} 分の 1 に

減ると考えられ、例えば 100 フレーム積算によってノイズレベルは 10 分の 1 になると考えられる。すなわち、4T-APS(spro)50%光強度で、100 フレーム積算すると 14 個のフォトン検出が可能になると考えられる（検出限界を $3\sigma/\text{gain}$ とした場合、42 個となる）。

3.4 考察とまとめ

小型デジタル ELISA システムにおける蛍光検出器である CMOS イメージセンサの性能の最適化を 2 つの観点から行った。ひとつは固定パターンノイズ低減、もうひとつは 4T-APS 構成を採用することによる高感度化である。

デジタル ELISA における蛍光観察では、ほぼ定常状態を観察するので、高感度化のために複数の画像を積算することにより低ノイズ化することができる。これにより時間変動ノイズ（テンポラリーノイズ）の低減は可能である。しかしながら、この手法では、CMOS イメージセンサ各画素のトランジスタの製造出来ばえバラツキによる空間的に固定化されたノイズ（固定パターンノイズ、FPN）は残ってしまう。したがって、低 FPN の CMOS イメージセンサが有効である。また、一般的に CMOS イメージセンサでは、相関二重サンプリング（CDS）回路による FPN 除去が行われているが、この方法ではトランジスタのしきい値バラツキは除去できるが、ゲインのバラツキは除去できない。微小な変化量を画素間で比較する場合にはゲイン FPN も除去しておかなければならない。

今回、トランジスタの製造バラツキを低減させるために使用するトランジスタのサイズとレイアウトを最適化した。一般に MOS トランジスタのバラツキの標準偏差は、トランジスタサイズに相関があり、チャンネル長 L とチャンネル幅 W に対して、 $1/\sqrt{L \cdot W}$ に比例することが知られているが、実際には、孤立したパターンなどでは、この関係以上にバラツキが大きくなる。回路特性は維持または向上しながら配置上可能なところは極力大きなトランジスタを使用し、ポリシリコンダミーパターンを随所に挿入することで製造バラツキの低減を試みた。その結果、トランジスタサイズ変更だけで見積もられる以上の改善ができた。従来のセンサと比較して、カラム FPN は、約 1/16 に、画素 FPN は、約 1/5 に低減した。

この CMOS イメージセンサにより、FOP 搭載型小型デジタル ELISA 装置における画像処理の品位を向上することができた。また、この CMOS イメージセンサは、自由行動マウスでの埋植コンタクトイメージングにおいて従来センサでは不可能であった血流イメージングにも成功している[14]。

4T-APS による高感度化では、画素内でフォトダイオードから低容量のフローティングデフュージョン (FD) にフォトキャリア (電子) を転送する構成を製作した。設計に当たっては、特に高感度化のために FD 面積を極力小さくすることを試みた。これにより、従来の 3T-APS 構成の CMOS イメージセンサと比較して、5 倍以上の感度向上を達成した。感度向上の最大の要因はもちろん FD の追加であるが、これ以外にも、同時に画素情報を出力に伝達するためのソースフォロワ回路にも改良を加えた。製造プロセスの特徴を活かし、MOS トランジスタのバックバイアス効果によるしきい値変動を抑えることのできる構成とすることで、各段の伝達ゲインおよびそのリニアリティを向上させている。

4T-APS 化においては、フォトキャリア転送のためにスイッチ (MOS トランジスタ) がひとつ増えるため、テンポラリーノイズは、わずかに悪化しているものの、感度向上の効果が、それ以上に大きく、微小蛍光フォトンの検出能力を 2 倍以上向上することができた。

第 4 章 蛍光検出のための積層フォトダイオード CMOS イメージセンサ

4.1 はじめに

デジタル ELISA の蛍光反応においては、酵素を含むフェムトリッターサイズの反応チャンバー（fL-チャンバー）では、蛍光物質がほぼ等速で生成され続けるので、蛍光強度は経時的に増加する。従って長時間蛍光反応を続ければ検出は容易になってくる。しかしながら、実際の臨床現場では極力、短時間で検出することが望ましい。光退色に細心の注意が必要であるが、励起光強度を増加させることは、短い時間の検出を達成するのに有効である。しかし、高強度の励起光は、フィルタで減衰しきれずに、CMOS イメージセンサに到達してしまうという問題がある。この様な場合、漏れた励起光を感知しながら、その中の小さな蛍光シグナルを拾う必要がある。

CMOS イメージセンサ自体が、色を認識できれば、デジタル ELISA の持つ高感度の性能を維持しつつ、高特異度（誤検出が少ない）を達成することが可能になる。個々の fL-チャンバーの占有面積は CMOS イメージセンサの画素面積と同程度であるため、画素毎に一色フィルタが割り当てられるオンチップカラーフィルタは、この用途には適していない（例えば、一般的なデジタルカメラ用 CMOS イメージセンサ等に用いられる図 4-1 のようなバイヤーフィルタ（Bayer filter）） [60], [61] 。

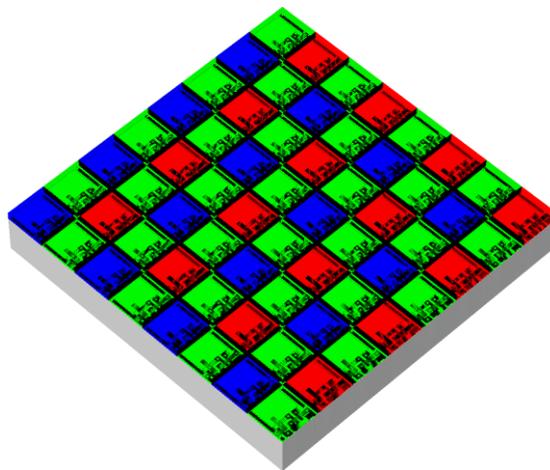


図 4-1 バイヤーフィルタのイメージ図

オンチップカラーフィルタを用いずに光の波長を見分ける手法として、シリコン中への光の侵入長の波長依存性を利用したものがある。図 4-2 は、シリコ

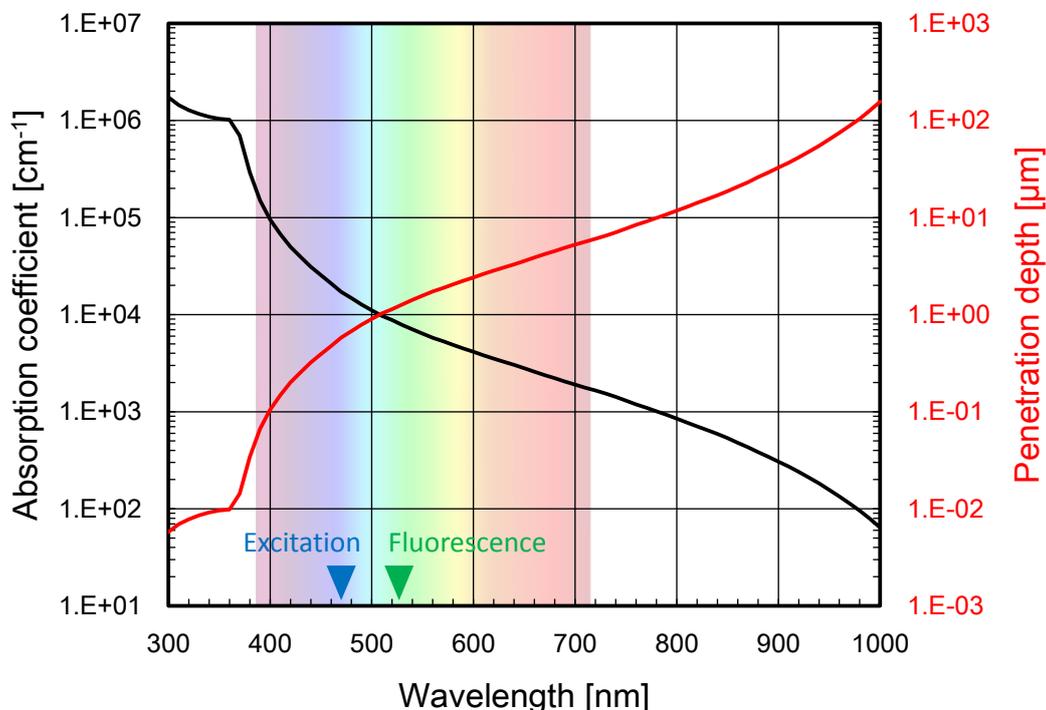


図 4-2 シリコンの光特性（光の吸収係数と侵入長の波長依存性）

ンの光学特性（光の吸収係数と侵入長の波長依存性）を示したものである[62]。長波長ほどシリコン中へ深く侵入していくことが分かる。図中には、デジタル ELISA で用いられる代表的な蛍光物質であるフルオレセインの蛍光観察で使われる励起光波長（470 nm）と発せられる蛍光中心波長（525 nm）を記している。470 nm の光の侵入長は約 0.6 μm 、525 nm の光の侵入長は約 1.2 μm である。

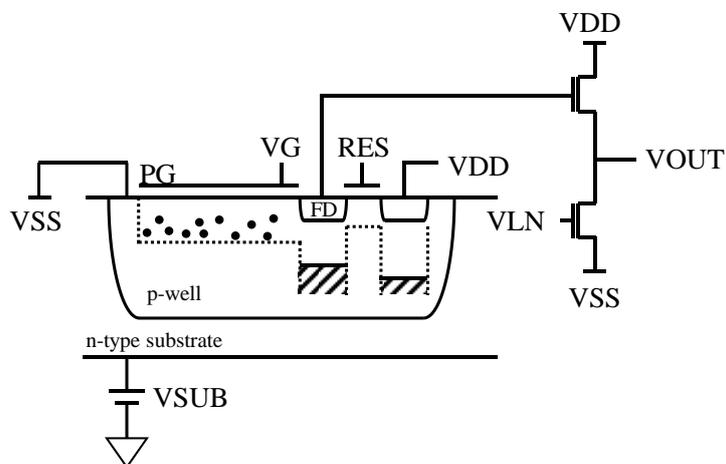


図 4-3 フォトゲート電位による変調を利用した蛍光観察用センサ[63]

空乏層の深さを変化させることができれば、光キャリア発生深さに対して感度を変化させることができる。空乏層の深さを制御するためにフォトゲート構造を使用したフィルタレス蛍光観察のためのセンサも開発されている[63]–[66] (図 4-3 に、発表されたデバイスの構造図を示す)。しかしながら、このフィルタレス蛍光センサは、専用の製造プロセスが必要となる。

また Merrill は、フォトダイオードを積層してそれぞれのダイオードの出力を比較することでフルカラー映像の撮れる図 4-4 のようなイメージセンサを開発している[67]。これは、いわゆる FOVEON センサ[68]–[70]と呼ばれるもので、現在はさらに進化した形になりデジタルカメラに採用され市販されている[71]。

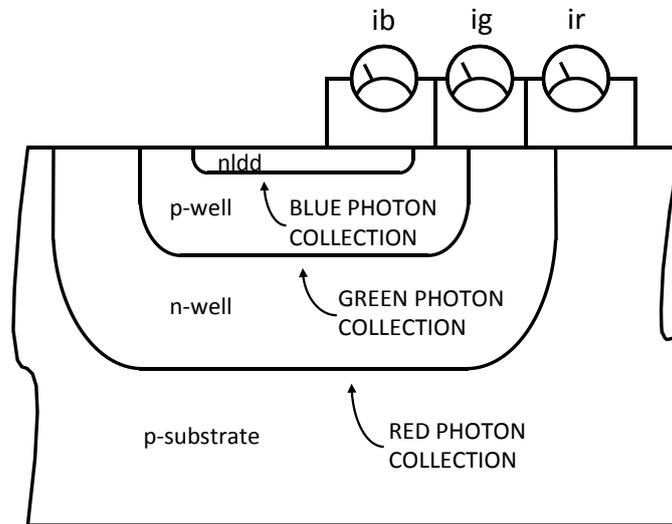


図 4-4 トリプルウェルを使ったフルカラーセンサ (FOVEON センサの原型) [67]

本章では、これに近い構造であるが、シリコンファンダリで利用できる一般的な CMOS プロセス技術を用いて、蛍光検出に適した積層フォトダイオード構造の CMOS イメージセンサを作製することができたので報告する。

4.2 3T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサ

はじめに作製したものは、前章で報告した 3T-APS CMOS イメージセンサと同様の画素回路構成を持つもので、0.18 μm ミックスドシグナル用 CMOS プロセス技術を使用したものである。ミックスドシグナル用とは、アナログ回路とデジタル回路が同一チップに混載されている IC に適しているということである。プロセスの特徴は、深い N 型ウェル拡散層 (DNW) を備えていることで、DNW でデジタル回路部を囲い込むことで電氣的に分離することが可能となっている。これにより、デジタル部から発生するノイズをアナログ回路ブロックから分離することができる。

この DNW でフォトダイオードを構成することにより、フォトダイオードの積層化が実現できた。なお、ここで使用したプロセスは Taiwan Semiconductor Manufacturing (TSMC) 社の 0.18 μm ミックスドシグナル用 CMOS プロセスである。

4.2.1 設計概要

図 4-5 に作製した 3T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサのブロック図を示す。基本的な構成は前章で示した 3T-APS CMOS イメージセンサと

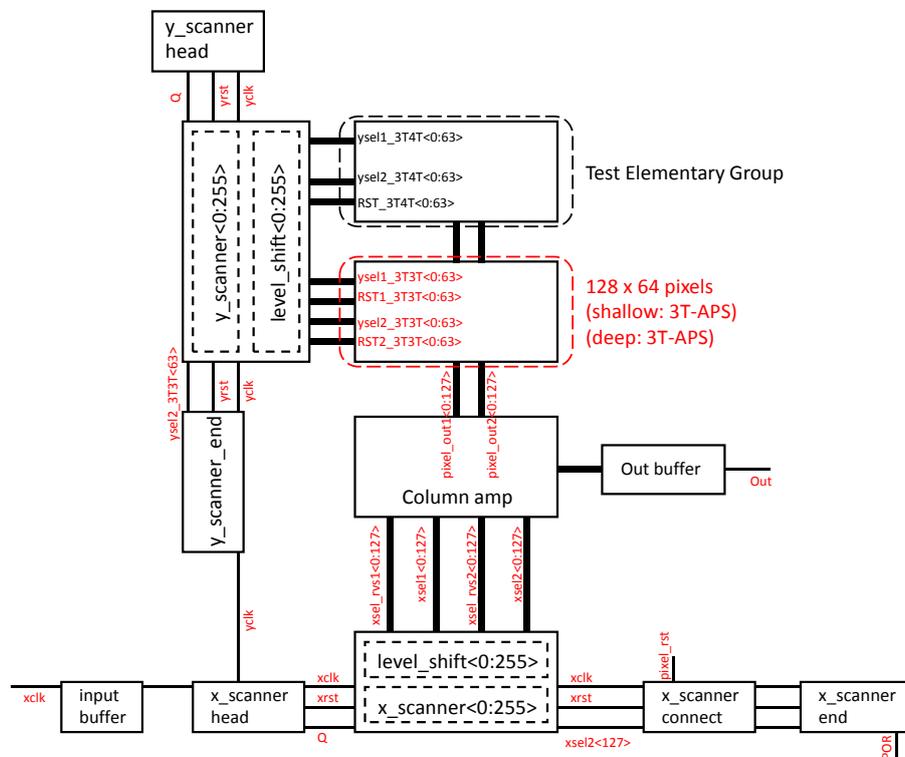


図 4-5 3T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサ ブロック図

同様であるが、画素から出力にいたるアナログ回路部は 3.3 V で動作するのに対し、x-スキャナおよび y-スキャナを 1.8 V-CMOS 回路により構成しているため、レベルシフト回路により 3.3 V に昇圧した信号を画素に送る構成になっている。図中には記入していないが、オプション端子として、外部から 3 段のソースフォロワのそれぞれのバイアス電圧を可変できる端子と外部パワーオンリセット端子も備えている。1 画素に対して、2 系統のリセット信号およびセレクト信号が割り当てられており、積層した 2 つのフォトダイオード（シリコン表面側のフォトダイオードを PD1、深いところに配置したフォトダイオードを PD2 とする）

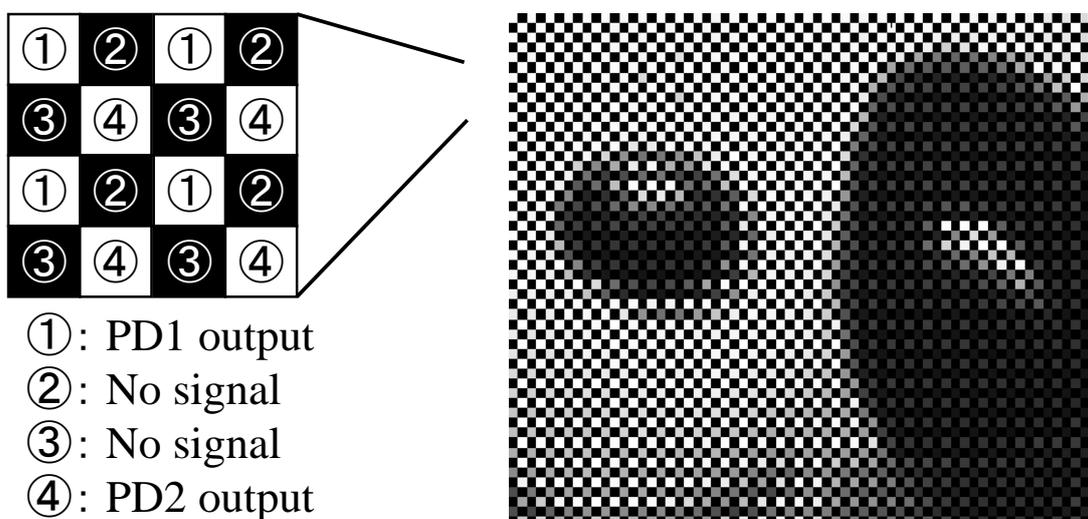


図 4-6 通常処理を行った場合の積層フォトダイオード CMOS イメージセンサ画像

を個々に制御している。出力は、1 端子 (Out) からのアナログ出力になっているので、前章で紹介したような通常の CMOS イメージセンサと同様に AD 変換して画像にすると図 4-6 のような画像になる。このため、PD1 と PD2 のそれぞれ個別情報を取り出すためには、図 4-6 中の①と④の画素情報をそれぞれ選択取得することになる。

4.2.2 3T-APS 積層フォトダイオード画素レイアウト

積層フォトダイオードは、シリコンファンダリ（TSMC）から支給される標準デバイスではないので、プロセス中に存在する拡散層を選択して作製する必要がある。図 4-7 に画素レイアウトと断面図を示した。画素内でフォトダイオード

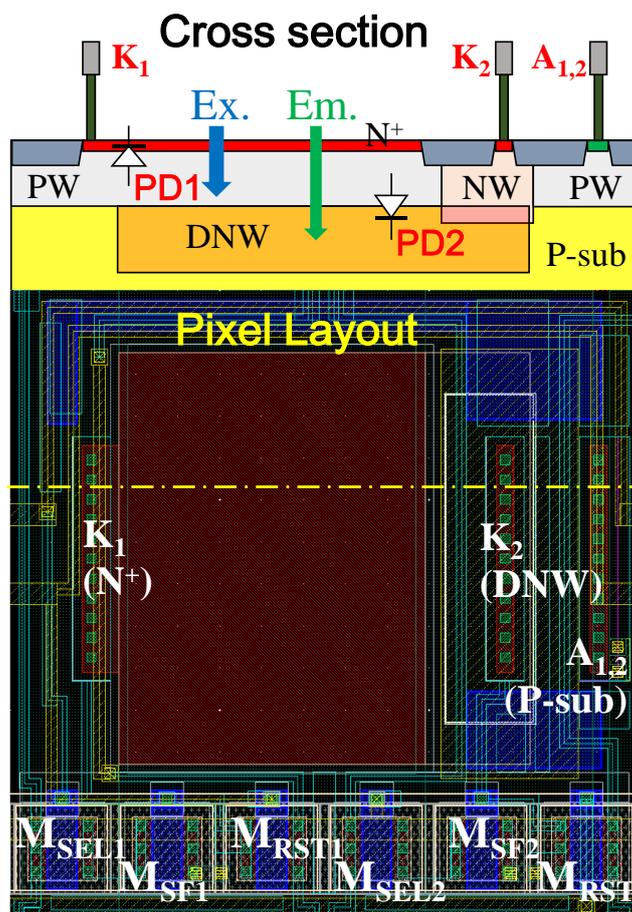


図 4-7 3T-APS CMOS イメージセンサ画素レイアウトおよび断面図

ド 2 個を深さ方向に積層した構造（浅い側 PD1 と深い側 PD2）を作っている。断面図において、N⁺は、Nch MOS トランジスタのソース／ドレインに使用される拡散層である。PW は、Nch MOS トランジスタのウェル（バックゲート）として使用されている拡散層である。また、DNW は、先に説明したデジタル回路ブロックを電氣的に分離するために使用される深い N 型ウェル層である。PW はシリコン基板（P-sub）と接しており、グランド電位に固定される。このためアノードは PD1、PD2 どちらも共通の端子で接続している。N⁺は、PD1 のカソードとして使用されている。PD2 のカソードは DNW で形成されているが、直接シリコン表面から電極を取ることできないので、NW 層を介して電極を取り出している。なお、NW と PW は、濃度が低くオーミックコンタクトが取れないので、それぞれ N⁺と P⁺拡散層で補強している。

画素の回路図を図 4-8 に示す。PD1 と PD2 は、それぞれリセットスイッチ (M_{RST1} と M_{RST2}) を備えており、カソード電位読み取りのためのトランジスタもそれぞれが備えている (M_{SF1} と M_{SF2})。

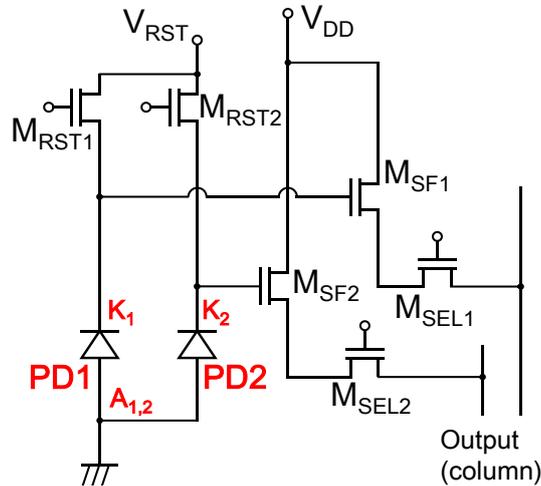


図 4-8 3T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサ画素回路図

作製したチップの表面写真を図 4-9 に示した。また、諸元を表 4-1 にまとめた。

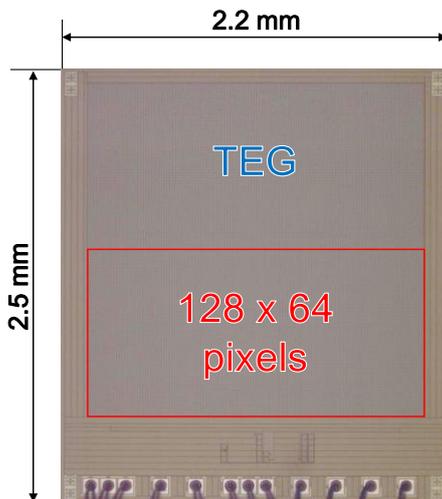


図 4-9 チップ写真

表 4-1 作製した CMOS イメージセンサ諸元

Process technology	0.18 μm 1-poly 6-metal CMOS for mixed signal
Supply voltage (V)	3.3 (analog) / 1.8 (digital)
Chip size (mm^2)	2.2 x 2.5
Pixel type	3-transistor active pixel sensor
Pixel size (μm^2)	15 x 15
Array size	128 x 64
Photodiode type	Stacked 2 photodiodes N ⁺ /PW (Top) and PW/DNW (bottom)
Fill factor	31.8%, 2 layers

4.2.3 3T-APS 積層フォトダイオードセンサによる画像取得

作製した CMOS イメージセンサはレンズをつける事で、簡単なデジタルカメラを作ることができる。今回はバリフォーカルレンズ（ズーム、フォーカス、絞りが可変）を使って撮影を行った。撮影は、通常の天井蛍光灯照明下で、図 4-10 のような構成で撮影を行っている。

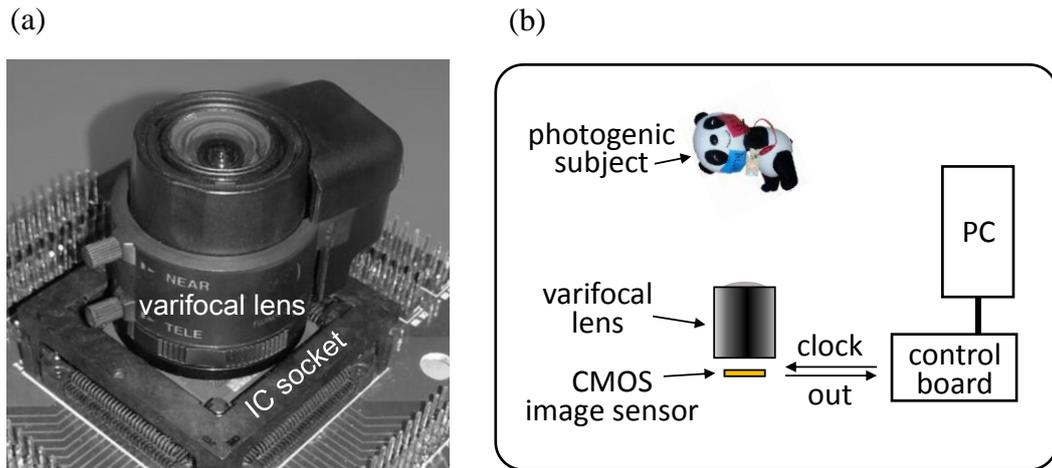


図 4-10 撮影のセットアップ

(a)センサ上にバリフォーカルレンズを配置、(b)全体の模式図

PD1 および PD2 のそれぞれの出力値で構成した画像を図 4-11 に示した。(a) は PD1 の画像、(b)は PD2 の画像である。これらの画像で見られるように赤色系

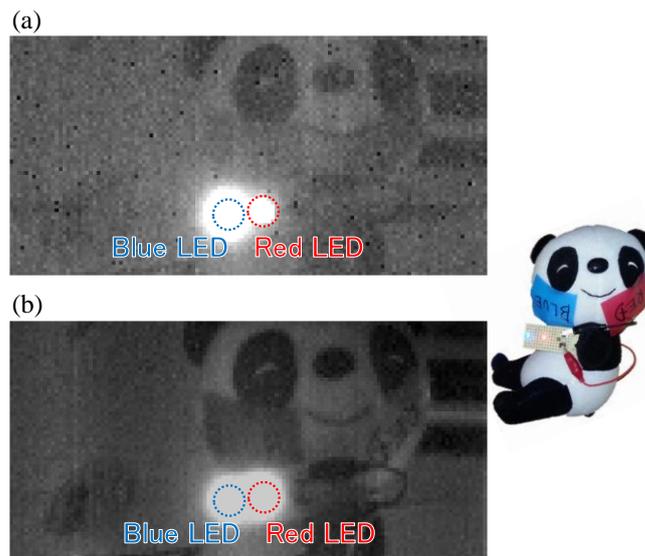


図 4-11 3T-APS CMOS イメージセンサによる取得画像

(a)PD1 画像、(b)PD2 画像

(長波長)の所が、シリコン中の深い位置に形成されている PD2 の画像において明るくなっていることが分かる(画像中で赤色のテープ「RED」と赤色 LED の部分が明るくなっている)。逆に青色のテープは PD1 画像においては、明るく写っているに対して、PD2 画像では、暗く写っているのが分かる。PD1 と PD2 の画像にこのような差異があることは、この CMOS イメージセンサが色(波長)を感知する能力があることを示している。特に PD1 の画像でノイズが目立つが、これは、いくつかの画素の PD1 のアノード-カソード間がショートしているためである。これは、PD1 中の比較的大面積の N⁺層(カソード)中に発生した結晶欠陥が原因であると考えられる。

次項では、このセンサが励起光と蛍光を判別できるかどうかを検証する。

4.2.4 LED 光源による蛍光観察模擬評価

2 種の LED (Light Emitting Diode) 光源を用いた蛍光観察の模擬評価を行った。使用した LED の中心波長は、それぞれ 470 (Stanley Electric Co., Ltd., UB3803X) および 525 nm (Stanley Electric Co., Ltd., UG5305S) である。2 種の LED (各 3 個) と CMOS イメージセンサは、図 4-12 のようなミニ暗室ボックスにセットして評価した。(図 4-12 には、2 種類の LED の発光スペクトルと蛍光物質フルオレセイン (FITC) の励起/蛍光スペクトル[72]を示した。代表的な励起/蛍光フィルタ波長も示しているが、励起光フィルタについては、吸収効率は低下するが

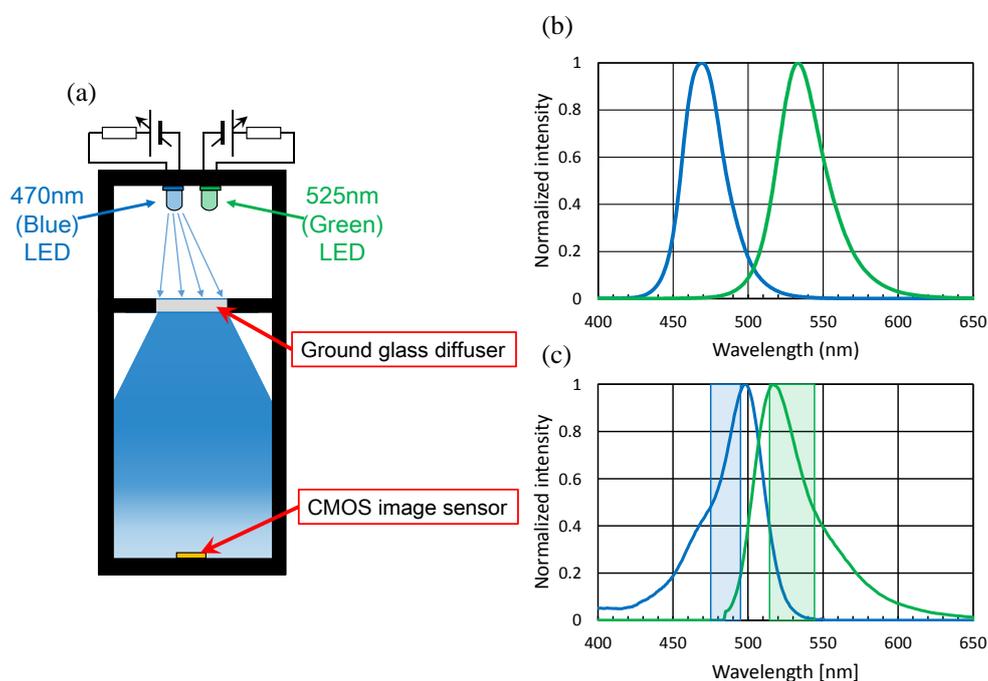


図 4-12 2 波長の LED による評価装置概要
 (a) LED 光源付きミニ暗室ボックス, (b) LED 発光スペクトル
 (c) フルオレセイン (FITC) の励起/蛍光スペクトル
 (ハッチ部は蛍光顕微鏡で使用される代表的な励起/蛍光フィルタ)

短波長側にシフトさせることが可能である。) 拡散板を LED と CMOS イメージセンサの間に配置することにより、CMOS イメージセンサ全面に照射される光強度の均一性を増している。この状態で、種々の LED 強度下で PD1 と PD2 の出力画素値を測定した。

475 および 525 nm の LED 光に対する感度曲線を図 4-13(a)および(b)に示した。出力画素値は 470 nm に対しては PD1 のものが PD2 のものに比べて高く、逆に 525 nm に対しては低くなっていることが分かる。どちらの LED 波長においても、低光強度時の感度が高光強度時に比べて高くなっている。低光強度時には、

カソード電位がリセット電位に近く、高電位になっているためアノード-カソード接合にかかる逆バイアスが大きくなっている。このような状態では、PD1 と PD2 のそれぞれの接合の空乏層が広がってお互いに繋がっていると考えられる。

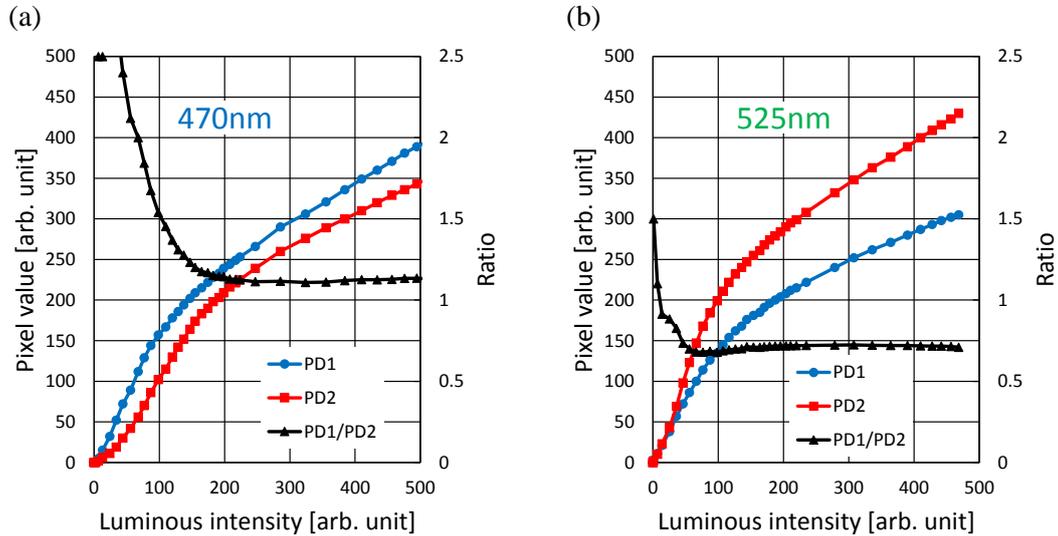


図 4-13 PD1 および PD2 の感度曲線。光源(a)470 nm LED (b)525 nm LED

空乏層幅が大きく広がるため、寄生容量が減少し、感度が上がっていると考えられる。PD1 と PD2 の出力画素値の比は、高光強度時にほぼ一定となっている。これは、PD1 と PD2 の空乏層が離れてしまった後は、光キャリアは PW 層の最大不純物濃度の位置で PD1 と PD2 に分配されるようになっているからだと考えられる。

図 4-14 は、470 および 525 nm の LED をそれぞれ単独で照射した場合と同時

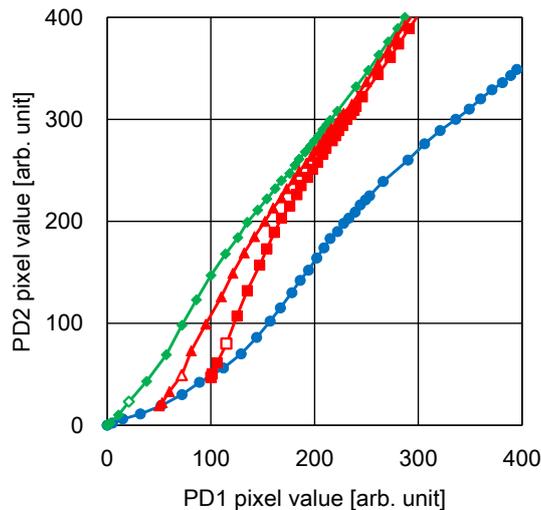


図 4-14 PD1 と PD2 の出力画素値の相関

(青) 470nm LED のみ、(緑) 525 nm LED のみ (赤) 両 LED 混色

照射した場合の、PD1 と PD2 の出力画素値の相関をとったものである。図 4-14 中の一番下の曲線（青）は、470 nm LED 単独照射の場合の相関曲線であり、一番上の曲線（緑）は、525 nm LED 単独照射の場合の相関曲線である。これらの曲線は図 4-13(a)、(b)と同じデータをプロットしたものである。図 4-14 中の真ん中の曲線（赤）は、470 nm LED の光強度を固定した状態で、525 nm LED の光強度を徐々に上げていった場合の相関曲線である。ここでは、PD1 出力画素値が 50 および 100 になる 470 nm LED 光強度に固定したものを示している。グラフの曲線中には、どのデータポイントが同じ 525 nm LED 光強度のものであるかを明確にするため、白抜きシンボルを入れている。

図 4-14 の相関曲線より励起光中の蛍光を判別する能力について議論できる。ある点における相関曲線の傾きは、これらの曲線を 6 次の多項式で近似して微分することで算出することができる。例えば、図 4-14 において、PD1 画素値が 100 の位置の曲線の傾きは 2.38（青曲線）、0.78（赤曲線）となる。470 nm LED 光強度固定で、525 nm LED 光強度を上げていったとき、PD2 画素値の赤曲線の青曲線からの差異は、PD1 画素値の約 1.6 倍の変化が見られということになる。近似誤差やテンポラリーノイズへの注意は必要であるが、PD1 が光強度変化を感知できる状況であれば、励起光中の蛍光を検知することが可能であると言える。デジタル ELISA においては、蛍光反応初期では、どの反応チャンバーも蛍光が無い状態なので、初期状態で PD1 と PD2 の画素値の初期値を取っておけば、この初期相関曲線からの差異の有無によって出力画素値の変化が励起光の強度変化によるものか、蛍光強度の変化によるものなのかを判別することができる。

積層フォトダイオード構造により、検出した光が励起光によるものか蛍光によるものかを判別する能力を持つことができることを示すことができたが、ここで作製したものは、特に光強度が高い部分の感度が低いため励起光除去が十分にできた場合でしか使えない。また、PD1 画素値と PD2 画素値の比が光強度によって変化するためリファレンス曲線の近似誤差が大きくなる懸念がある。次項では、これらを改善した 4T-APS 構成の積層フォトダイオード CMOS イメージセンサを紹介する。

4.3 4T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサ

4.3.1 設計概要

4T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサは、東北大学を中心とした大学連携 CMOS イメージセンサ作製プロジェクト（以降 **spro** とする）で使用できる CMOS イメージセンサ用 0.18 μm CMOS プロセスで作製した（前章の 4T-APS CMOS イメージセンサで使用したものと同一プロセス）。このプロセスの特徴は、フォトダイオードの暗電流を抑制できる埋め込みフォトダイオードを標準デバイスとして備えており、3T-APS 積層フォトダイオードで使用したミックスシグナル用プロセスと同様、深い N 型ウェル層（DNW）を備えていることである。また MOS トランジスタに使用される LDD 構造用の比較的濃度の低い拡散層を単独でフォトマスクに反映できるので、拡散層の選択自由度が高いのも特徴である。

CMOS 部は、1.8 V 系と 3.3 V 系が使用可能であるが、今回は、すべて 3.3 V 系を使用して、x-および y-スキャナ部などデジタル回路を作成した。

以下に、出力バッファ回路のゲイン向上や静電放電（ESD）保護回路について新規設計を行っているので概要を説明する。

画素設計については、レイアウトと断面構造について示す。

4.3.2 出力バッファ

今回、DNW 層を活かして、アナログ出力端子部の Nch MOS トランジスタで構成されるソースフォロワ回路（出力バッファ）のゲインを向上したので詳細内容を報告する。（前章の 4T-APS CMOS イメージセンサでも同じものを使用）

回路とレイアウト

図 4-15 に回路図を示す。基本構造は、ここまでに紹介した CMOS イメージセ

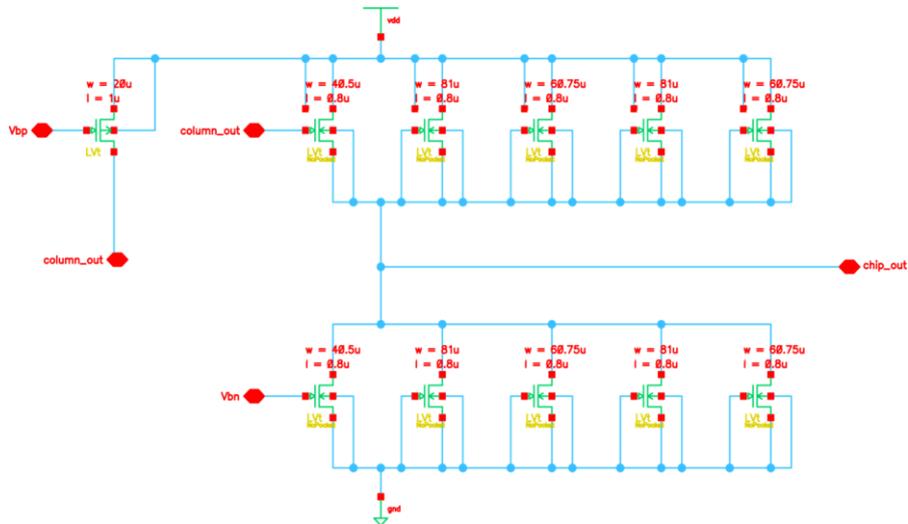


図 4-15 出力バッファの回路図

ンサと同様、静電放電（ESD）保護機能を備えている。パターンレイアウトは通常の ESD 保護素子(ggNMOS)と同様で、ドレインコンタクト窓とゲートポリシリコンの距離を 2 μm 離して電流均一化のためのバラスト抵抗を形成している。

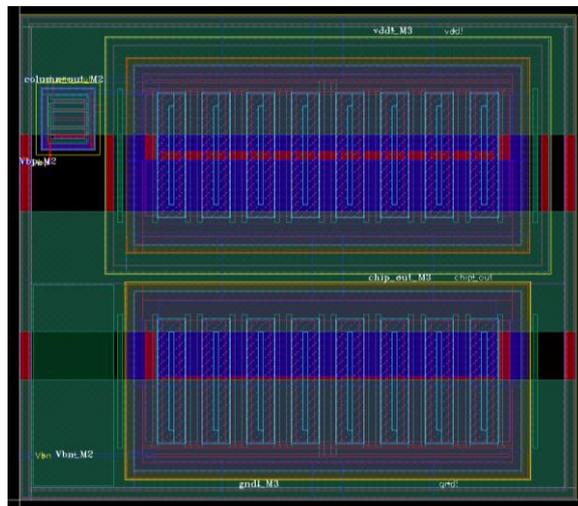


図 4-16 出力バッファのレイアウト図

アクティブな Nch MOS トランジスタ (W/L=40.5/0.8) とオフ Nch MOS トランジスタ (W/L=283.5/0.8) を並列接続することでサージ電流経路を十分な大きさにしている。

従来からの大きな変更点は、電源側の Nch MOS トランジスタを well in well 型のものに変更したことである。DNW (深い N 型ウェル層) により P 型ウェルを共通の GND 電位となる P-epi 層から分離することによってソース電位をウェル電位と同電位に固定することが可能となる。バックバイアス効果によるしきい値電圧変動を無くすことによりソースフォロワのゲインとそのリニアリティの向上ができた。

図 4-16 にはパターンレイアウトを示した。回路動作時は 200 μA 程度の電流しか流さないが、サージ保護時に大電流が流れる経路となるので、引き出し (図 4-15 中の chip_out, gnd, vdd) 配線幅を広く取る必要がある。この対応のため第 3 層目の配線 (MET3) で引き出しやすい構造としている。

Nch MOS トランジスタのバックバイアス効果

ここで、回路シミュレーションによる Nch MOS トランジスタのバックバイアス効果の影響を確認しておく。図 4-17 は、Nch MOS トランジスタ (L=0.6 および 1.0 μm) のしきい値電圧の基板 (P 型ウェル) バイアス依存性を示している。横軸は $[V_{\text{source}} - V_{\text{body}}]$ としている ($V_{\text{body}} = \text{GND}$)。しきい値電圧の変化はソースフォロワのゲインの低下をもたらす。

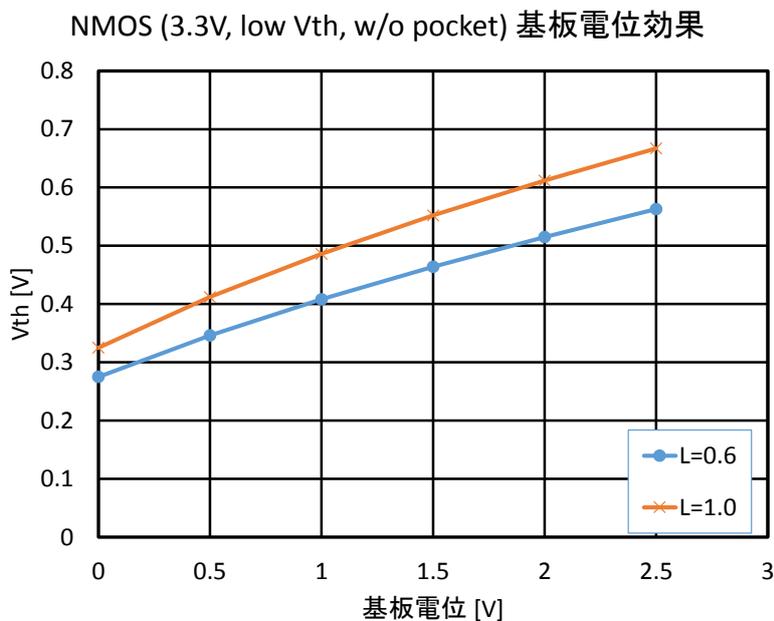


図 4-17 Nch MOSFET バックバイアス効果

基板分離 (well in well) のゲイン向上効果

出力バッファ中の Nch MOS トランジスタで構成したソースフォロワのゲインの変化を比較した。(理想的なソースフォロワでは、ゲインは 1 となる)

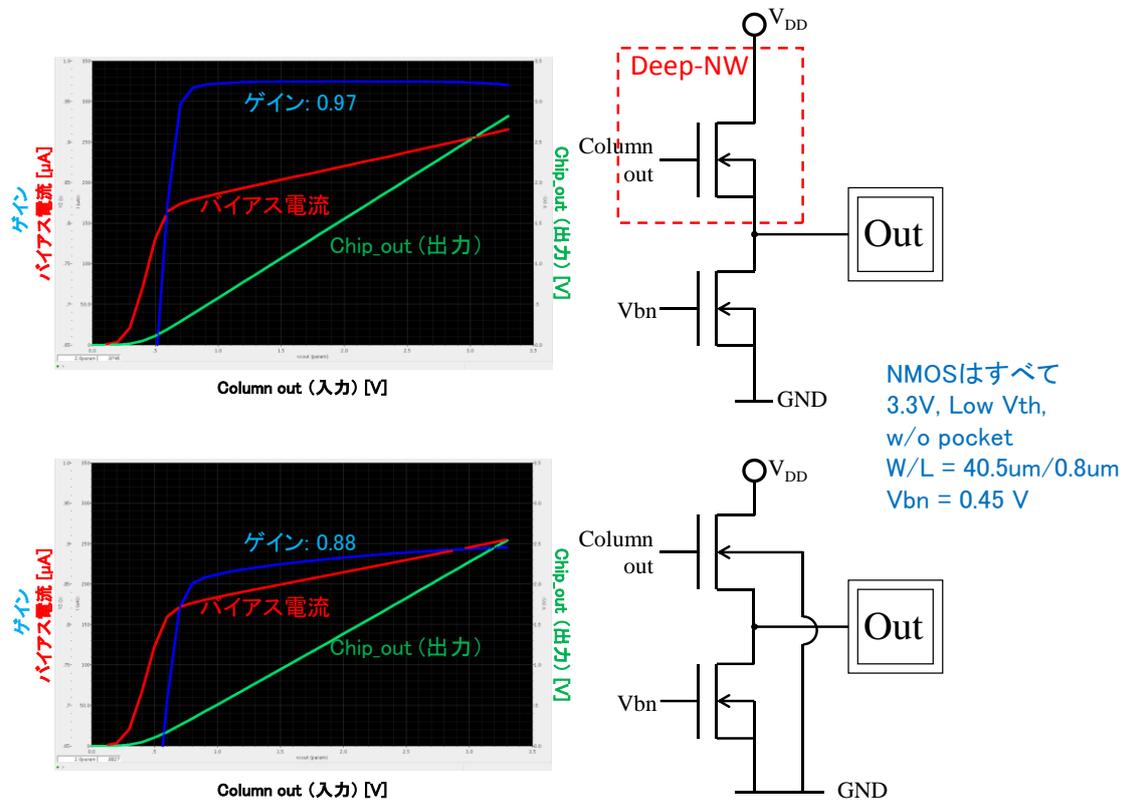


図 4-18 Deep-NW (DNW) の効果 (ゲインとそのリニアリティの向上)

上段 (DNW 有)、下段 (無) グラフの右側は対応する回路図

図 4-18 には、Column_out の電圧を横軸にバイアス電流、chip_out 電圧、ゲイン (chip_out の傾き) をプロットしている。DNW によるバックバイアス効果の低減により、ゲインが約 10% 向上しており、広範囲の入力電圧において、ほぼ一定となっておりリニアリティも向上していることが分かる。

図 4-19 は、W/L=50 に固定した状態で、チャネル長 L を変化させてゲイン変化のようすを比較したものである。チャネル長が短いとチャネル長変調効果によって、GND 側 Nch MOS トランジスタ (バイアス電流源) のドレイン電流のドレイン電圧依存性が大きく (アーリー電圧が低い) ゲインが低下していることが分かる。今回は、L = 0.8 μm を採用した。

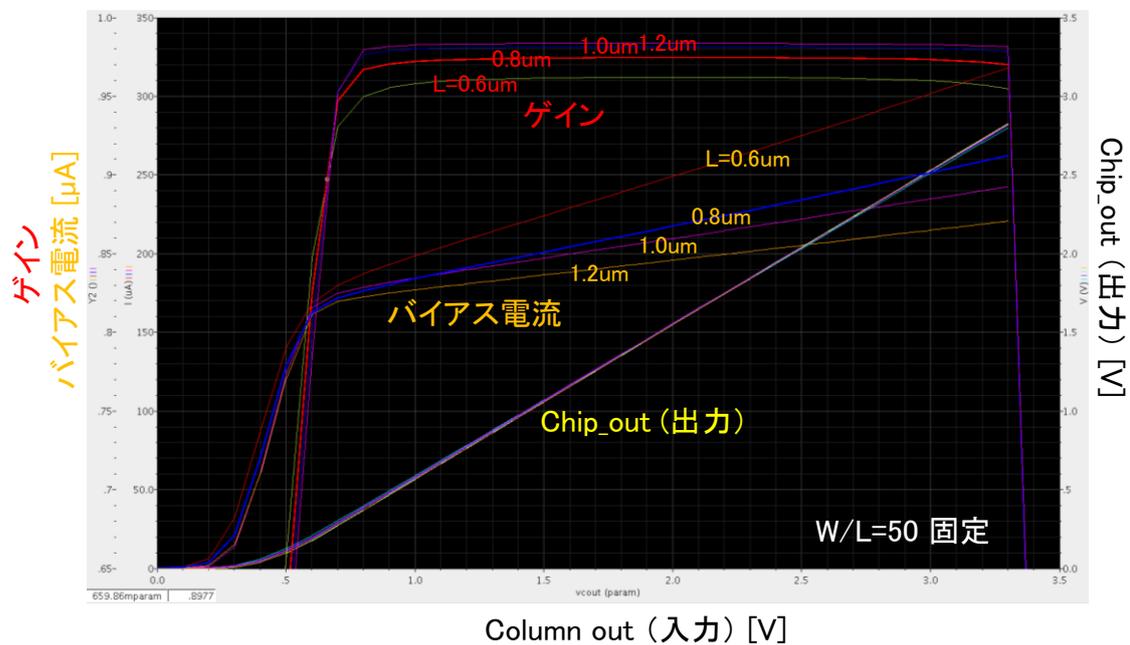


図 4-19 出力バッファ ゲインのチャンネル長依存性

4.3.3 静電放電 (ESD) 保護回路

ESD 保護ネットワーク

主要な 4 端子について ESD 保護素子の配置について説明する (図 4-20)。

- ① 電源-GND 間に ggNMOS (gate grounded Nch MOSFET)
- ② clk 端子 (ゲート入力) には、ローサイドに ggNMOS、ハイサイドに ggPMOS を挿入する。ggNMOS と ggPMOS は、サージ電流印加時の電流の流れを素子内で均一化するためドレイン拡散層を非サリサイド化してバラスト抵抗を持つ形にしているため、サージに対しての反応速度が遅くゲート保護が不完全になる可能性があるため 2nd ESD 保護として電流制限抵抗+サリサイド化 (回路内で通常使用されるものと同じ) された小さい ggNMOS と ggPMOS を挿入。
- ③ Out 端子は、専用の出力バッファ用素子 (前述) により ESD 保護を行うため追加の保護素子は不要

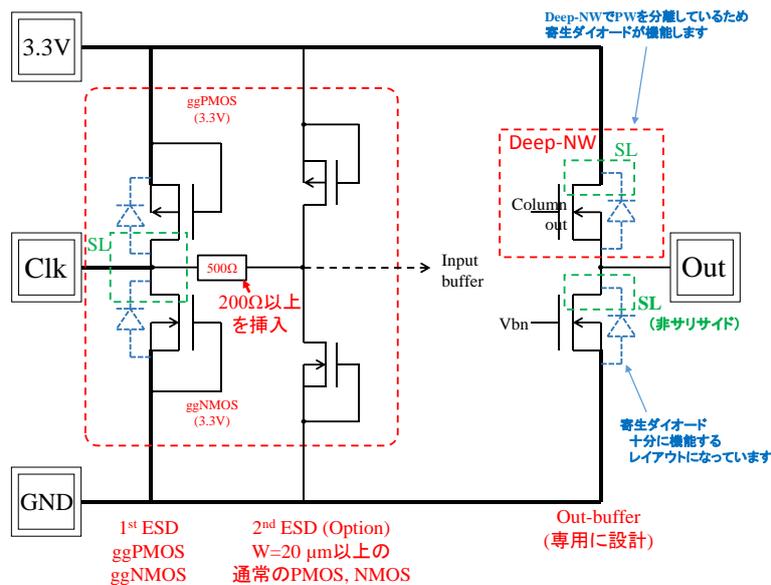


図 4-20 ESD 保護ネットワーク

- ④ オプション端子については、Clk 端子と同様の保護素子を配置

図 4-20 に太線で示したラインはサージ電流経路になるので幅広配線 (10 μm 以上を推奨) にする必要がある。

ggNMOS および ggPMOS の構造

ggNMOS のレイアウトを図 4-21 に示す。図 4-22 は、一部を拡大したもので、ドレイン側の非サリサイド化の設定を示している。ゲート端からドレインコン

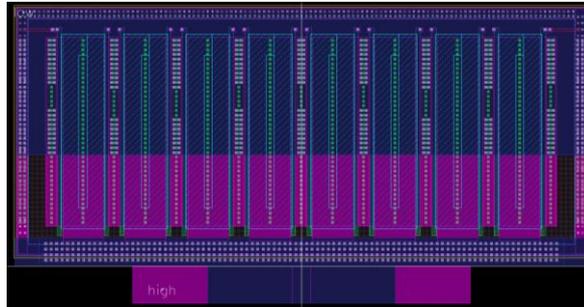


図 4-21 ggNMOS レイアウト図

タクト窓の間に $2.0\ \mu\text{m}$ の非サリサイド領域を設けている。ggPMOS についても、同様の構造であるが、ggNMOS に比べると ESD 耐性が弱いのでチャンネル幅が大きくなっている。設計寸法は以下の通り。

- ggNMOS: $L=0.44\ \mu\text{m}$, $W=324\ \mu\text{m}$ ($20.25\ \mu\text{m} \times 16$ 本)
- ggPMOS: $L=0.44\ \mu\text{m}$, $W=672\ \mu\text{m}$ ($48.0\ \mu\text{m} \times 14$ 本)

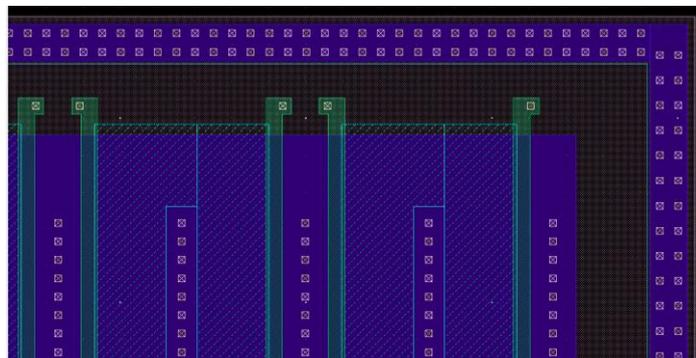


図 4-22 ggNMOS レイアウト図 (一部拡大、配線無し)
水色斜線ハッチ部 (SL 層) が非サリサイド化指定領域

4.3.4 4T-APS 積層フォトダイオード画素パターンレイアウト

spro プロセスにおいても、積層フォトダイオードは標準的に用意されている素子ではないので、必要な拡散層を組み合わせる作成しなければならない。3T-APS 積層フォトダイオードでは、高濃度の N^+ 層をカソードに使ったために欠陥画素の比率が多くなっていたので、今回は、標準デバイスである埋め込みフォト

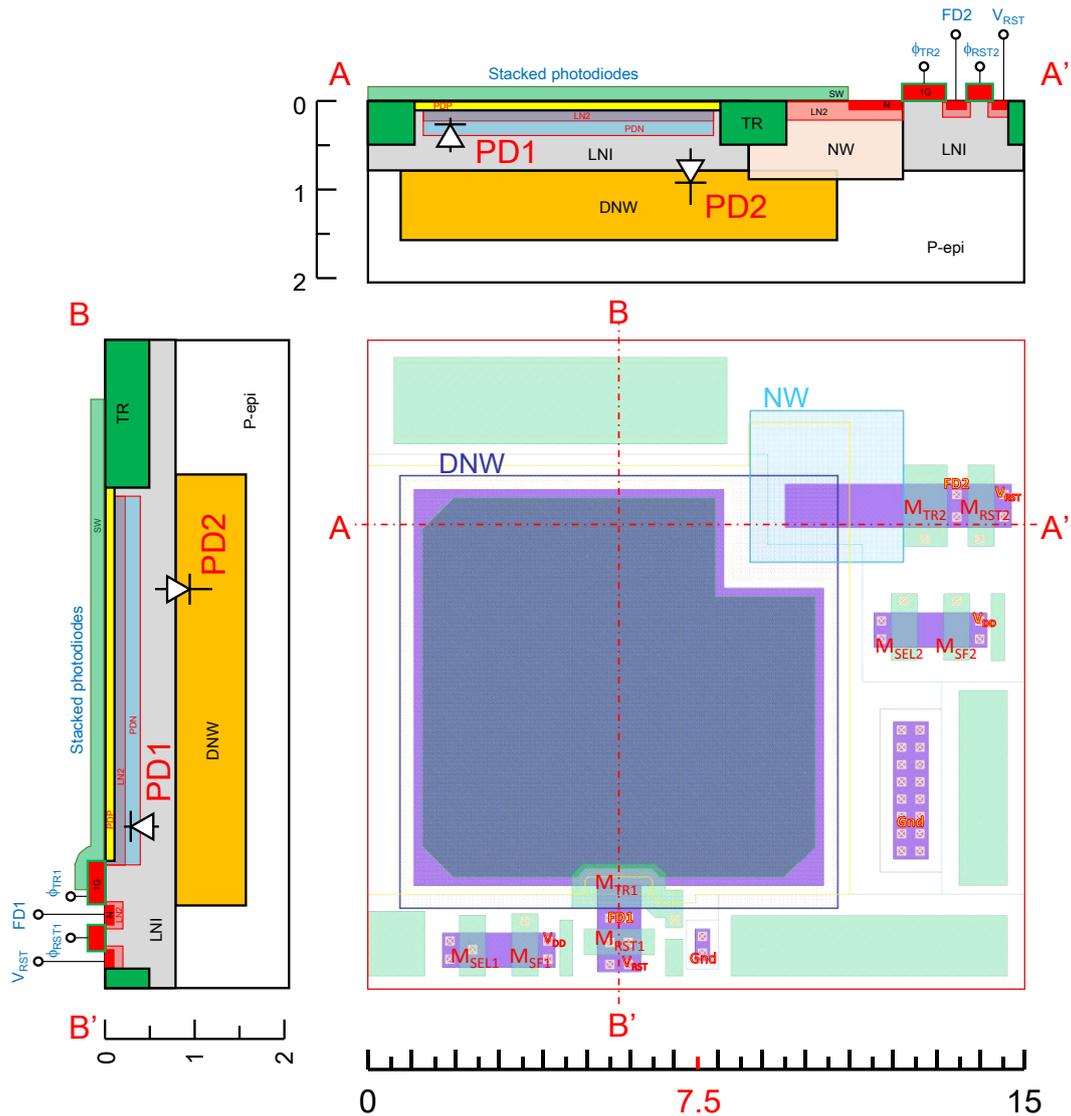


図 4-23 4T-APS 積層フォトダイオード画素レイアウトと断面図

ダイオードや Nch MOS トランジスタの LDD (lightly doped drain) で使用される低濃度 N 型層を使って構成した。

フォトダイオードからフローティングディフュージョン (FD) に光キャリア (電子) を転送する構造を作成するにあたって、表面側のフォトダイオード (PD1)

については、標準の埋め込みフォトダイオードと同様の形状を使用した。但し、縦方向の濃度プロファイルが変動しているので、完全空乏化しにくくなっており、フォトキャリア（電子）を転送しやすい理想的な構造にはならないと考えられる。深い側のフォトダイオード（PD2）については、カソードは深い N 型ウェル（DNW）層で作られるため、一旦、Pch MOS トランジスタで使用される N 型ウェル（NW）層を使って表面まで引き上げた後、転送ゲートを通して FD に転送される形を採った。PD2 についても完全空乏化は困難な構造になっている。さらに、転送ゲートまで引き上げる部分は N 型不純物濃度が高くなっており、ポテンシャルの低い部分（電位ポケット）が出来ると考えられる[73]。レイアウト図と断面図を図 4-23 に示す。断面図は A-A'に沿った断面は、PD2 から転送ゲートの様子が分かるもの、B-B'に沿った断面図は、PD1 から転送ゲートの様子が分かるものになっている。

図中に拡散層の名前を記入している。TR は、素子分離用の酸化膜、LNI は、3.3 V 低 V_{th} Nch MOS トランジスタ用の P 型ウェル層、LN2 は 3.3 V Nch MOS（ポケット注入無）の LDD 用 N 型層である。

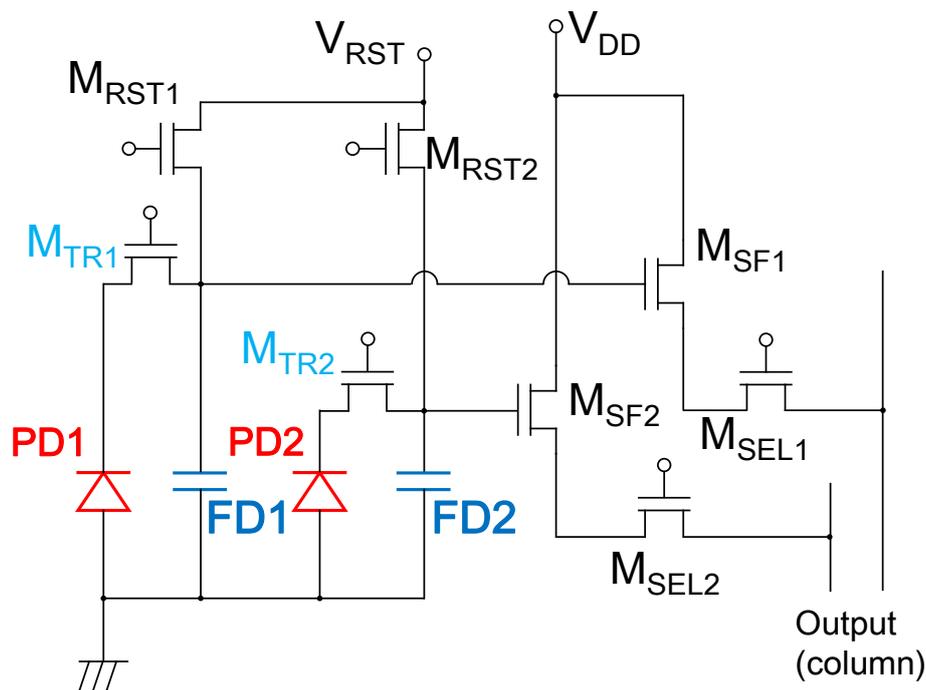


図 4-24 4T-APS 積層フォトダイオード画素 等価回路図

- 1 画素は、一辺 $15\ \mu\text{m}$ の正方形となっている。その他の主要サイズは、
- フォトダイオード面積： $71.9718\ \mu\text{m}^2$ (フィルファクタ：31.99%)
- FD1 および FD2 面積：どちらも $1.00 \times 0.48 = 0.48\ \mu\text{m}^2$
- M_{SF1} および M_{SF2} ゲート面積：どちらも $0.6 \times 0.8 = 0.48\ \mu\text{m}^2$

図 4-24 には、画素の等価回路図を示した。3T-APS 積層フォトダイオードの際と大きくは変わらないが、PD1 と PD2 にはそれぞれに対応した転送ゲート (M_{TR1} および M_{TR2}) が配置されている。なお、画素アレイ化した際の転送ゲートの制御は、前章の 4T-APS CMOS イメージセンサと同様、1 行前のリセット信号を使用して行う形にした。

転送ゲートと FD による感度向上の効果を明確にするために、リファレンスとして、フォトダイオードや他の MOS トランジスタの配置はそのままで、転送ゲートを省き、フォトダイオード (PD1 と PD2) のカソード電位を直接読み取る形に変更した 3T-APS 積層フォトダイオードセンサも作成した。図 4-25 に、その画素のレイアウトと断面図を示す。転送ゲートのあった場所を高濃度 N 型拡散層に置き換えた形にして、フォトダイオードのカソード電位を直接読み取る構

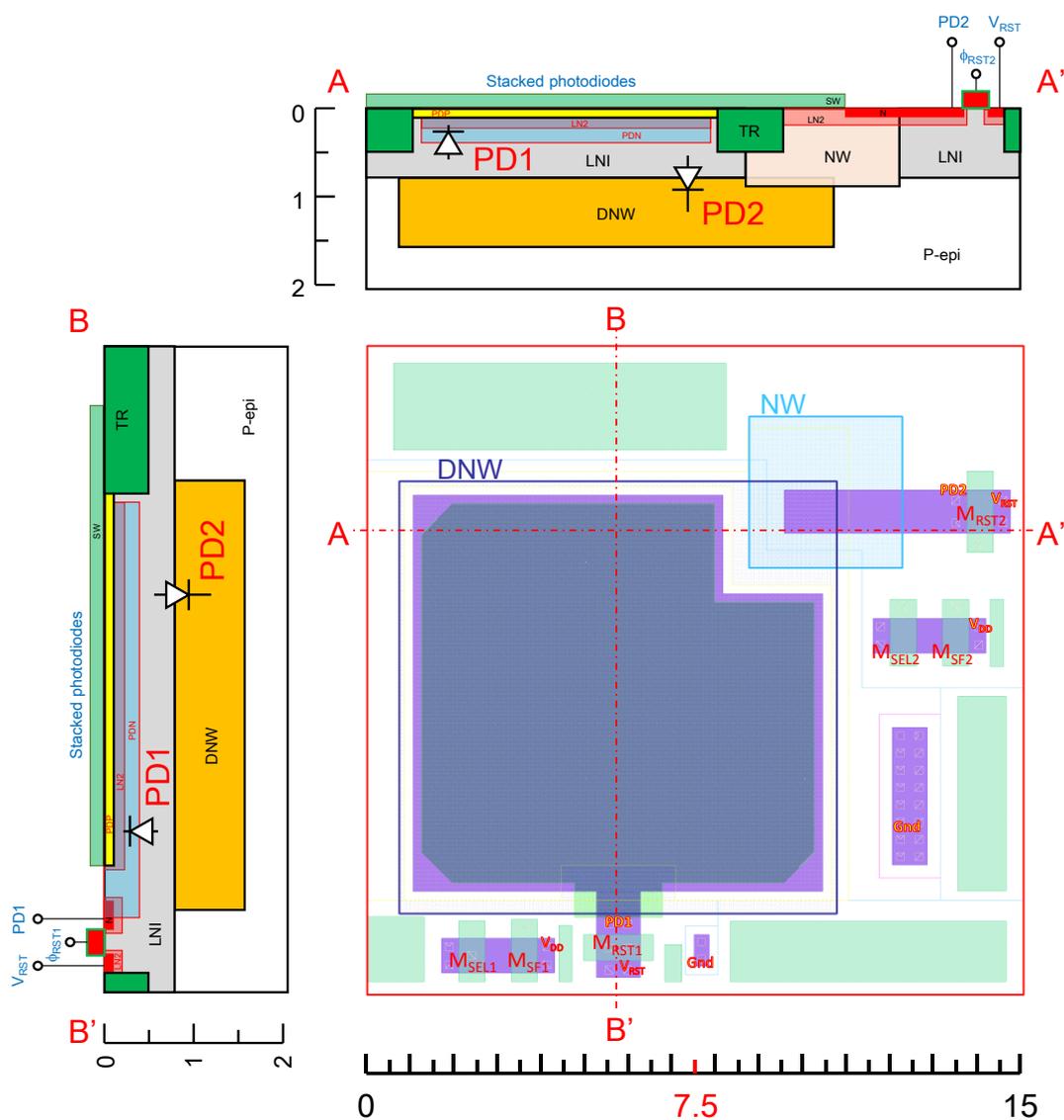


図 4-25 3T-APS 積層フォトダイオード(spro)画素レイアウトと断面図

造になっている。

4.3.5 4T-APS 積層フォトダイオードセンサによる画像取得

前項の 3T-APS 積層フォトダイオードセンサの場合と同様に簡単なデジタルムービーカメラを組んで画像取得を試みた (10 fps の動画撮影)。

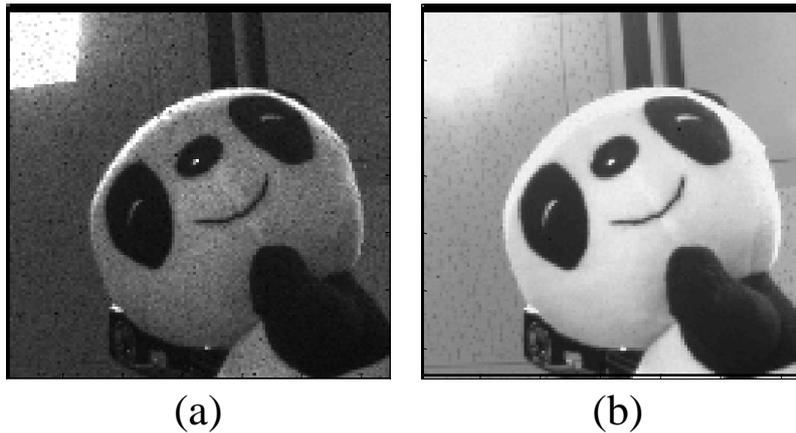


図 4-26 4T-APS 積層フォトダイオードセンサ(spro)取得画像
(a) PD1 画像、(b) PD2 画像

TSMC 社のプロセスで作製した 3T-APS 積層フォトダイオードセンサ (3T-APS-SPD(TSMC)) と比較してコントラストの高い画像が得られている。3T-APS-SPD(TSMC)は、低光強度時の感度が高く、高光強度時の感度が低いという特性であったため、この 4T-APS-SPD(spro)は感度のリニアリティが向上していると考えられる。図 4-26 に得られた画像を示した。表面側の PD1 画像には、ザラツキが見られる。シリコンの結晶の乱れが画像に反映されていると考えられる。3T-APS-SPD(TSMC)では、PD2 画像にも影響がみられザラツキのある画像になっ

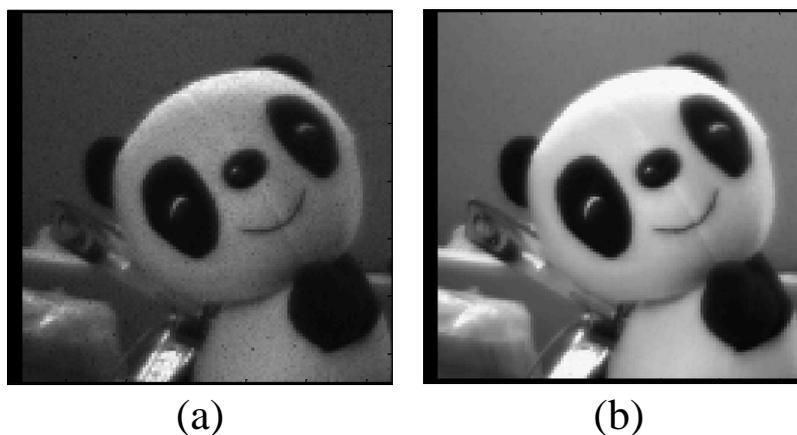


図 4-27 比較用 3T-APS 積層フォトダイオードセンサ(spro)取得画像
(a) PD1 画像、(b) PD2 画像 (感度が低くレンズの絞り全開で撮影)

ていたが、今回のものは PD2 画像にほとんどザラツキが見られない。これは PD1 のカソードの N 型不純物濃度を低く抑えた効果と考えられる。

同時に比較用に 3T-APS 構造で作製したセンサ (3T-APS-SPD(spro)) も撮影したが、こちらにもコントラストの高い画像が得られた (図 4-27)。この事は、PD1 のカソード層濃度を低濃度化したことや製造プロセスが変わったことで P 型ウェル層の濃度が上がったことにより、低光強度時でも PD1 と PD2 の空乏層が結合することなく中性領域が残っていることを示唆するものである。

但し、3T-APS-SPD(spro)の場合は、感度が低く、4T-APS-SPD (spro)と同一条件での撮影で同等の明るさの画像を得るためには、バリフォーカルレンズの絞りを全開して光強度を増す必要があった。すなわち、4T-APS 化の効果により、かなり高感度になっていることが分かる。詳細な感度比較は次節の LED 光源による評価で明らかにする。

動画撮影をした場合に、4T-APS-SPD (spro)では、残像 (Image lag) が現われた (図 4-28、特に PD2 画像において残像が酷く現れている)。3T-APS-SPD (spro)では、このような残像は見られないので、光キャリア (電子) の FD への転送に関わって発生する現象であるといえる。前述のように、フォトダイオードが転送時に完全空乏化しない構造であること、ポケット電位を持つこと、さらに高感度化のためにフォトダイオードのサイズに対して FD の引き出し口が小さくなっていることが原因と考えられる。残像は一般のデジタルカメラやムービーにおいては、決して良いことでは無いが、デジタル ELISA への適用では良い面が見られる (詳細は後述)。

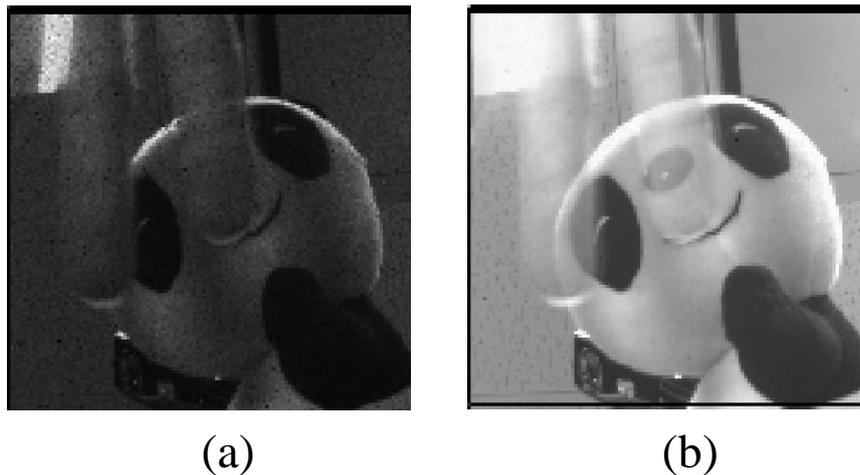


図 4-28 4T-APS 積層フォトダイオードセンサ(spro)取得画像 (残像)
 パンダの前に指を差し入れた直後の画像 (パンダが透けて見える)
 (a) PD1 画像、(b) PD2 画像

4.3.6 LED 光源による評価結果

3T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサの場合と同様、中心波長 470 および 525 nm の 2 色の LED を励起光および蛍光に見立てた評価を行い、波長を識別する能力が確認できた。それぞれの LED 光強度に対する PD1 と PD2 の画素値の変化の様子を図 4-29 に示す。なお、画素値は AD 変換された任意の値[DN]を測定に先立って確認した[DN]と電圧値の相関（本実験時は、1V を 7007 分割に設定）から、電圧値（単位：mV）に変換して表示している。

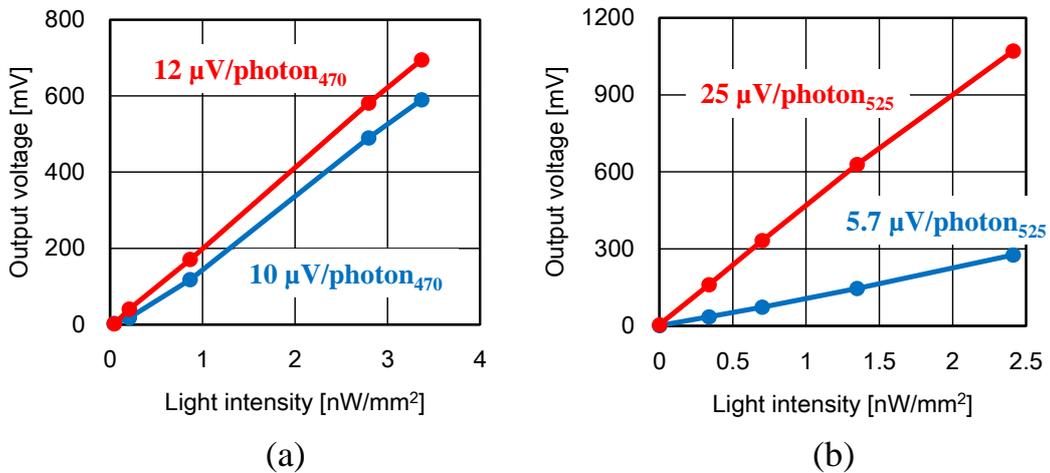


図 4-29 4T-APS(spro) LED 照射光強度と出力画素値の関係
 (青線) PD1 (赤線) PD2
 光源 (a) 470 nm LED、(b) 525 nm LED

それぞれの LED を中心波長で単一波長であるという近似を行うと、光強度、

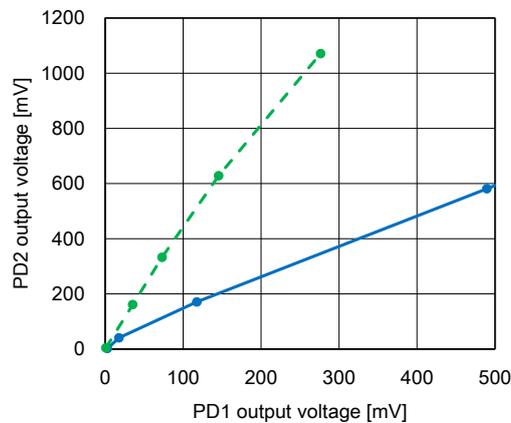


図 4-30 4T-APS 積層フォトダイオードセンサ(spro) PD1 と PD2 の画素値相関
 (青実線) 470 nm LED 照射時の相関、(緑破線) 525 nm LED 照射時の相関

フォトダイオードの面積および撮像時間（フレームレート）から 1 フレーム当たりに入射するフォトダイオードに入射する光子数を算出することができる。この算出された光子数と画素値 (mV) の変化量から光子→出力変換ゲイン（光子 1 個に対する画素値の変化量）を計算することができる。図 4-29 のグラフ中に計算した光子→出力変換ゲインの値を併記している。感度が高く、特に蛍光に相当する 525 nm LED 光に対しては、PD2 の場合、約 40 個の光子入射で 1 mV の出力変化が得られるという結果になっている。

次に、それぞれの LED 光に対応した PD1 と PD2 の画素値の相関を確認する。図 4-30 にその様子を示した。TSMC プロセスで作製した 3T-APS 積層フォトダイオードセンサと違いほぼ一定の比率になっていることが分かる。したがって、デジタル ELISA での蛍光観察における初期リファレンス曲線（励起光のみ）の近似式導出の際の誤差は小さくなると考えられる。

この PD1 と PD2 の画素値の比が光強度によって変化しないということは、3T-APS-SPD(TSMC)で見られたように PD1 と PD2 の空乏層が結合していないので、全光強度域において、光キャリア（電子）の PD1 と PD2 への分配が同じ位置（共通アノードである P 型ウェル層の濃度極大部）でなされていることを示唆していると考えられる。

4T-APS 化ではフローティングディフュージョン (FD) への光キャリア（電子）の転送による高感度化が主な狙いであった。ここで、対応する 3T-ASP-SPD (spro) も同様の測定を行っているので比較していく。図 4-31 には、それぞれの LED 光強度に対する PD1 と PD2 の画素値の変化の様子を示した（4T-APS-SPD (spro)の

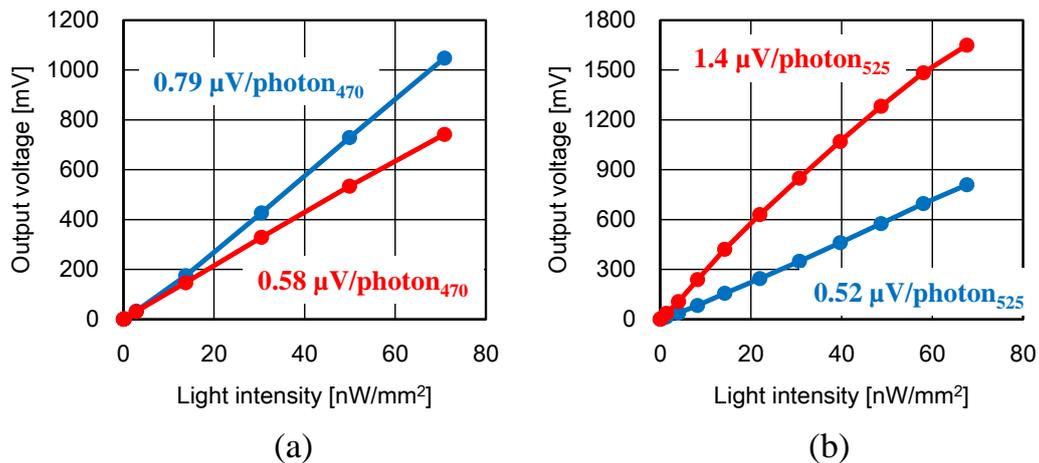


図 4-31 比較用 3T-APS(spro) LED 照射光強度と出力画素値の関係

(青線) PD1 (赤線) PD2

光源 (a) 470 nm LED、(b) 525 nm LED

グラフとは横軸の桁が変わっていることに注意)。

図 4-31 のグラフ中には、センサ毎、フォトダイオード毎のフォトン→出力変換ゲインを記入している。4T-APS-SPD (spro)と比べると 1 / 10 以下の感度になっている。4T-APS-SPD (spro)の際と同様、PD1 と PD2 の画素値の相関を図 4-32

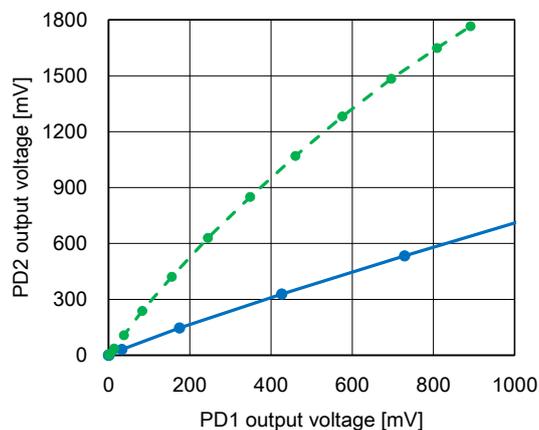


図 4-32 比較用 3T-APS 積層フォトダイオードセンサ(spro) PD1 と PD2 の画素値相関 (青実線) 470 nm LED 照射時の相関、(緑破線) 525 nm LED 照射時の相関

に示した。

表 4-2 にフォトン→出力変換ゲインの比較をまとめた。表中には画素値の比を「ゲイン比」として併記しており、PD1 では、10 倍強、PD2 では、20 倍近く感度が向上している。

表 4-2 積層フォトダイオード(spro)フォトン→出力変換ゲインまとめ

フォトダイオード	Gain (μV/photon) 470 nm LED	ゲイン比 4T/3T	Gain (μV/photon) 525 nm LED	ゲイン比 4T/3T
4T-APS PD1	10	12.7	5.7	11.0
3T-APS PD1	0.79		0.52	
4T-APS PD2	12	20.7	25	17.9
3T-APS PD2	0.58		1.4	

4.3.7 テンポラリーノイズと検出限界

積層フォトダイオード CMOS イメージセンサにおいても、通常の CMOS イメージセンサと同様、画素値とテンポラリーノイズの相関を取ることができる。4T-APS-SPD (TSMC)においては、読み取り回路起因のノイズが前章で示した通常の 4T-APS(TSMC)と同様に大きいため、提示しない。

図 4-33 に、10 fps で撮影した 4T-APS-SPD(spro)の PD1 および PD2 の 100 フレーム平均画素値画像、標準偏差画像および平均画素値と標準偏差の相関グラフ

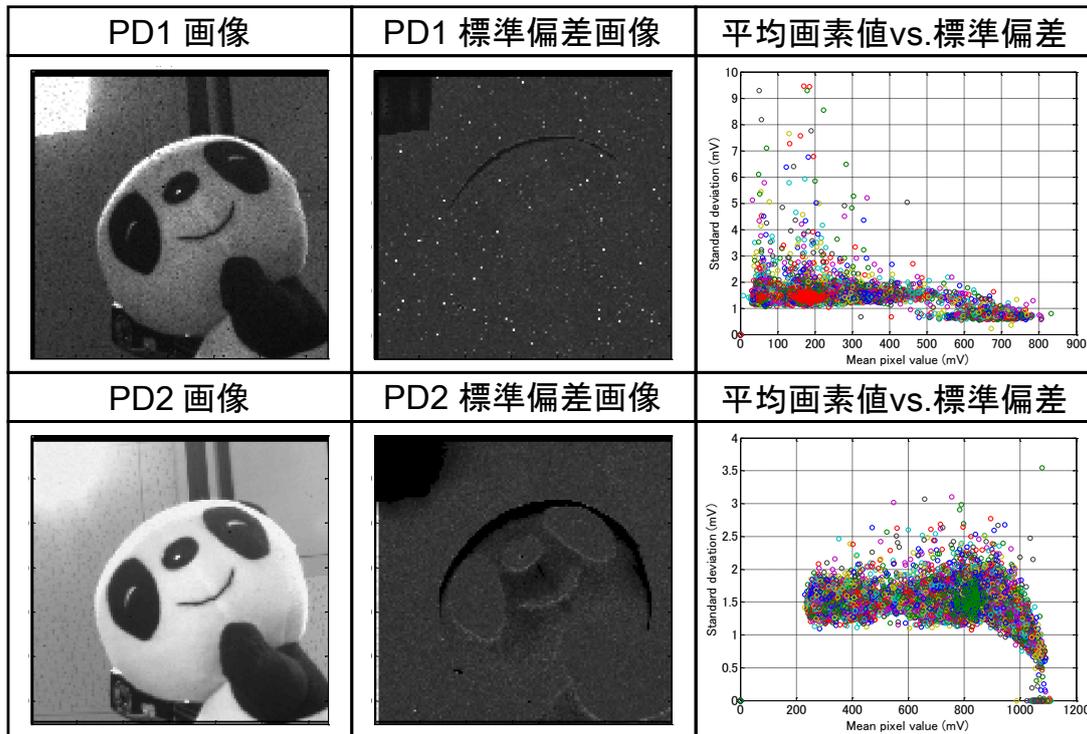


図 4-33 4T-APS-SPD(spro) PD1 と PD2 のテンポラリーノイズ

フを示す。標準偏差は画素毎のテンポラリーノイズのレベルを示すものである。光ショットノイズが支配的要因である場合、標準偏差画像は平均値画像と同様の明暗を示すはずであるが、そのようになっていない。感度が低くなると光ショットノイズのバラツキが出力電圧に反映されにくくなるので、見かけ上標準偏差が小さくなるが、今回の場合は、特に PD2 のフォトン-電圧変換ゲインは $25 \mu\text{V}/\text{photon}_{525}$ と高く、高光強度での低感度化も見られていないので、本来ならば光ショットノイズの影響が大きくなるはずである。光ショットノイズの影響が小さくなっている原因としては、「残像」が考えられる。今回、4T-APS 化に当たって、転送ゲートを設け、フォトダイオードから FD に転送する形にしたが、前述のようにフォトダイオードから FD への完全転送が困難な状況になっている

ため、光強度変化があった場合に出力画素値が安定するまでに数 10 フレーム程度必要になっている。このため光ショットノイズは転送段階で平準化されているものと考えられる。デジタル ELISA における蛍光検出の際には、蛍光検出限界を向上するために画像積算を行うが、光ショットノイズの影響をセンサ自体が除去しているため、積算では、それ以外のノイズだけの低減を行うことになる。したがって蛍光検出限界の改善が期待できる。

比較のため転送ゲートのない 3T-APS-SPD(spro)で同様の評価をした結果を図 4-34 に示す。感度が低いので光ショットノイズの影響が低く見えるものの、標

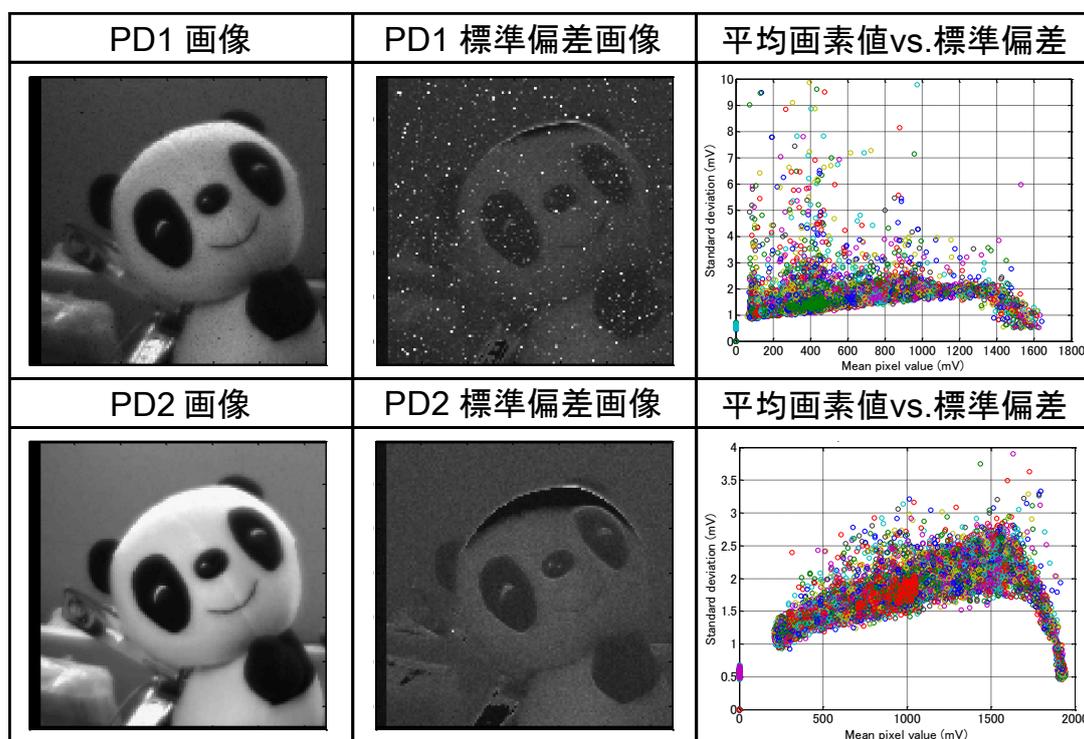


図 4-34 比較用 3T-APS-SPD(spro) PD1 と PD2 のテンポラリーノイズ

準偏差画像は元画像の明暗を保っており、グラフからも高画素値ほどノイズレベルが悪化していることが分かる。同じ積層フォトダイオード構造でも転送ゲートがない 3T-APS 構成でこのような状況になることは、4T-APS-SPD(spro)において光ショットノイズが低下しているのは「残像」による平準化の効果があるということの裏づけになっている。

残像による平準化について詳細に検証してみる。図 4-35 は、525 nm LED を光源として光強度を変化させた時の 4T-APS-SPD(spro)出力画素値の変化の様子を見たものである。光強度はステップ状に上げて一定に設定しているが、出力画素値は、ゆっくり上昇して数 10 フレーム後に飽和している。ここで単純なモデ

ルで出力画素値の変化をシミュレーションしてみる。入力値として発生フォトキャリア数を N_{gen} 、フォトダイオードとフローティングディフュージョンに滞留するフォトキャリア数を N_{str} 、転送効率 η_{tx} で転送されて出力に寄与するフォトキャリア数を N_{tr} とすると n フレーム目の出力フォトキャリア数 $N_{tr,n}$ は、

$$N_{tr,n} = \eta_{tx}(N_{gen} + N_{str,n-1}) \quad (4-1)$$

と表すことができる。ここで、転送フォトキャリア数は転送時に滞留しているフォトキャリア数に比例するとしている。

図 4-35 中の破線 (PD1) および点線 (PD2) は、式(4-1)を用いて $\eta_{tx}=0.05$ として出力レベルの立ち上がりをシミュレーションした曲線であり、PD1 および PD2 の実測した上昇曲線に近い形になっている。すなわち、4T-APS-SPD(spro)は、PD1、PD2 とともに転送効率は 5%程度であると考えられる。

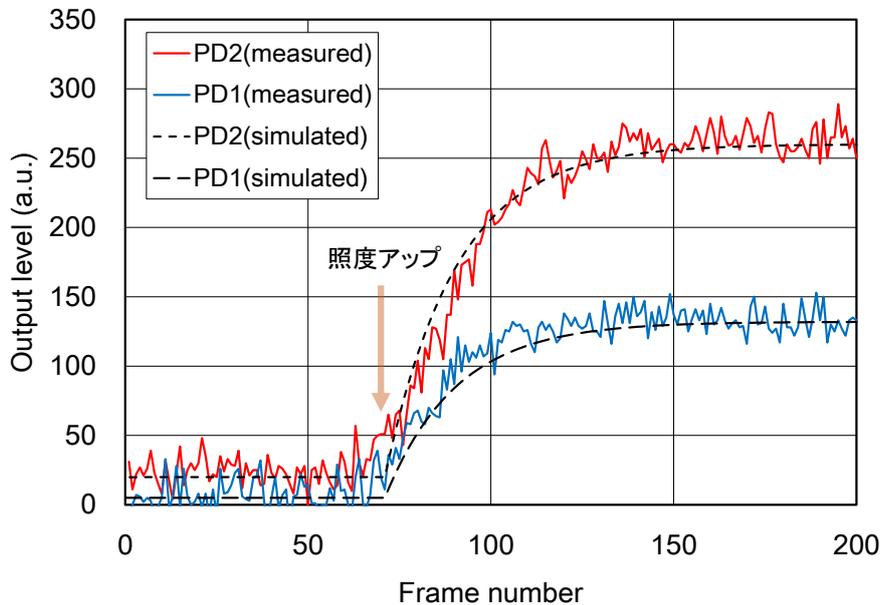


図 4-35 光強度アップ後の画素値上昇の様子
破線(PD1)および点線(PD2)は転送効率を 5%とした場合のシミュレーション曲線

図 4-36 は、式(4-1)で定常状態の出力ノイズをシミュレーションしたものである。ここでは、入力波形は、平均値に対して標準偏差がその平均値の平方根となる正規分布する乱数を発生させたものである。転送効率 η_{tx} は 5%で一定とした計算であるが、光ショットノイズ平準化の様子が見てとれる。この計算の場合、出力バラツキの標準偏差は入力のものに比べて約 1/6 に低減している。

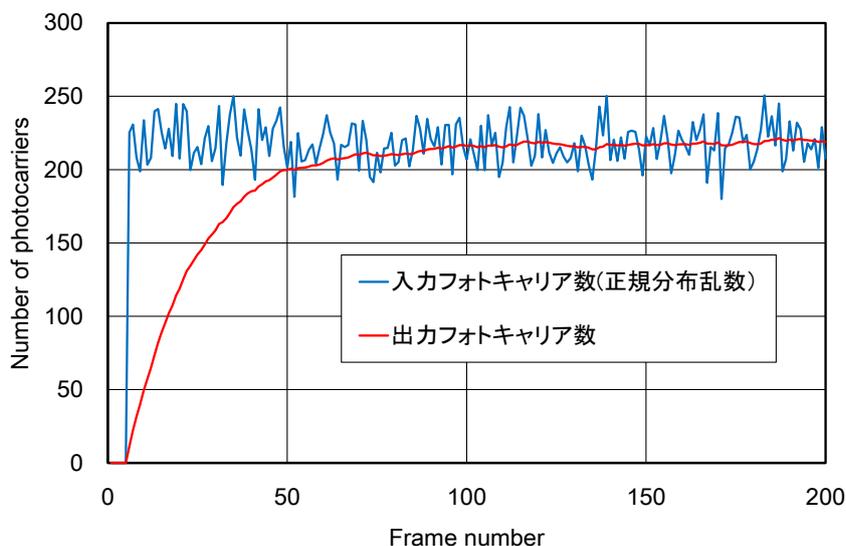


図 4-36 光ショットノイズ平準化（転送効率 5%）シミュレーション

フォトンー出力電圧変換ゲインとノイズ特性が明らかになったので、蛍光検出限界を見積もっておく、通常の CMOS イメージセンサ評価の際と同様、ノイズのバラツキ標準偏差 (σ) 以上の出力変化量を示すために必要な蛍光フォトン数として算出する。結果を表 4-3 にまとめた。3T-APS-SPD(spro)は、ノイズレベルは低いがフォトンー出力変換ゲインが低いため検出限界は悪くなっている。それに対し、4T-APS-SPD(spro)は、暗時の検出限界は通常の CMOS イメージセンサの 4T-APS(spro)と同等であるが、飽和画素値の 50%光強度時の検出限界も暗時と同等でフレーム積算無しで、60 個の蛍光フォトンの変化が検出できるのが特徴的である。さらに、100 フレーム積算によるノイズ除去を行った場合、6 個の蛍光フォトンの変化が検出できると考えられる。

表 4-3 フォトンー出力変換ゲインと蛍光検出限界（積層フォトダイオードセンサ）

	4T-SPD-PD1 (spro)	4T-SPD-PD2 (spro)	3T-SPD-PD1 (spro)	3T-SPD-PD2 (spro)
フォトンー出力変換ゲイン($\mu\text{V}/\text{photon}_{525}$)	5.7	25	0.52	1.4
飽和画素値(mV)	600	1000	1400	1700
時間ノイズ標準偏差 σ @dark (mV)	1.4	1.5	1.2	0.9
検出可能最小フォトン数@dark	250	60	2300	640
時間ノイズ標準偏差 σ @50% (mV)	1.6	1.5	1.8	1.8
検出可能最小フォトン数@50%	280	60	3500	1300

※ @50%：飽和画素値の50%の光強度の場合

※ 検出可能最小フォトン数 = σ/gain

この時に、積層フォトダイオードの波長識別機能がどのように機能するかを考えてみる（表 4-2 のフォトンー出力変換ゲインの値を用いる）。6 個の蛍光フ

光子が積層フォトダイオードに入射した場合、PD2 の出力変化 ΔV_{PD1} は $6 \times 25 = 150$ (μV) である。同時に PD1 は $6 \times 12 = 72$ (μV) 変化しているはずである。これに対して、 ΔV_{PD1} が励起光の変化に過ぎなかった場合は、 ΔV_{PD1} の変化相当の励起光光子数は $150 / 5.7 = 26$ (個) となり、26 個の励起光光子では、PD1 の出力は、 $26 \times 10 = 260$ (μV) となる。PD1 出力変化量の差分は $260 - 72 = 188$ (μV) である。一方、PD1 のノイズの標準偏差は、100 回積算では、160 (μV) 程度と考えられるので、違いを感知できる。すなわち積層フォトダイオードセンサの効果により、蛍光の誤検出リスクを低減できるといえる (検出限界を 3σ とした場合、PD1 出力変化量の差分はこの 3 倍となり、さらに安全な判定が行える)。

4.4 考察とまとめ

CMOS イメージセンサにオンチップカラーフィルタを使用しないで、光の波長を識別することのできる機能を付加した。ここでは、シリコン中への光の侵入長が入射光の波長依存性を持つことを利用した。イメージセンサを構成する画素内でフォトダイオード 2 個 (浅い側 PD1 と深い側 PD2) を深さ方向に積層し、それぞれの出力画素値を比較することで、励起光と蛍光を見分ける能力が備わった。これにより、デジタル ELISA の蛍光検出時の誤検出を抑制することができる。

レンズレス小型デジタル ELISA においては、漏れ出た励起光の中から、微弱な蛍光を識別しなければならない状況が考えられるので、この識別能力を励起光と蛍光を模擬した LED を光源として評価した。その結果、入射光波長によって、PD1 と PD2 の出力画素値の比が大きく変化することが確認できた。

デジタル ELISA において、この特性を利用して蛍光と励起光を区別するためには、蛍光反応初期 (すべてのチャンバーが蛍光していない) 状態で励起光強度を変化させて PD1 と PD2 の画素値の関係を画素毎に取得し、それぞれ近似曲線で表現しておけば、その近似曲線からズレがある場合に蛍光が発生していると判断できる。この方法では、励起光強度が不安定な状況下でも正しい判定が可能となる。

実際の試作・評価にあたっては、まず 3T-APS 構成の積層フォトダイオード CMOS イメージセンサを作製した。波長識別能力があることを確認することができたが、感度およびそのリニアリティが低いことや、PD1 と PD2 の画素値の比が入射光強度によって変化するという課題があった。

これらの課題を解決するために、積層フォトダイオードを形成するための不純物拡散プロファイルを変更し、さらに 4T-APS 構成を採用した。その結果、特

に高画素値における感度が大幅に向上した。また、PD1 と PD2 の画素値の比も安定したことから、励起光／蛍光判別時の誤差の低減も見込める。

4T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサにおいては、フォトダイオードが完全空乏化しないこと、転送ゲート近傍に電位ポケットができること、さらにフローティングデフュージョン (FD) に対してフォトダイオードサイズが大きいことが影響して、フォトダイオードから FD へのフォトキャリア (電子) の転送が困難となり、「残像」が現われる。「残像」は静止画像を撮る形になるデジタル ELISA での蛍光検出においては、光ショットノイズによる画素値の揺らぎを平準化し、低減する効果があった。これにより、入射光強度が高いところでの低ノイズ化が出来ている。すなわち、励起光の漏れ量が多くなった場合でも、蛍光識別能力が低下しにくいといえる。テンポラリーノイズの評価結果から、100 フレーム積算によるノイズ低減を行えば、積層フォトダイオード表面に 1 フレーム当たり 18 個 (3σ) の蛍光フォトンが入射すれば検出可能であり、励起光揺らぎを蛍光の発生と誤検出することもないということが見積もれた。

励起光の漏れ量が飽和画素値の 50%相当ある場合を考えると、今回作製した 4T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサは、これまで使用されてきた 3T-APS 構成の通常 CMOS イメージセンサと比較すると、検出感度が約 5 倍向上した。

第 5 章 新規小型デジタル ELISA システムの提案および検証

5.1 はじめに

本章では、新たな小型デジタル ELISA システムの構成を提案し、その性能を計算によって検証していく。

新規システムの計算に先立って、我々の最初のターゲット蛍光反応によって生成される蛍光分子フルオレセインを取り上げ、その性質を確認しておく。デジタル ELISA に適用可能な蛍光物質はフルオレセインだけではないが、これを十分検証することは、他の蛍光物質適用時の検証においても、役立つものと考えられる。

新規システムについては、基本形状を示した後、性能を計算する。また、CMOS イメージセンサと組み合わせたときの性能の議論も行う。

最後に蛍光検出の際の注意点として、光退色の影響についても議論する。

5.2 デジタル ELISA における蛍光反応

デジタル ELISA では、微小チャンバー内で蛍光反応が進み、時間とともに蛍光強度が増大していく。吸収フィルタの設計にあたって、蛍光物質の性質や反応速度から蛍光強度を明らかにしておく必要がある。

本項では、代表例として、蛍光基質 (fluorescent substrate) の FDG (fluorescein

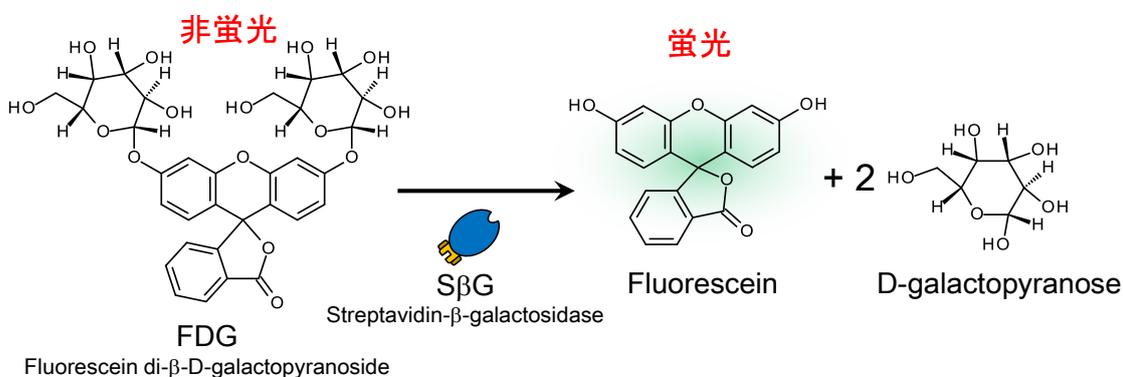


図 5-1 フルオレセイン生成の反応式

di(β -D-galactopyranoside) から酵素 (enzyme) の β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase) の働きで、蛍光物質であるフルオレセイン (fluorescein) を生成する、図 5-1 に示す反応を例に議論をすすめていく。

5.3 フルオレセインの蛍光強度

5.3.1 イオン化定数の pH 依存性

フルオレセインは、水溶液中で様々なイオン形態をとることが知られている。イオン種によりモル吸光係数 (molar extinction coefficient, molar absorption: ϵ) や蛍光の量子収率 (quantum yield: Φ_F) が異なっているため蛍光観察にあたっては、どのような状態で観察されるかを知っておくことが重要である。フルオレセインの場合、アルカリ性の時に蛍光強度の強いジアニオン (dianion: F^{2-}) が大部分となるため蛍光観察はアルカリ性状態で行うのが有利である。しかしながら、デジタル ELISA においては、反応条件がそのまま観察条件となるため、どの程度不利な観察条件になっているかを確認しておく必要がある。 β -ガラクトシダーゼによる酵素反応は、 $\text{pH}=6.9\sim 7.7$ 程度で酵素活性が高いため[74]、ほぼ中性の条件で行われる。

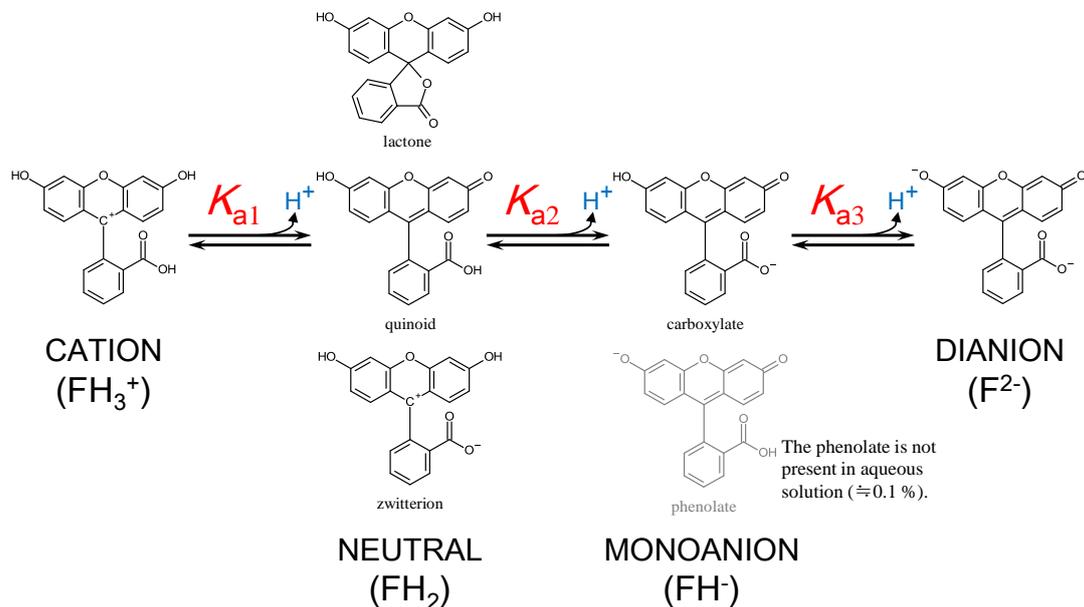


図 5-2 水溶液中でのフルオレセインのイオン種

イオン種のモル分率は pH 依存性があり、イオン化定数 (ionization constant: K_a) の値からイオン種のモル分率の pH 依存性を計算することができる。フルオレセインのイオン化定数は 1958 年に Zanker らによってフルオレセインのイオン種のモデルが提示さ

れて以来[75]、いくつかのイオン化定数が提示されている。図 5-2 は、イオン形態とイオン化定数の説明である。この平衡状態において、3種の中性 (neutral) 種 (lactone, quinoid, zwitterion) を1つのものとして扱い、モノアニオンについても水溶液中では phenolate は殆ど存在せず、carboxylate だけが存在するとしている。

発表されたイオン化定数のいくつかを表 5-1 に示す。表 5-1 には、それぞれのイオン化定数の値で計算したイオン種の pH=7.0 におけるモル分率 (molar fraction) を併記した。pH=7.0 では、モノアニオン (monoanion: FH⁻) とジアニオンが主成分であり、励起光の吸収係数が高く、蛍光の量子収率の高いジアニオンが 50~90% を占めている。

表 5-1 イオン化定数の比較と対応するモル分率 (計算値)

著者	刊行年	イオン化定数			モル分率 (%) at pH=7.0			
		p <i>K</i> _{a1}	p <i>K</i> _{a2}	p <i>K</i> _{a3}	FH ₃ ⁺	FH ₂	FH ⁻	F ²⁻
Zanker[75]	1958	1.95	5.05	7.00	0	0.6	49.7	49.7
Sjöback[90]	1995	2.08	4.31	6.43	0	0.3	21.2	78.8
Klonis[77]	1996	2.25	4.23	6.31	0	0	17.0	83.0
Smith[76]	2002	2.22	4.34	6.68	0	0.1	32.3	67.6
Gholivand[91]	2008	2.20	4.30	6.43	0	0	21.2	78.8
Batistela[92]	2010	2.5	3.8	6.1	0	0	11.2	88.8

なお、モル分率は、Smith らの論文[76]で詳細に記述されている式で計算した。すなわち、イオン化定数は次のように定義できる。

$$K_{a1} = \frac{[H^+][H_2F]}{[H_3F^+]} \quad K_{a2} = \frac{[H^+][HF^-]}{[H_2F]} \quad K_{a3} = \frac{[H^+][F^{2-}]}{[HF^-]} \quad (5-1)$$

ここで、p*K*_a = -log₁₀*K*_a である。また、全イオン種の合計濃度を [*F*_{Total}] すると、

$$[F_{Total}] = [H_3F^+] + [H_2F] + [HF^-] + [F^{2-}] \quad (5-2)$$

であるので、(5-1)および(5-2)式を変形することによって、各イオン種の濃度をイオン化定数 *K*_a と [*F*_{Total}] および水素イオン濃度 (pH = -log₁₀[H⁺]) で(5-3)~(5-6)式のように表すことができる。

$$[\text{H}_3\text{F}^+] = \frac{[F_{\text{Total}}]}{1 + \frac{K_{a1}}{[\text{H}^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[\text{H}^+]^2} + \frac{K_{a1}K_{a2}K_{a3}}{[\text{H}^+]^3}} \quad (5-3)$$

$$[\text{H}_2\text{F}] = \frac{[F_{\text{Total}}]}{\frac{[\text{H}^+]}{K_{a1}} + 1 + \frac{K_{a2}}{[\text{H}^+]} + \frac{K_{a2}K_{a3}}{[\text{H}^+]^2}} \quad (5-4)$$

$$[\text{HF}^-] = \frac{[F_{\text{Total}}]}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a2}} + 1 + \frac{K_{a3}}{[\text{H}^+]}} \quad (5-5)$$

$$[\text{F}^{2-}] = \frac{[F_{\text{Total}}]}{\frac{[\text{H}^+]^3}{K_{a1}K_{a2}K_{a3}} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_{a2}K_{a3}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a3}} + 1} \quad (5-6)$$

これらの計算式により、イオン種のモル分率の pH 依存性を計算することができる。式の形から、各イオン種のモル分率は $[F_{\text{Total}}]$ の値には依存しないことが分かる。

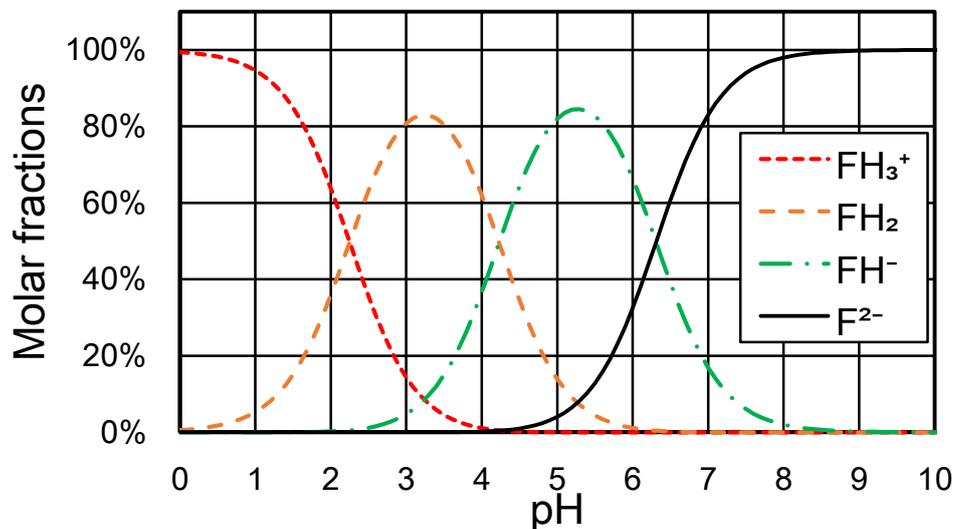


図 5-3 フルオレセイン 各イオン種のモル分率の pH 依存性

図 5-3 は、Klonis らが図 5-2 の平衡モデルに対して導いた K_a の値を使って計算した例である[77]。

5.3.2 フルオレセインのモル吸光係数と量子収率

図 5-4 に、フルオレセイン水溶液のモル吸光係数 ϵ の入射光波長依存性のグラフを示す。イオン種のモル分率の計算と同様 Klonis らの提示したものである [77]。黄色染料 (VARIFAST YELLOW 3150) を使用した吸収フィルタの最大吸収

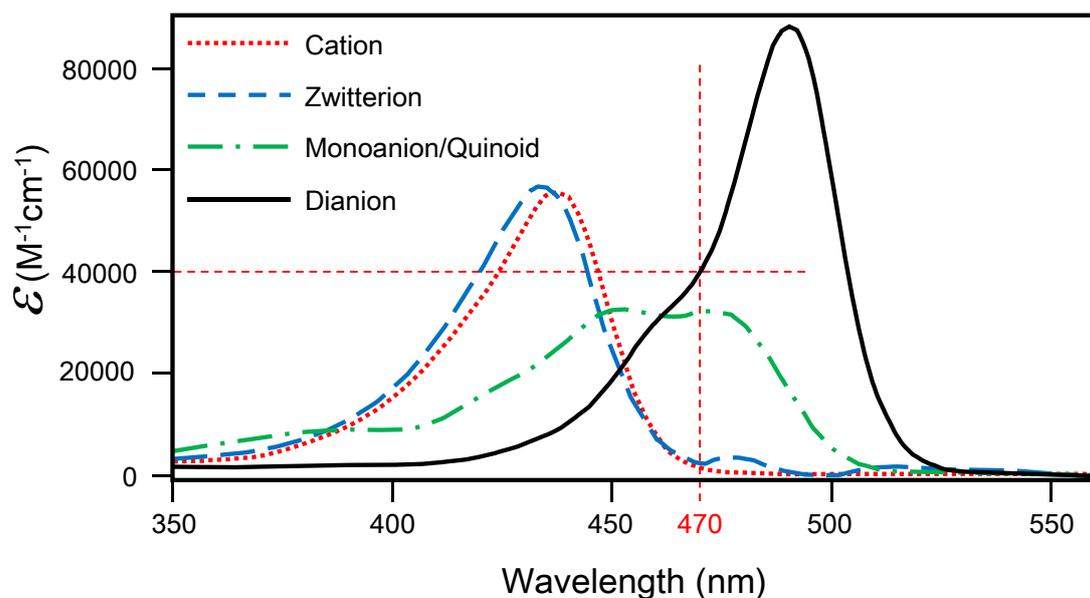


図 5-4 フルオレセイン 各イオン種のモル分率の pH 依存性

波長に近い 470 nm を励起光として選択すると、図 5-4 より、 FH^{2-} のモル吸光係数は約 40000 であり FH^- は $32000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (@ $\lambda=470 \text{ nm}$) である。蛍光の量子収率 (quantum yield: Φ_F) についてもイオン種によって固有の値を持っており、ジアニオン (F^{2-}) は 0.93、モノアニオン (FH^-) は、0.36 程度とされている。前節で計算したとおり、 $\text{pH}=7.0$ の状態では F^{2-} のモル分率は 83 %、 FH^- は 17 %である。これらの値を使ってデジタル ELISA の蛍光強度を計算していく。なお、実際の蛍光反応は酵素活性の至適に近い $\text{pH}=7.5$ 程度で行われるので、若干厳しい評価になっている。

5.4 デジタル ELISA における励起光、蛍光強度の概算

5.4.1 検出目標濃度

蛍光基質として FDG、酵素として S8G (streptavidin- β -galactosidase conjugate) を使用したデジタル ELISA では、S8G を結合したビーズを含んだチャンバー内では、酵素の働きによって加水分解が促進されフルオレセインがほぼ一定の速度で生成される。酵素の反応速度 v はミカエリス・メンテン式 (Michaelis-Menten equation)

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (5-7)$$

で表すことができる。ここで K_m はミカエリス・メンテン定数、 V_{max} は蛍光基質濃度 $[S]$ が無限大時の反応速度である。デジタル ELISA では、蛍光基質濃度 $[FDG]=1 \text{ mM}$ 程度とすれば μM オーダーのフルオレセインの生成を行うので、 $[FDG]$ はほぼ変化しないとみなせるため、反応速度 v も、ほぼ一定であると考えられる。蛍光基質として resorufin- β -D- galactopyranoside (RGP) を使用した例であるが、微小チャンバー内の 1 分子酵素反応においても、反応速度が 6 時間以上一定であることが Rissin らにより確認されている[78]。また、1 分子酵素反応において酵素がフリーであるかビーズ表面等に固定化されているかの違いは反応速度に大きな影響を与えないことが English らによって示されている[79]。榎原、野地らは、微小チャンバー内での FDG と S8G の反応において、反応速度 (ターンオーバー数 ; turnover rate) を算出しており、 $14.7 \sim 23.8 \text{ s}^{-1}$ としている[3]。すなわち 1 分子の酵素が毎秒、約 20 分子のフルオレセインを生成しているといえる。

榎原、野地らは、FDG 水溶液のドロップレットをオイル (Fluorinert FC-40, 3M Co., Ltd.) で分離した微小チャンバーでの反応を行っているが、生成したフルオレセインのオイルへの漏れ出しについても言及している[3]。1 μM のフルオレセイン水溶液のドロップレットの蛍光強度の減少の様子から、蛍光強度 I_{EM} は時定数 51 分で指数関数的に減少していることを見出している。すなわち、

$$I_{EM} = I_{EM0} \exp(-\lambda t) \quad (5-8)$$

ここで、 I_{EM0} は初期蛍光強度、時定数 $(1/\lambda)=51$ 分、および t は放置時間 (分) である。時定数については、測定時の励起光による退色の影響も含んでいるので実際にはこれよりも大きな値であると考えられるとされている。なお、時定数 51 分は直径 $8.5 \mu\text{m}$ のドロップレットで得られた値である。

デジタル ELISA における検出時間の目標を 30 分とすると、上記のターンオーバー数と漏れ出し速度を使って検出すべきドロップレットの濃度を計算するこ

とができる。微小チャンバーの体積を 50 fL (直径 5 μm , 深さ 3 μm) と仮定した時のフルオレセイン濃度の時間依存性を図 5-5 に示す。なお、時定数はドロップレットとオイルの接触面積に比例すると考え、ドロップレットの直径の違いから、 $(1/\lambda)=51 \times (8.5/5)^2=147$ 分とした。蛍光反応開始から 30 分程度で検出するためには、1 μM 程度のフルオレセイン濃度の検出が必要であることが示唆されている。

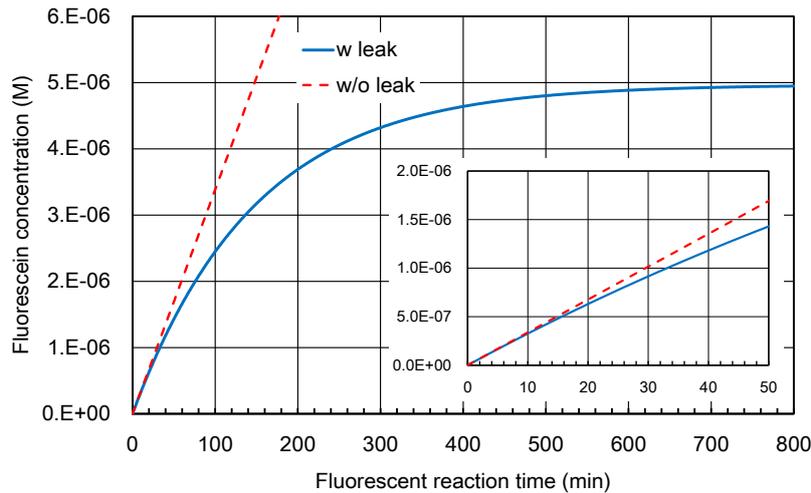


図 5-5 フルオレセイン濃度の反応時間依存性
 反応チャンバーサイズ(直径 5 μm , 深さ 3 μm), ターンオーバー 20 s⁻¹, リーク時定数 147 min の場合
 内側のグラフは蛍光反応時間 50 分までの拡大図

5.4.2 ランベルトーベールの法則

ランベルトーベールの法則 (Beer-Lambert law) に従い、吸光度 (absorbance: A) は、次式で表される。

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \varepsilon c l \quad (5-9)$$

ここで、 ε ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)はモル吸光係数、 c (M)は、蛍光体のモル濃度、 l (cm)はフルオレセイン水溶液を励起光が通過する距離であり、今回の場合反応チャンバーの深さ (3 μm とする) である。検出目標濃度を 1 μM として、前節までに示したフルオレセインのイオン種の存在確率、量子効率の値を代入して計算する。透過率 (transmittance) を T とすると、吸収率 (不透過率: opacity) O は、 F^{2-} と FH^- に対応する値をそれぞれ計算すると (添え字で区別)、

$$A_{F^{2-}} = \varepsilon c l = 40000 \times (1 \times 10^{-6} \times 0.83) \times (3 \times 10^{-4}) = 9.96 \times 10^{-6} \quad (5-10)$$

$$I_{F^{2-}} = I_0 \times 10^{-9.96 \times 10^{-6}} = 0.9999771 \times I_0 = T_{F^{2-}} \times I_0 \quad (5-11)$$

$$O_{F^{2-}} = 1 - T_{F^{2-}} = 1 - 0.9999771 = 2.29 \times 10^{-5} \quad (5-12)$$

$$A_{FH-} = \varepsilon cl = 32000 \times (1 \times 10^{-6} \times 0.17) \times (3 \times 10^{-4}) = 1.63 \times 10^{-6} \quad (5-13)$$

$$I_{FH-} = I_0 \times 10^{-1.63 \times 10^{-6}} = 0.99999624 \times I_0 = T_{FH-} \times I_0 \quad (5-14)$$

$$O_{FH-} = 1 - T_{FH-} = 1 - 0.9999964 = 3.76 \times 10^{-6} \quad (5-15)$$

となる。F²と FH⁻の量子収率 Φ_F を吸収率 O にそれぞれ掛け合わせて合算すると、蛍光強度（励起光に対する比）を求めることができる ($I_0 = 1$ とした)。

$$I_{em} = I_{ex} (O_{F2-} \Phi_{F,F2-} + O_{FH-} \Phi_{F,FH-}) = 2.27 \times 10^{-5} \cdot I_{ex} \quad (5-16)$$

逆数をとると、

$$I_{ex}/I_{em} = 44000 \quad (5-17)$$

入射した励起光は、発生する蛍光の約 44000 倍（フォトン数）である。

5.5 金属隔壁マイクロピラー吸収フィルタ

5.5.1 吸収フィルタ配置時の課題

レンズレス小型デジタル ELISA 装置において、吸収フィルタを反応チャンバと CMOS イメージセンサの間に配置した場合、蛍光の発光点から CMOS イメージセンサの間に最低でもフィルタの厚さ分の距離が必要になる。ここで、距離が開くことによる弊害について明らかにしておく。

全方向に均一に蛍光を発する点光源からイメージセンサまでの距離 d と受光部を直径 a の円形あるいは、一辺 a の正方形と見なした場合、全蛍光の何パーセントが受光部に到達するかを見積もることができる。横軸を $F = d/a$ として図 5-6 にグラフ化した。Dandin らは、円形および正方形の受光部で受ける光の割合をカップリング効率 (Coupling efficiency, CE) として、図 5-6 のグラフ内に示した受光サイズと受光距離の式で表している [16]。

例えば、第 2 章で紹介したファイバーオプティックプレートを搭載したシステムにおいて受光面を $a=10$ (一辺 $10 \mu\text{m}$) の正方形とすると、反応チャンバから $70 \mu\text{m}$ 離れているので、 $F=7$ となり、到達蛍光量は全蛍光量のわずか 0.16% である (実際には吸収フィルタによる蛍光の吸収もあるので、さらに小さい値となる)。また、隣接画素の受光部へのクロストークの問題も生じるため、対策が必要である。

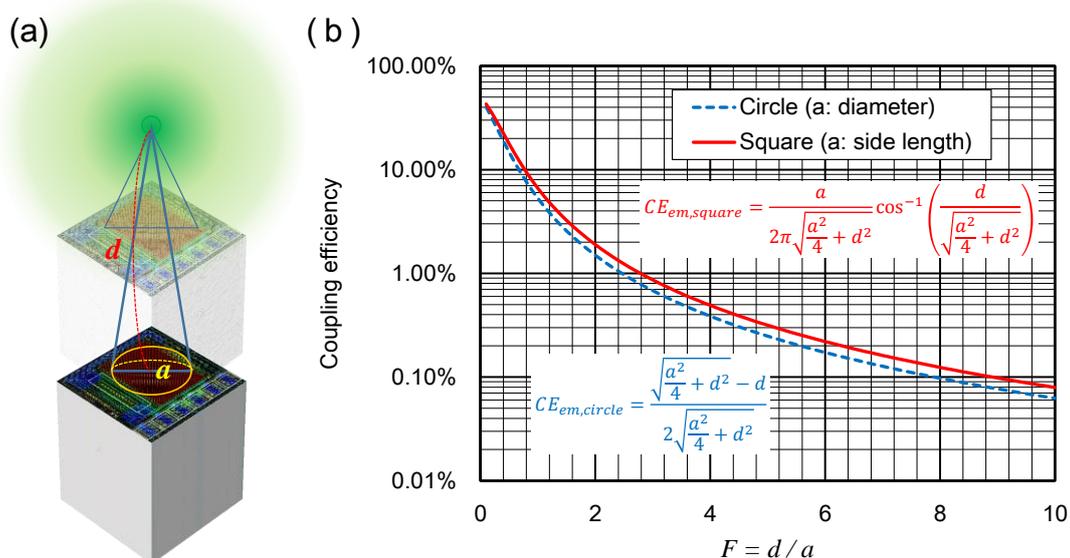


図 5-6 点光源から投影面へ到達する光の割合
(a) パラメータ定義、(b) 距離 (F 値) と到達割合の関係

5.5.2 マイクロピラーフィルタを使ったレンズレス ELISA 装置概要

蛍光体（蛍光反応チャンバー）と受光部（CMOS イメージセンサ）の間には励起光除去機能が必要なため、それらにはある程度の距離が必要になる。こうした状況下でカップリング効率の劣化を抑制するためには、何らかの集光機能を導入する必要がある。

そこで、図 5-7 に示すような反射率の高い金属によるパイプを形成し、そのパイプ内を励起光吸収フィルタで充填するような構造を考えた。このような構造の 1 つ 1 つを CMOS イメージセンサの画素に対応させることにより、隣接画素への蛍光の漏れ（クロストーク）も防ぐことができる。

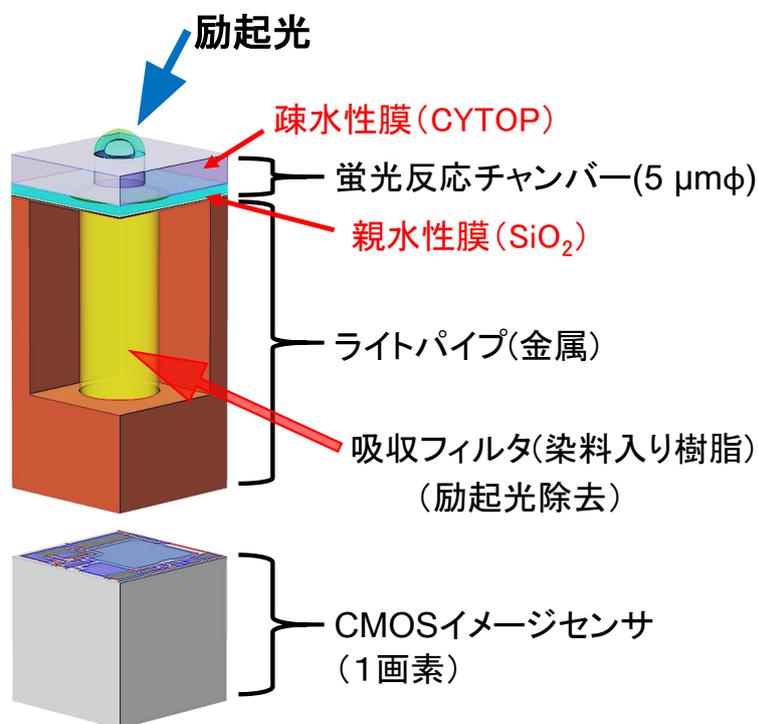


図 5-7 マイクロピラー吸収フィルタを使ったレンズレスデジタル ELISA 装置概要

すなわち、ライトパイプアレイによって蛍光を高効率に受光部へ導き、ライトパイプ内に充填された励起光吸収フィルタ（マイクロピラー吸収フィルタ）アレイによって励起光を除去することができる。

射角度依存性があり、図 5-9 のように角度を定義して、s 波の反射率を R_s 、p 波の反射率を R_p 、非偏光の反射率を R とすると、(5-18)~(5-20)式のような形で表すことができる。

なお、複素屈折率は $\tilde{n}_2 = n_2 + ik_2$ のように、屈折率 (n) と消衰係数 (k) で表すことができる。これらの複素屈折率の値は、データベース[80]から引用することで計算した。(屈折率には光の波長依存性があるので、計算する波長に対応した値を使用する。)

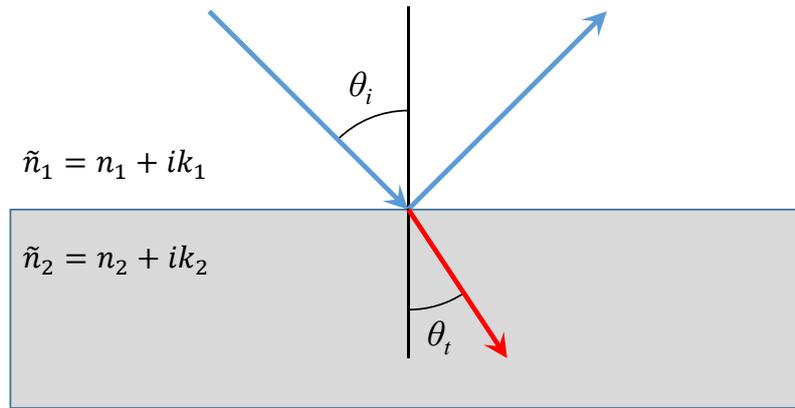


図 5-9 反射率計算 光の入射角 θ_i の定義

$$R_s = \left| \frac{\tilde{n}_1 \cos \theta_i - \tilde{n}_2 \cos \theta_t}{\tilde{n}_1 \cos \theta_i + \tilde{n}_2 \cos \theta_t} \right|^2 = \frac{\left| \tilde{n}_1 \cos \theta_i - \tilde{n}_2 \sqrt{1 - \left(\frac{\tilde{n}_1 \sin \theta_i}{\tilde{n}_2}\right)^2} \right|^2}{\left| \tilde{n}_1 \cos \theta_i + \tilde{n}_2 \sqrt{1 - \left(\frac{\tilde{n}_1 \sin \theta_i}{\tilde{n}_2}\right)^2} \right|^2} \quad (5-18)$$

$$R_p = \left| \frac{\tilde{n}_1 \cos \theta_t - \tilde{n}_2 \cos \theta_i}{\tilde{n}_1 \cos \theta_t + \tilde{n}_2 \cos \theta_i} \right|^2 = \frac{\left| \tilde{n}_1 \sqrt{1 - \left(\frac{\tilde{n}_1 \sin \theta_i}{\tilde{n}_2}\right)^2} - \tilde{n}_2 \cos \theta_i \right|^2}{\left| \tilde{n}_1 \sqrt{1 - \left(\frac{\tilde{n}_1 \sin \theta_i}{\tilde{n}_2}\right)^2} + \tilde{n}_2 \cos \theta_i \right|^2} \quad (5-19)$$

$$R = \frac{R_s + R_p}{2} \quad (5-20)$$

蛍光波長 (525 nm) の各種金属の反射率の角度依存性を図 5-10 に示した。ここで、 \tilde{n}_1 は吸収フィルタ母材の複素屈折率であり、これらのグラフの計算では、1.6 とした ($k=0$)。これは、エポキシ系樹脂を想定した値である。

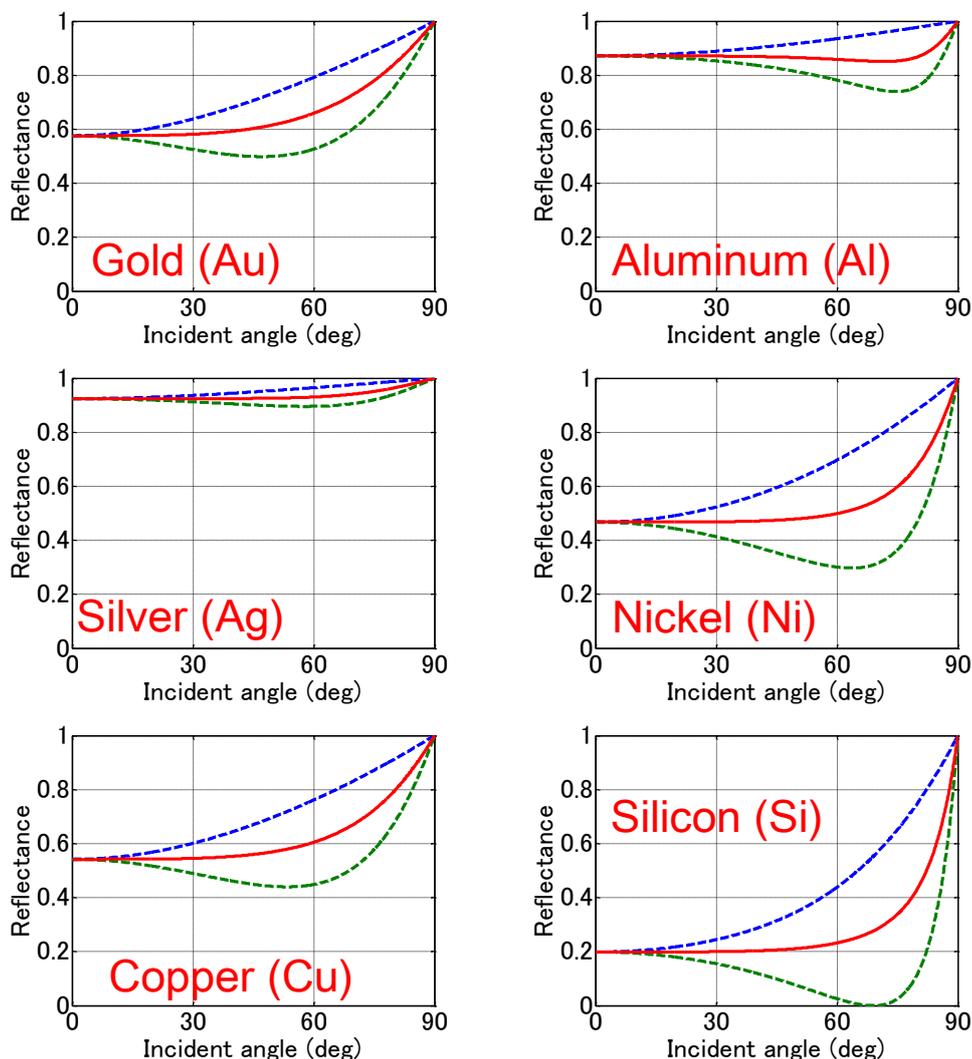


図 5-10 各種金属の反射率の光入射角依存性
 $\lambda = 525 \text{ nm}$, $n_1 = 1.6$ として計算

5.5.5 吸収フィルタの吸収による減衰

シミュレーションモデルを示した図 5-8 において、 θ が大きくなると反射回数が増え同時に光が吸収フィルタを通過する実質距離が長くなる、この距離は反射せずに直進するとした仮想の経路長 $l_{f\theta}$ と等しくなり、図 5-8 にも示したように、 $l_{f\theta} = l_f / \cos \theta$ と表すことができる。吸収フィルタの透過率を垂直入射時（経路長 l_f に対応） T_f とし、 $l_{f\theta}$ に対して $T_{f\theta}$ とすると、ランベルトーベールの法則を適用して、

$$T_{f\theta} = T_f^{(l_{f\theta}/l_f)} = T_f^{(1/\cos \theta)} \quad (5-21)$$

仮定の蛍光点光源から放射される光の強度は、 θ に対応する立体角 ω と比例関係になっており、 $\omega = 2\pi(1 - \cos \theta)$ の関係から $\cos \theta = 1 - \omega/2\pi$ であるので、(5-21)式を ω の関数に書き換えると、

$$T_\omega = T_f \left(\frac{1}{1 - \frac{\omega}{2\pi}} \right) \quad (5-22)$$

となる。

5.5.6 マイクロピラー吸収フィルタを透過する蛍光強度の計算

反射による減衰と吸収フィルタによる吸収による減衰を考慮すると、どちらの減衰も無いと仮定した蛍光強度を I_0 とすると、立体角 ω における蛍光強度 $I_{sr}(\omega)$ は、反射回数を n_ω とすると、

$$I_{sr}(\omega) = I_0 T_\omega R_\omega^{n_\omega} = I_0 T_f^{1 - \frac{\omega}{2\pi}} R_\omega^{n_\omega} \quad (5-23)$$

透過強度は、これを ω で積分することにより求めることができる。積分範囲は点光源から下方向に向かう光で十分なので下半球分の $0 \sim 2\pi$ とする。すなわち全透過強度を I_{total} とすると、

$$I_{total} = \int_0^{2\pi} I_{sr}(\omega) d\omega = \int_0^{2\pi} I_0 T_\omega R_\omega^{n_\omega} d\omega = \int_0^{2\pi} I_0 T_f^{1 - \frac{\omega}{2\pi}} R_\omega^{n_\omega} d\omega \quad (5-24)$$

と、表すことができる。

実際の数値計算では、入力強度に対する比を得たいので、 $I_0=1$ とした。なお、反射回数 n_ω は、

$$n_\omega = \left(\frac{l_f \tan \theta}{d_f/2} + 1 \right) / 2 = R_a \tan \theta + 1/2 \quad (5-25)$$

で、小数点以下を切り捨てた整数値とした。ここで、 $R_a = l_f/d_f$ (アスペクト比) である。計算例として、図 5-11 には、 T_ω 、 R_ω 、 n_ω のそれぞれの立体角 ω 依存性を示した。また、図 5-12 には、 $T_\omega R_\omega^{n_\omega}$ の立体角 ω 依存性を示しており、さらにその積分を図 5-13 に示した。なお、これらの図は、銅 (Cu) で隔壁を形成し、吸収フィルタはエポキシ系樹脂 (屈折率 1.6)、吸収フィルタは垂直入射時の透過率が $10 \mu\text{m}$ 厚あたり 0.8 の材料で $30 \mu\text{m}$ 厚のものを作った場合 (直径は $8 \mu\text{m}$) を想定した計算結果である。なお、計算は MATLAB (MathWorks, Inc.) によるプログラム計算で実施した。

図 5-14 は図 5-13 と同じ計算の結果であるが、横軸を立体角 ω に対応する円錐の半頂角 θ に置き換えて直感的に分かりやすくしている。全蛍光量は 4π で

あるので、何パーセントが透過したかは簡単に計算することができる。この例では、透過光は 0.115π であるので、全蛍光の $(0.115\pi/4\pi) \times 100 = 2.9\%$ が透過している。図 5-14 において、グラフの曲線中に反射回数 n_ω の変化点を赤点で示している。

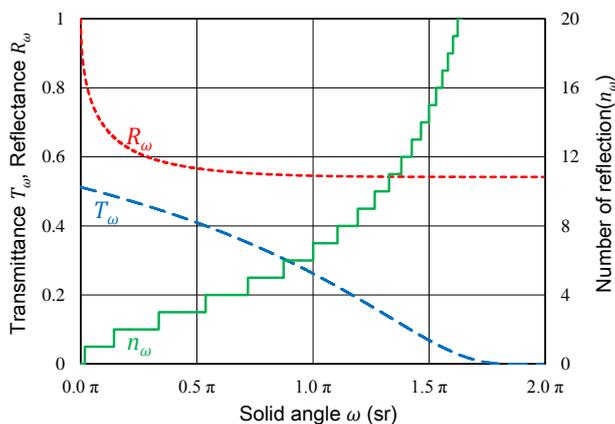


図 5-11 マイクロピラー吸収フィルタ パラメータの立体角依存性
 隔壁：Cu、吸収フィルタ屈折率 1.6、 $l_f/d_f = 30/10$ 、 $T_f = 0.8@l_f = 10\ \mu\text{m}$ の場合の計算値

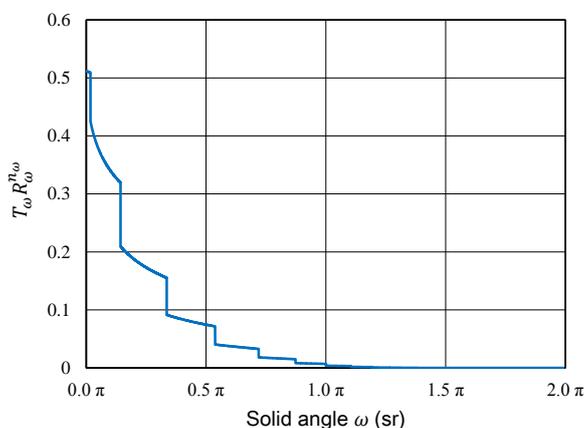


図 5-12 マイクロピラー吸収フィルタの減衰率の角度依存性
 隔壁：Cu、吸収フィルタ屈折率 1.6、 $l_f/d_f = 30/10$ 、 $T_f = 0.8@l_f = 10\ \mu\text{m}$ の場合の計算値

図 5-14 においては、半頂角 60° 以下で積分値がほぼ飽和している様子も見てとれる。すなわち半頂角 60° 以上の光はこのような条件で作製したマイクロピラー吸収フィルタをほとんど透過しないことを示している。

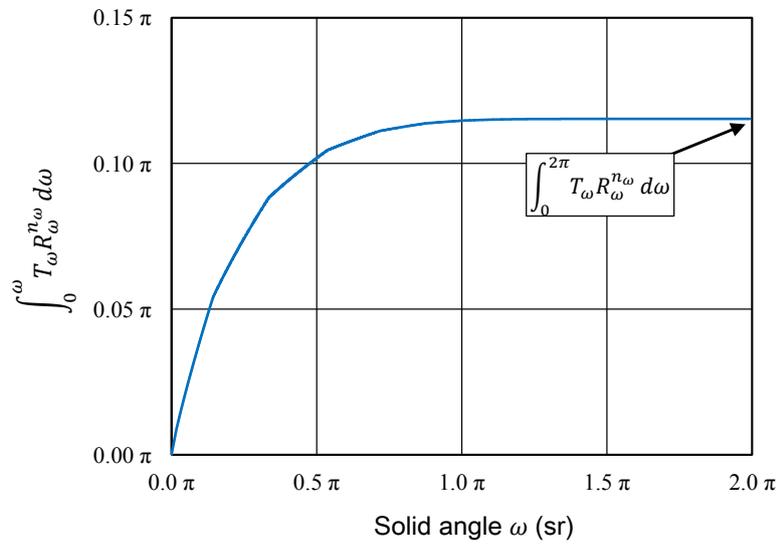


図 5-13 マイクロピラー吸収フィルタの蛍光透過強度（立体角表示）
 隔壁：Cu、吸収フィルタ屈折率 1.6、 $l_f/d_f=30/10$ 、 $T_f=0.8@l_f=10\ \mu\text{m}$ の場合の計算値

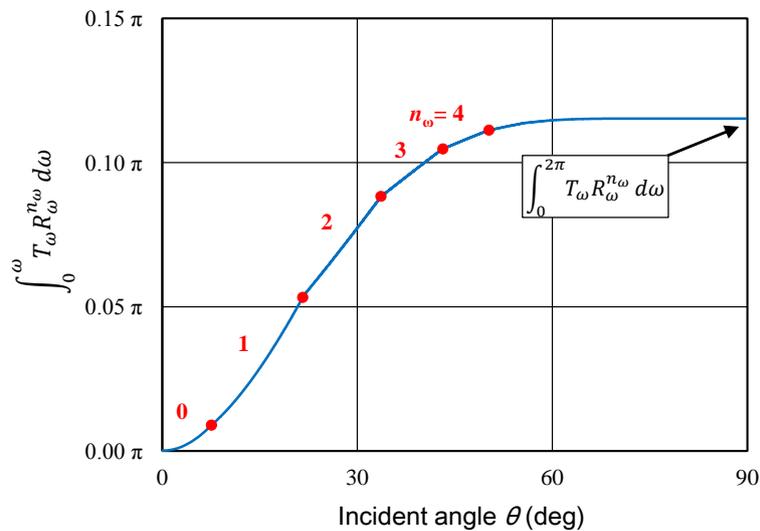


図 5-14 マイクロピラー吸収フィルタの蛍光透過強度（半頂角表示）
 隔壁：Cu、吸収フィルタ屈折率 1.6、 $l_f/d_f=30/10$ 、 $T_f=0.8@l_f=10\ \mu\text{m}$ の場合の計算値

ここまでの計算と同様に、ライトパイプの形状（深さ、直径）や吸収フィルタの蛍光透過率を変化させた時の蛍光カップリング効率の変化の様子を図 5-15 および図 5-16 に示した。これらの図の縦軸は、点光源として仮定した蛍光体から発せられる全蛍光のうちライトパイプを透過する蛍光成分を百分率で表した

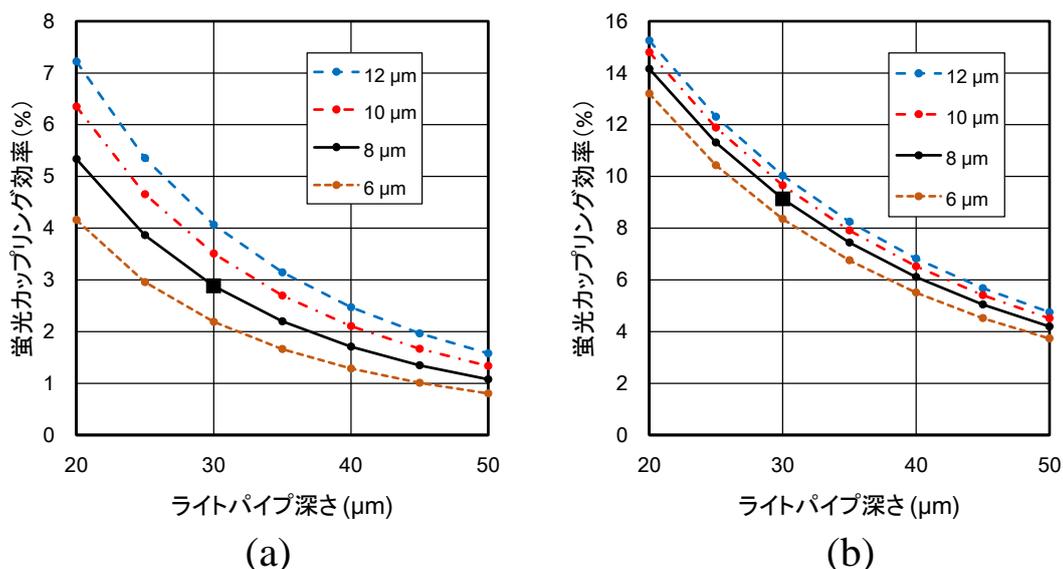


図 5-15 ライトパイプ蛍光カップリング効率のサイズ依存性
 グラフ中の凡例はライトパイプ直径
 充填吸収フィルタの垂直入射蛍光透過率：0.8 @ $t_{\text{filter}}=10 \mu\text{m}$ 固定
 (a) 銅 (Cu) ライトパイプ、(b) 銀 (Ag) ライトパイプ

ものである。図 5-16 の横軸において、透過率 = 1 は、吸収フィルタによる減衰が無い状態になる。なお、ここまでに示した計算例の形状あるいは透過率に対応するデータ点をこれらのグラフ中において、四角シンボル (■) で表示している。

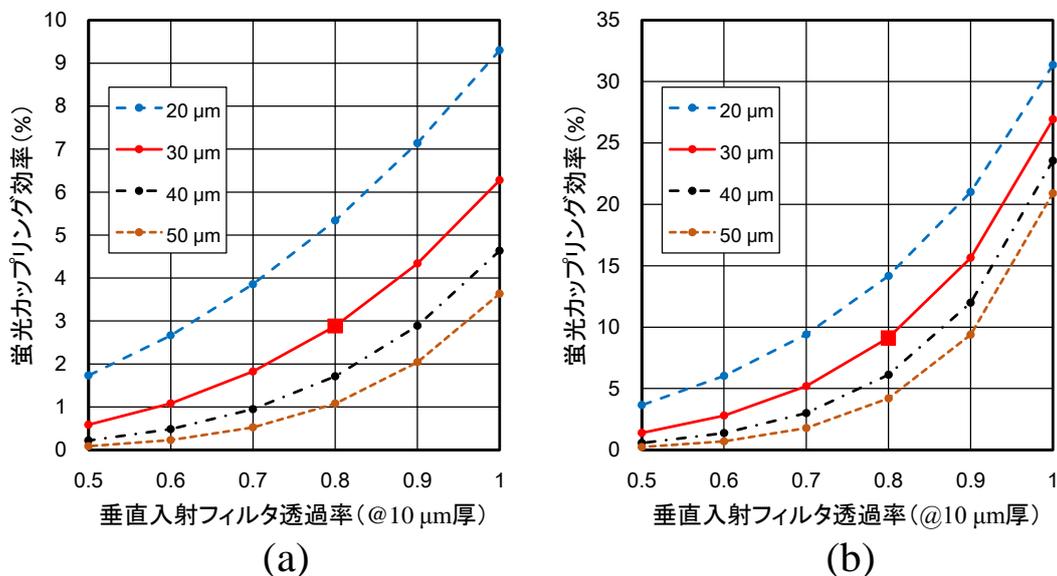


図 5-16 ライトパイプ蛍光カップリング効率のフィルタ透過率依存性
 グラフ中の凡例はライトパイプ深さ (ライトパイプ直径：8 μm 固定)
 (a) 銅 (Cu) ライトパイプ、(b) 銀 (Ag) ライトパイプ

電解めっき法で作製しやすい銅だけでなく反射率の高い銀を使用したライトパイプのシミュレーション結果も同時に示している。反射による減衰の小さい銀ライトパイプでは、銅ライトパイプに比べて2倍以上のカップリング効率が得られている。

5.6 励起光吸収フィルタの検討

ライトパイプ内に充填する励起光吸収フィルタについては、FOP を搭載したデジタル ELISA で、FOP と CMOS イメージセンサの接着および励起光吸収で使われた染料入り接着剤が参考になる。この時、染料としては、黄色染料 Varifast Yellow 3150 (Orient Chemical Industries Co., Ltd.) が使用され、接着剤としては、アクリル系紫外線硬化樹脂の NOA63 (Norland) が使用された。また染料の溶解には溶媒としてシクロペンタノンが使用された。この構成で、薄膜フィルムを作製して、その透過スペクトルが取得されている。図 5-17 に膜厚 4 μm のフィルタ (重量比、染料：樹脂：溶媒=1:1:1 で作製) の透過スペクトルを示す。このデータによると、525 nm (蛍光) の透過率は、0.62、470 nm (励起光) の透過率は 0.0052 である。

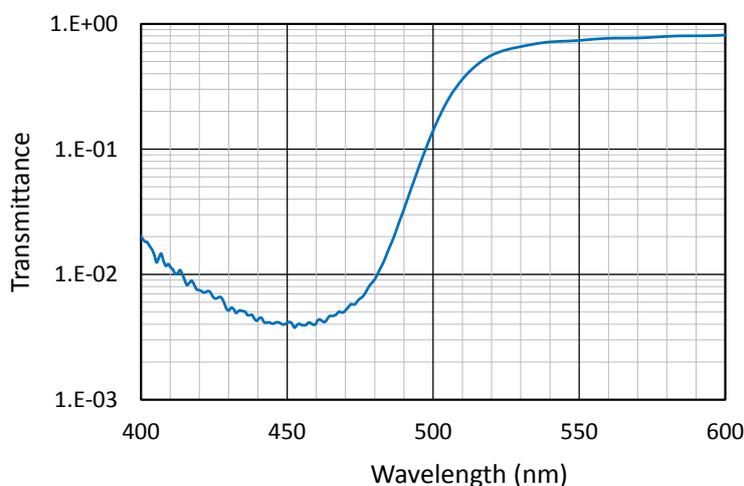


図 5-17 薄膜フィルタの透過スペクトル
(Varifast Yellow 3150 in NOA63, 4 μm 厚)

前項の計算例では、吸収フィルタの蛍光の透過率を厚さ 10 μm 相当で 0.8 としたので、計算で使用した 30 μm 厚での垂直光透過率は $0.8^{(30/10)}=0.512$ となっている。ランベルトーベールの法則に従うとすれば、この蛍光透過率に対応する励起光の透過率も計算できて、励起光の透過率は、約 0.00063 となる。この蛍光および励起光の透過率特性を、30 μm 厚の薄膜で作製しようとした場合、図 5-17 で特性を示した膜厚 4 μm の薄膜フィルタの染料濃度に対して、1/5 以下の染料濃度で達成可能である。

前項までの計算例において、全蛍光のうち 2.9% が受光部に到達し、励起光が全蛍光の 44000 倍と計算されている。ここで、仮に励起光が垂直入射成分だけで吸収フィルタを透過すると考えると、蛍光に対して、 $44000/0.029 \times 0.00063 \approx 960$ 倍の励起光が受光部に入射することになる。4T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサの PD2 においては、蛍光に対して励起光感度が 1/5 程度と低いため、出力画素値換算では、約 1/200 の蛍光を検出することになる。すなわち、励起光でイメージセンサの出力が 500 mV (飽和画素値の 50%) 程度出ている時に 2.5 mV を検出するということになり、100 フレーム積算時の最小検出電圧をバラツキ標準偏差の 3σ で考えても、その 5 倍の変化であるので、余裕を持って検出できる。

蛍光のライトパイプ透過の角度依存性から予測できるように、励起光を斜め入射にすることで、さらに励起光除去率を高めることができると考えられる。このため、照射励起光強度を上げることにより蛍光強度を強くして観察することが可能である。

吸収フィルタの性能に関しては、遮断したい波長の光と、透過させたい波長の光の透過率の比が重要になる。蛍光と励起光の透過率の比を性能指数 (Figure of merit : *Q-value*) として表すことができる。*Q* 値の厳密な定義は、Hofmann ら [17] により提示されている式、

$$Q = \frac{[\int_0^\infty I_{\text{analyte}}(\lambda)T(\lambda)d\lambda]/[\int_0^\infty I_{\text{analyte}}(\lambda)d\lambda]}{[\int_0^\infty I_{\text{exc}}(\lambda)T(\lambda)d\lambda]/[\int_0^\infty I_{\text{exc}}(\lambda)d\lambda]} \quad (5-26)$$

で表すことができる。ここで、 I_{exc} と I_{analyte} はそれぞれ光源と検体の発光スペクトルである。蛍光、励起光の波長域が狭い (単一波長に近い) 場合は、Hofmann らも使用している簡便な次式でもフィルタの性能評価が可能である。透過したい波長 (蛍光) とブロックしたい波長 (励起光) をそれぞれ、 $\lambda_{\text{transmit}}$ および λ_{block} として、

$$Q = \frac{T(\lambda_{\text{transmit}})}{T(\lambda_{\text{block}})} \quad (5-27)$$

と表すことができる。透過率は膜厚や染料濃度に対して指数関数的に変化するので、図 5-17 のような特性を持つフィルタの場合、膜厚を厚くすることや、濃度を高くすることで *Q* 値を上げることが可能である (但し、透過光の絶対強度は低下する)。

励起光強度を無制限に上げることが出来るのであれば *Q* 値の高いフィルタを作れば良いのであるが、実際には、次項に示す光退色の影響も考慮しておく必要がある。

5.7 光退色現象による励起光強度の制限

蛍光強度を上げるためには励起光強度を上げることが有効である。しかしながら、強い励起光は光退色 (photobleaching) の速度も上げてしまう。一方、CMOS イメージセンサによる高感度、低ノイズ測定を実現するためには、長時間露光やフレームの積算が必要になるため光退色の影響が大きいと測定時間内で蛍光が減衰することが問題となる。ここでは、フルオレセインの光退色速度のシミュレーションを行い、レンズレスデジタル ELISA における適切な励起光強度について考察する。

5.7.1 フルオレセイン水溶液の光退色

フルオレセインの光退色は、Song ら [81]によってまとめられており、図 5-18 のジャブロンスキーダイアグラムで示される過程の中で化学変化することにより起こると考えられる。S は、基底状態 (ground state) のフルオレセインに対応し、S*および T*は励起状態で、それぞれ一重項状態および三重項状態である。

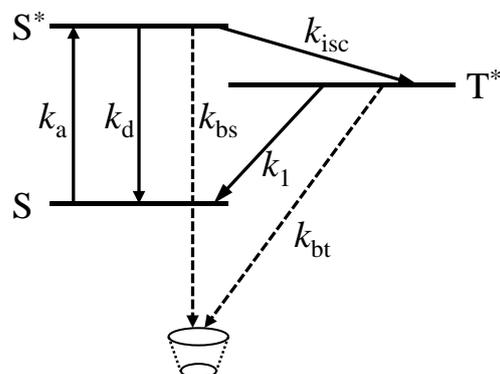


図 5-18 光退色の説明図
(Jablonski energy diagram)

2014 年 Beutler ら [82]は、エピ蛍光顕微鏡で酸素濃度を測定するために光退色速度の酸素濃度依存性を利用しており、Song らのまとめた式によるシミュレーションと検証実験により、フルオレセイン濃度と励起光強度を最適化することで、通常のエピ蛍光顕微鏡と CCD カメラによって、酸素濃度分布のイメージングが可能であることを示している。こうしたイメージングができるということは、Song らによってまとめられた光退色に関わる反応速度定数が妥当であることの裏づけにもなっている。

デジタル ELISA においては、微小チャンバー内の濃度 $1 \mu\text{M}$ 程度のフルオレセインが発する蛍光を検知しなければならない。濃度検知のためには、励起光強度を上げることや、光ショットノイズや電氣的ノイズを除去するために長時間露光や、積算によるノイズ低減が必要である。したがって、励起光によるフルオレセインの退色の影響を考慮しておくことが重要である。次に示す式(5-28)~(5-33)は、光退色に関わる反応速度定数と濃度の変化量の関係を表している。表 5-2 には、速度定数の値を説明とともにまとめた。

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[N_S(t)] = & [k_d N_{S^*}(t) + k_1 N_{T^*}(t) + k_2 N_{T^*}^2 + k_3 N_{T^*}(t) N_S(t) \\ & + k_6 N_{T^*}(t) N_X(t) + k_7 N_{T^*}(t) N_R(t) + k_8 N_{T^*}(t) N_{O_2}(t)] \\ & - [k_a N_S(t) + k_5 N_{T^*}(t) N_S(t)] \end{aligned} \quad (5-28)$$

$$\frac{d}{dt}[N_{S^*}(t)] = k_a N_S(t) - [k_d N_{S^*}(t) + k_{isc} N_{S^*}(t)] \quad (5-29)$$

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[N_{T^*}(t)] = & k_{isc} N_{S^*}(t) - [k_1 N_{T^*}(t) + k_2 N_{T^*}^2 + k_3 N_{T^*}(t) N_S(t) \\ & + 2k_4 N_{T^*}^2 + k_5 N_{T^*}(t) N_S(t) + k_6 N_{T^*}(t) N_X(t) \\ & + k_7 N_{T^*}(t) N_R(t) + k_8 N_{T^*}(t) N_{O_2}(t) \\ & + k_9 N_{T^*}(t) N_{O_2}(t)] \end{aligned} \quad (5-30)$$

$$\frac{d}{dt}[N_X(t)] = k_4 N_{T^*}^2 + k_5 N_{T^*}(t) N_S(t) + k_9 N_{T^*}(t) N_{O_2}(t) \quad (5-31)$$

$$\frac{d}{dt}[N_R(t)] = k_4 N_{T^*}^2 + k_5 N_{T^*}(t) N_S(t) \quad (5-32)$$

$$\frac{d}{dt}[N_{O_2}(t)] = -k_9 N_{T^*}(t) N_{O_2}(t) \quad (5-33)$$

表 5-2 フルオレセインの光化学反応と速度定数

Reaction	Description	Rate constants
$S + h\nu \rightarrow S^*$	Absorption	k_a : depends on ex. (see text)
$S^* \rightarrow S + h\nu'$	Fluorescence emission	$k_d = 2.134 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$
$S^* \rightarrow S$	Internal conversion	
$S^* \rightarrow T^*$	Intersystem crossing	$k_{isc} = 6.6 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$
$T^* \rightarrow S$	Radiationless deactivation	$k_1 = 50 \text{ s}^{-1}$
$T^* + T^* \rightarrow T^* + S$	Triplet quenching	$k_2 = 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + S \rightarrow S + S$		$k_3 = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + T^* \rightarrow R + X$	Electron transfer	$k_4 = 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + S \rightarrow S + X$	Electron transfer	$k_5 = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + X \rightarrow S + X$	T^* quenching by X	$k_6 = 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + R \rightarrow S + R$	T^* quenching by R	$k_7 = 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + O_2 \rightarrow S + O_2$	Physical quenching by O_2	$k_8 = 1.56 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$T^* + O_2 \rightarrow X + HO_2$ (or O_2^-)	Chemical quenching by O_2	$k_9 = 1.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Song (1995) らのまとめた表を引用。 $k_6 + k_7 = 1 \times 10^9$ と区別されていないがシミュレーション時は上表の値で実施した。 k_a は 1 分子のフルオレセインが 1 秒間に何回励起されるかを表すものなので励起光強度に依存する (詳細は本文参照)。

5.7.2 励起光強度と吸収の速度定数 k_a の関係

励起光吸収の速度定数 k_a は、1 分子のフルオレセインが 1 秒間に何回励起されるかを表す値である。すなわち、



の反応において、1 秒間に吸収される励起光フォトン数である。したがって、概ね励起光強度に比例する値となる。

速度定数 k_a は、励起光強度とモル吸光係数 ϵ から算出することができる。Tsien ら[83]は、励起光波長が 488 nm ($\epsilon = 80,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) の場合の k_a の値を導出している。すなわち、出力 1 mW のアルゴンイオンレーザーで顕微鏡の対物レンズを通して照射した場合、 $1/e^2$ 半径 0.25 μm のガウス分布スポットの中心励起光強度は、 $5.1 \times 10^5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($1.25 \times 10^{24} \text{ photons} \cdot \text{cm}^{-2}$) となり、この中心励起光強度に対しては、 $k_a = 3.8 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ となるとしている。

レンズレスデジタル ELISA 装置における励起光吸収の速度定数 k_a を計算していく。使用する励起波長が 470 nm の場合、モル吸光係数 $\epsilon = 40,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ である。

ここから、デジタル ELISA の 1 つのドロップレットチャンバーのサイズで議論を進めていく。チャンバーサイズを直径 $d = 5 \mu\text{m}$ 、深さ $l = 3 \mu\text{m}$ とする。フルオレセイン濃度を検出目標の $c = 1 \mu\text{M}$ とすると、ランベルトーベールの法則

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = \epsilon c l$$

より、励起光の吸収割合が計算できる。上記の条件で $I_0 = 1$ とすると、吸収される励起光 ($1 - I$) は、 2.76×10^{-5} となる。ここで、一例として励起光の光強度を $W = 5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ とする。1 秒当りの励起フォトン数 $N_{\text{ph,ex}}$ に換算すると、 $N_{\text{ph,ex}} = W\lambda/(hc) = 1.18 \times 10^{16} \text{ photons} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ となる (h はプランク定数、 c は真空中の光速)。直径 $d = 5 \mu\text{m}$ のチャンバーの投影面積は $19.53 \mu\text{m}^2$ であるので、1 つのチャンバーに照射される励起フォトン数 $N_{\text{ph,ex,chamber}}$ は、 $2.32 \times 10^9 \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1}$ である。したがって、1 つのチャンバーで吸収されるフォトン数は、 $N_{\text{ph,ab,chamber}} = (1 - I) \cdot N_{\text{ph,ex,chamber}} = 6.42 \times 10^4$ 個となる。一方、 $c = 1 \mu\text{M}$ のチャンバー内に含まれるフルオレセイン分子数 $N_{\text{fl,chamber}}$ は、アボガドロ定数を 6.022×10^{23} とすると、 3.55×10^4 個である。この 1 秒間の吸収フォトン数を分子数で割って速度定数 $k_a = N_{\text{fl,chamber}} / N_{\text{ph,ab,chamber}} = 1.81 \text{ s}^{-1}$ となる。

ここで、例示した励起光強度 $W = 5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ がどういう値であるかを確認しておく。1 チャンバー当り発生する全蛍光フォトン数 $N_{\text{ph,em,chamber}}$ は、量子収率 Φ_F を 0.93 とすると、 $N_{\text{ph,em,chamber}} = \Phi_F \cdot N_{\text{ph,ab,chamber}} =$

$5.97 \times 10^4 \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1}$ となる。

ここまでに得られた実験結果や計算結果を使って検証していく。例示したライトパイプ構造では、全蛍光の 2.9% が透過すると計算された。また、4T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサのフォトノード出力電圧変換ゲインは、 $25 \mu\text{V}/\text{photon}_{525}$ であった。ライトパイプを透過した蛍光光子がすべてフォトダイオードに受光されるとすると、 $5.97 \times 10^4 \times 0.029 \approx 1700$ 個（1 秒間当り）の光子が到達し、これに対応する CMOS イメージセンサの出力電圧は 10 fps で撮影しても、170 個の光子が到達することとなる。これに対し 4T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサで 100 フレーム積算時の最小検出光子数は 18 個 (3σ) であったので、1 桁近い余裕をもって検出可能である。

次節では、この励起光強度 $5 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ における光退色を計算する。

5.7.3 光退色速度計算（溶存酸素の光退色への影響）

表 5-2 において、最終の 2 行は、溶存酸素による三重項状態に励起したフルオレセイン (T^*) の緩和に関する式であり、物理的緩和と化学的緩和を表している。化学的緩和は、フルオレセインが別の分子に変化するので光退色を引き起こす反応であり、物理的緩和はフルオレセインの基底状態 (S) に戻る変化であるため光退色を引き起こさない。物理的緩和の速度定数 k_8 は、化学的緩和の速度定数 k_9 より 1 桁高い値であるため、 T^* が比較的高濃度の場合は、酸素が関わらない T^* の化学的変化が起こる前に酸素が物理的緩和を起しやすくするために光退色が起こりにくくなる可能性を示唆している。この様子を確認するために前述の 6 つの微分方程式を数値計算することにより各成分の濃度の時間変化を求めた。計算は MATLAB (Mathworks, Inc.) で作成したプログラムで行った。 $\Delta t = 5 \text{ ns}$ として初期濃度から順次、濃度変化量 ($\Delta N/\Delta t$) を所望の経過時間まで繰り返し加算することにより計算した（これ以上大きな Δt を設定すると変化量が大きすぎて収束しない）。

溶存酸素濃度の影響は、Song らの手法に倣って、酸素飽和濃度を $250 \mu\text{M}$ 、脱気状態の濃度を $0.025 \mu\text{M}$ として、この 2 種類の濃度で比較することとした。図 5-19 は、励起光吸収の速度定数 k_a を 1.81 s^{-1} （励起光強度 $5 \text{ m} \cdot \text{Wcm}^{-2}$ に対応）とし、フルオレセイン濃度は検知目標の $1 \mu\text{M}$ とした場合の連続照射時の光退色の様子をシミュレートしたものである。フルオレセイン濃度が化学変化を起こしながら減少していく様子が見てとれる。励起種の濃度は桁違いに小さいので、フルオレセインの濃度減少が蛍光強度の低下に対応していると考えてよい。この条件においては、酸素濃度が高い場合の方が光退色の速度が遅くなっている。

10 秒間の励起光照射で蛍光強度は酸素飽和状態で 95.6%、酸素欠乏状態で 80.3%に低下すると計算された。デジタル ELISA の蛍光観察においては、画像取得（積算）中の蛍光低下はあるものの蛍光検出の目的は果たせるレベルと考えられる。

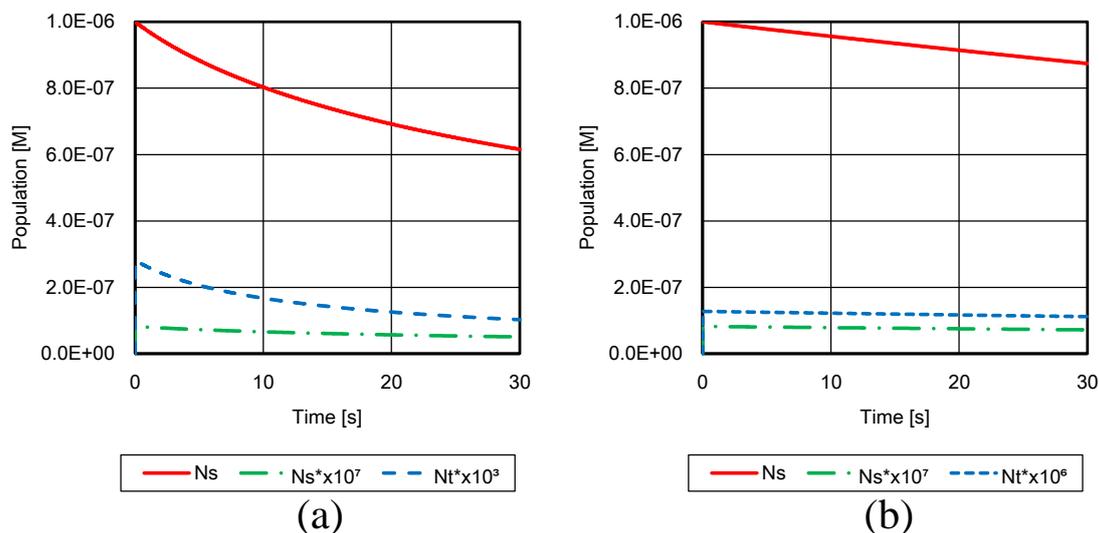


図 5-19 光退色シミュレーション結果

初期フルオレセイン濃度: 1 μM 、励起光吸収速度定数 $k_a=1.81 \text{ s}^{-1}$ (励起光強度 5 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 相当)

(a) 酸素欠乏状態 ($[\text{O}_2]=0.025 \mu\text{M}$) 赤実線: [Fluorescein], 青破線: $[\text{T}^*]\times 10^3$, 緑一点鎖線: $[\text{S}^*]\times 10^7$.

(b) 酸素飽和状態 ($[\text{O}_2]=250 \mu\text{M}$) 赤実線: [Fluorescein], 青破線: $[\text{T}^*]\times 10^6$, 緑一点鎖線: $[\text{S}^*]\times 10^7$,

※ $[\text{T}^*]$ の桁が (a) と (b) で異なっているのに注意

酸素濃度によって光退色速度が変化することは、デジタル ELISA におけるドロップレット作製の方法も光退色速度に影響を与えるということを示唆している。ドロップレット作製時は、微小なチャンバー底部に蛍光基質水溶液を馴染ませるために脱気処理が必要になるが、この方法として2種類あり、1つは真空ポンプなどによる脱気で、もう1つは冷却による気体の溶解である。ポンプによる脱気では、蛍光基質水溶液全体から溶存酸素が奪われるため低酸素濃度になる。これは光退色には不利な状態を作っていることになる。一方、冷却法では、溶存酸素はそのまま残るため光退色には有利になる。このため、ドロップレット作製は冷却法が望ましい。

ここで、励起光強度や溶存酸素濃度の条件変動に対する光退色時間の依存性をまとめておく。図 5-20(a) には、1 秒間にフルオレセイン 1 分子が何回励起されるかを表す係数 k_a の値と光退色時間の関係を示した (k_a は、ほぼ励起光強度に比例する)。計算した範囲では、光退色時間は、ほぼ励起光強度に反比例する

ことが分かる。図 5-20(b) は、 $k_a = 18.1 \text{ [s}^{-1}]$ (励起光強度 $50 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ に相当) とした時の、光退色時間の溶存酸素濃度依存性シミュレーション結果である。グラフ中の曲線の右端の計算点における溶存酸素濃度は、室温における飽和酸素濃度を仮定したものであり、 $[\text{O}_2] = 250 \text{ } \mu\text{M}$ としている。溶存酸素濃度が 2 桁程度低下したところから急激に光退色時間が短くなっていく様子がみられる。

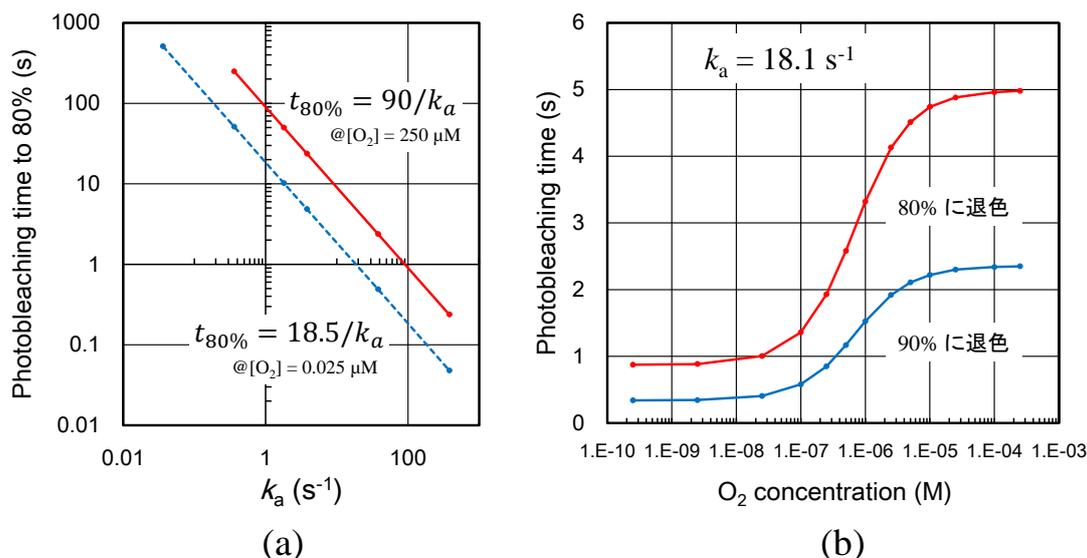


図 5-20 フルオレセイン光退色時間の変化の様子

(a) k_a (励起光強度に比例する定数) 依存性、(b) 酸素濃度依存性

5.8 考察とまとめ

本章では、ELISA で利用される代表的な蛍光分子であるフルオレセインを題材にして詳細に検証した。他の蛍光分子を使用した際にも同様の手法により考えることができる。

まず、励起光と蛍光の強度の関係を知らることが重要である。デジタル ELISA のドロップレットチャンバーサイズで目標検出濃度 $1 \text{ } \mu\text{M}$ を仮定すると、励起光強度は、全蛍光の 44000 倍であった。通常の ELISA では、観察時に酵素を失活すると同時に、蛍光強度が上がる状態 (pH コントロール等) に変更できるが、デジタル ELISA では、蛍光反応を実施する条件が観察条件になる。このことも考慮しておく必要がある。計算においてはランベルトーベールの法則が重要な役割を果たしている。

従来のライトガイドアレイ (LGA) 搭載システムやファイバーオプティックプレート (FOP) 搭載システムでは、蛍光反応チャンバーから受光部までの距離が遠いためにカップリング効率 (全蛍光の内受光部に到達する蛍光の割合) が低く

感度不足となっていた。これを解決するための新規構造として、画素サイズと同等のサイズの金属製ライトパイプアレイ構造を提案した。これは金属面の反射を利用して空間に均一に放射される蛍光を受光部に集光しようとしたものである。この構造では、励起光はライトパイプ内を吸収フィルタで埋め込むことで除去することが可能である。

反応チャンバーを点光源と仮定し単純化したモデルで透過率を計算した結果、ライトパイプ直径 $8\ \mu\text{m}$ 、深さ $30\ \mu\text{m}$ のライトパイプに $10\ \mu\text{m}$ 厚当りの蛍光透過率 0.8 の吸収フィルタを充填した場合、全蛍光の 2.9% を受光部に到達させることができると計算された。一方、従来の FOP 搭載システムでは、受光部（フォトダイオード）を一辺 $10\ \mu\text{m}$ の正方形としても、反応チャンバーアレイの基板ガラス厚 $50\ \mu\text{m}$ と吸収フィルタ厚 $20\ \mu\text{m}$ があるため、この蛍光源と受光部の距離だけでも蛍光カップリング効率率は約 0.16% と低い。さらに吸収フィルタで約 $1/10$ に減衰されていた。したがって、ライトパイプ構造の新規システムでは、従来の FOP 搭載システムに比べて約 180 倍の蛍光カップリング効率向上が見込まれる。

ライトパイプアレイで得られるカップリング効率は蛍光顕微鏡の対物レンズに匹敵するものも作製可能である。一般的な 20 倍の対物レンズでは、開口数 $\text{NA}=0.75$ (Olympus, UPLSAPO 20X) 程度である。 $F=1/(2\text{NA})=0.67$ でありカップリング効率は約 10% である。金属として反射率の高い銀を使った場合、銅で 2.9% が得られた構造で 9.1% と計算できているので、蛍光顕微鏡と同等である。

励起光除去についても、黄色染料をドープする方法で得られるフィルタで十分な蛍光透過性と励起光吸収性を持たせることが可能であると考えられる。このような吸収フィルタでは、ドープする染料濃度を上げること、または膜厚（ライトパイプ深さ）を上げることで蛍光と励起光の透過率の比である Q 値を上げることができる。しかしながら、 Q 値を上げることは透過する蛍光の絶対的な強度を下げることに繋がるため、より強力な励起光が必要になる。また、吸収フィルタの透過特性は光の波長依存性が大きいいため、励起光源としては、狭波長帯の光源の使用が望ましい。

蛍光強度を上げるためには、励起光強度を上げればよいが、上げ過ぎると光退色によりサンプルの蛍光が失われる現象が起きる可能性がある。使用する蛍光分子の性質を確認した上で励起光の設定を考える必要がある。フルオレセインにおいて、光退色シミュレーションを行った結果、本研究で作製した CMOS イメージセンサで光退色の影響を受けないレベルの励起光強度で、余裕をもって蛍光検出ができる目処を得た。

第 6 章 吸収フィルタアレイを搭載した小型デジタル ELISA システム

6.1 はじめに

本章では、第 5 章で提案したライトパイプ構造のマイクロピラー吸収フィルタアレイを用いた小型デジタル ELISA システムの作製について述べていく。

蛍光発生源であるフェムトリッターサイズの蛍光反応チャンバー (fL チャンバー) は、カップリング効率を向上させるためには、ライトパイプ入り口に極力近いほうが良いのでマイクロピラー吸収フィルタアレイと蛍光反応チャンバーアレイは、図 6-1 のような密着一体型とする。受光部の CMOS イメージセンサとは、蛍光観察時に画素とライトパイプ出口の位置合わせを行って接触させる形を考えた。この方式によると、蛍光反応チャンバー+吸収フィルタが使い捨てあるいは、数回使用可能な部品となるが、CMOS イメージセンサまたはそのユニット部は長期間にわたり使用することができる。

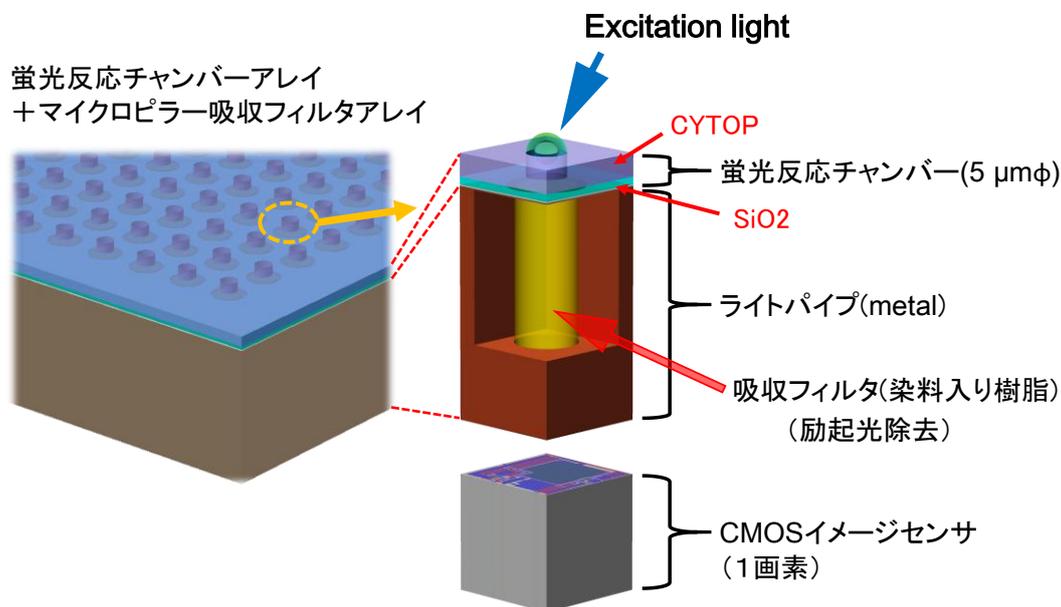


図 6-1 マイクロピラー吸収フィルタアレイと蛍光反応チャンバーアレイの構成

図 6-1 の各部の機能を説明しておく。最上部中央部は、蛍光反応チャンバーである。撥水性の薄膜 (アモルファスフッ素樹脂 CYTOP、旭硝子[84]) に直径、

約 $5\ \mu\text{m}$ の孔を空けて下地のシリコン酸化薄膜（親水性）に貫通させている。図中には蛍光基質（水溶液）のドロップレットと直径 $3\ \mu\text{m}$ の表面にモノクローナル抗体を敷きつめたポリスチレン製のマイクロビーズも描いている。

蛍光反応チャンバーの直下には、金属（今回は銅を使用）のライトパイプがありパイプ内部には、励起光を吸収する能力を持った染料をドープした樹脂が埋め込まれている。

6.2 反応チャンバー付吸収フィルタアレイ作製プロセス

蛍光反応チャンバー+吸収フィルタアレイの作製プロセスフロー概要を、図 6-2～図 6-3 の鳥瞰図で示した。ここより、これらの図のフロー番号に沿って説明していく。(主要工程の詳細については次節で説明する)

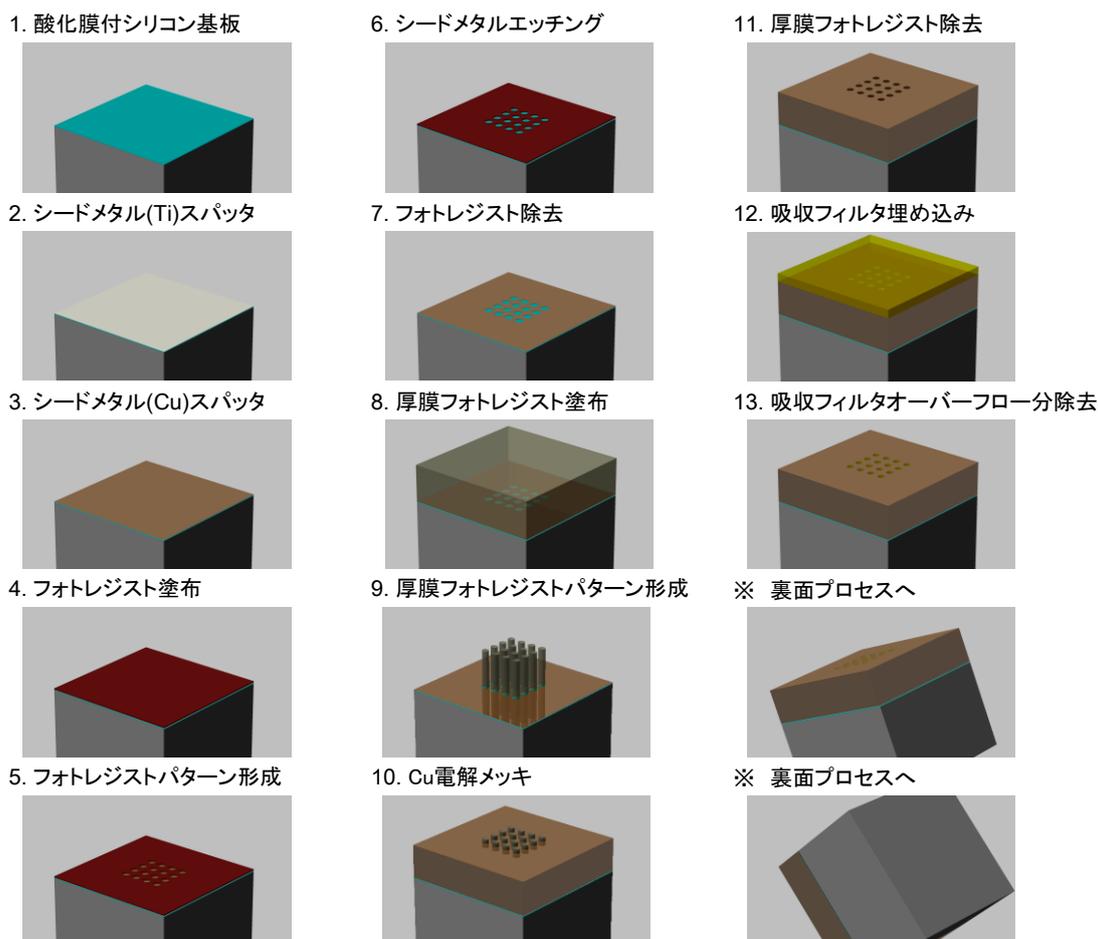


図 6-2 蛍光反応チャンバー+吸収フィルタアレイの作製プロセスフロー (1)

1. 酸化膜付シリコン基板

熱酸化 (膜厚 $1\ \mu\text{m}$) した 4 インチシリコンウェーハを開始材料として使用した。この熱酸化膜は蛍光反応チャンバーの親水性の底部として使用されることになるものである。

2～3. シードメタルスパッタ

後に電解めっきを施すので、そのための電極となるものである。今回は、

チタンおよび銅の 2 層構造としている。

4～5. フォトレジストによるパターン形成。

ライトパイプの光の通り道となる部分のシードメタルを除去するためのポジ型レジストパターンをフォトリソグラフィーにより形成する。使用するフォトマスクは円形開口アレイパターンである。

6～7. フォトレジスト開口部のシードメタルを除去した後フォトレジストを除去する工程。シードメタルにはホールがアレイ状に形成されるが全体に繋がっているので電解めっき時の電極としてはウェーハ周辺部から導通させることで問題ない。

8～9. 厚膜フォトレジストパターン形成。

ネガ型厚膜フォトレジストをスピコートし、ピラーアレイパターンをフォトリソグラフィーにより形成する。使用するフォトマスクは円形開口アレイパターンであり、開口直径は先に形成したシードメタル開口パターンより小さく形成しており、ピラーパターンはシードメタル開口の内側に形成される。

10. 電解めっきにより銅を成膜する。電解めっきは厚膜フォトレジストパターン部に沿って形成される。

11. 厚膜フォトレジストを除去する。電解めっきで形成した銅のホールアレイが現われる。

12～13. ホールアレイに別途準備した励起光を吸収する染料を混合した樹脂を埋め込む。銅表面を越える部分の樹脂は除去する。

※ この後、裏面の工程（蛍光反応チャンバーアレイ形成工程）に移る。

14～15. 基板のシリコンを完全に除去する。但し、熱酸化膜は残す。

16. 撥水性の薄膜をスピコートによって形成する。

17～18. ポジ型フォトレジストを使用し、リソグラフィーにより円形（直径 5 μm ）の蛍光反応チャンバー形成用パターンを形成する。

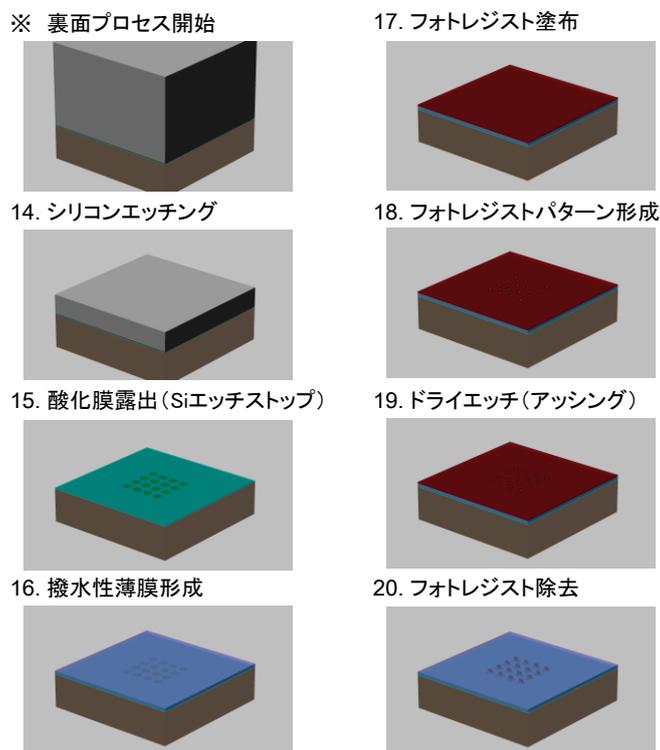


図 6-3 蛍光反応チャンバー+吸収フィルタアレイの作製プロセスフロー (2)

19. ドライエッチにより撥水性薄膜をエッチングする。

20. フォトレジストを除去して完成。

次項より、主要要素工程のプロセスフローの詳細を試作結果と合わせて述べていく。

6.3 励起光吸収フィルタ充填ライトパイプアレイの形成

6.3.1 金属ライトパイプアレイ

金属ライトパイプは電解めっき技術を使って形成した。ここから作製フローに従って詳細を示す。なお、今回は、反射率はやや低くなるが、電解めっきの容易さから金属材料としては銅 (Cu) を選定した。

プロセス開始基板

厚さ 1 μm の熱酸化を施した 4 インチシリコンウェーハを基板としてプロセスを開始した。シリコンは、最終的に仕上がった部品には残らない部分となるが、半導体製造ラインで作製しやすいこと、また、シリコン酸化膜は、KOH 溶液によるシリコン異方性ウェットエッチや、 SF_6 ガスを使ったリアクティブイオンエッチ (RIE) でのシリコンドライエッチの際に高い選択性を持つため、元の膜厚をほとんど失うことなく残すことができることからプロセス開始基板として選定した。

・シードメタル層形成

チタニウム ($t_{\text{Ti}}=50 \text{ nm}$) 次いで、銅 ($t_{\text{Cu}}=200 \text{ nm}$) をスパッタにより成膜する。チタニウムは基板との密着性の向上や、シリコンやシリコン酸化膜中への拡散バリアとしての役割を果たしている。

・シードメタルパターン形成

ライトパイプの光の通り道として予め必要部分を開口しておく。開口パターンは微小な独立した円形パターンであるので、電解めっき時の電極の導通には問題がない。

まず、ポジ型フォトレジスト (AZ6112, AZ-Electronic Materials) をスピコートにより塗布する ($t_{\text{RE}}=1.3 \mu\text{m}$)。コンタクトアライナー (MA150e, SUSS) により露光し、現像液 NMD-W (TOKYO OHKA KOGYO CO., LTD) で現像、DIW (純水) リンスの後、スピンドライヤーで乾燥する。

形成したフォトレジストパターンをマスクにして、まず銅をエッチング液 E-process WL (Meltex Inc.) でエッチングする。次いでチタニウムエッチ液 Ti etchant (Mitsubishi Chemical Corporation) でエッチングする。エッチング終了後、フォトレジストを除去液 THB-S2 (JSR Corporation) で除去する。

・厚膜フォトレジストパターン形成

電解めっきの形状を決めるために最終の銅ホールアレイの反転パターン形状を厚膜フォトレジストにより形成する。

厚膜フォトレジストは、エポキシ樹脂ベースのネガ型フォトレジストの KMPR1035 (Nippon Kayaku Co., Ltd.) を使用した。KMPR1035 は、専用の剥離液による除去が比較的容易であることから選定した。KMPR の架橋は、

- (1)露光工程 ; i 線 (365 nm) 露光により光酸発生剤から強酸が生成
- (2)露光後ベーク工程 (PEB) ; 酸の存在下で熱処理することにより架橋反応が促進

というメカニズムによって、厚膜でありながら、ほぼ垂直に切り立ったパターンの形成が可能になっている。[85]

KMPR1035 はスピコート (500 rpm, 10 秒→3000 rpm, 30 秒、膜厚 35 μm) で塗布する。ホットプレート上で 100 $^{\circ}\text{C}$ 、15 分のプリベークの後、コンタクトアライナー MA150e (SUSS) で 1000 mJ/cm^2 の i 線 (365 nm) 露光を行う。連続して 100 $^{\circ}\text{C}$ 、4 分の PEB を行った後、NMD-W (TOKYO OHKA KOGYO CO., LTD) で 23 $^{\circ}\text{C}$ 、6 分のディップ現像を行う。

現像後、出来上がったピラーパターン周辺の KMPR 残渣を除去するために、

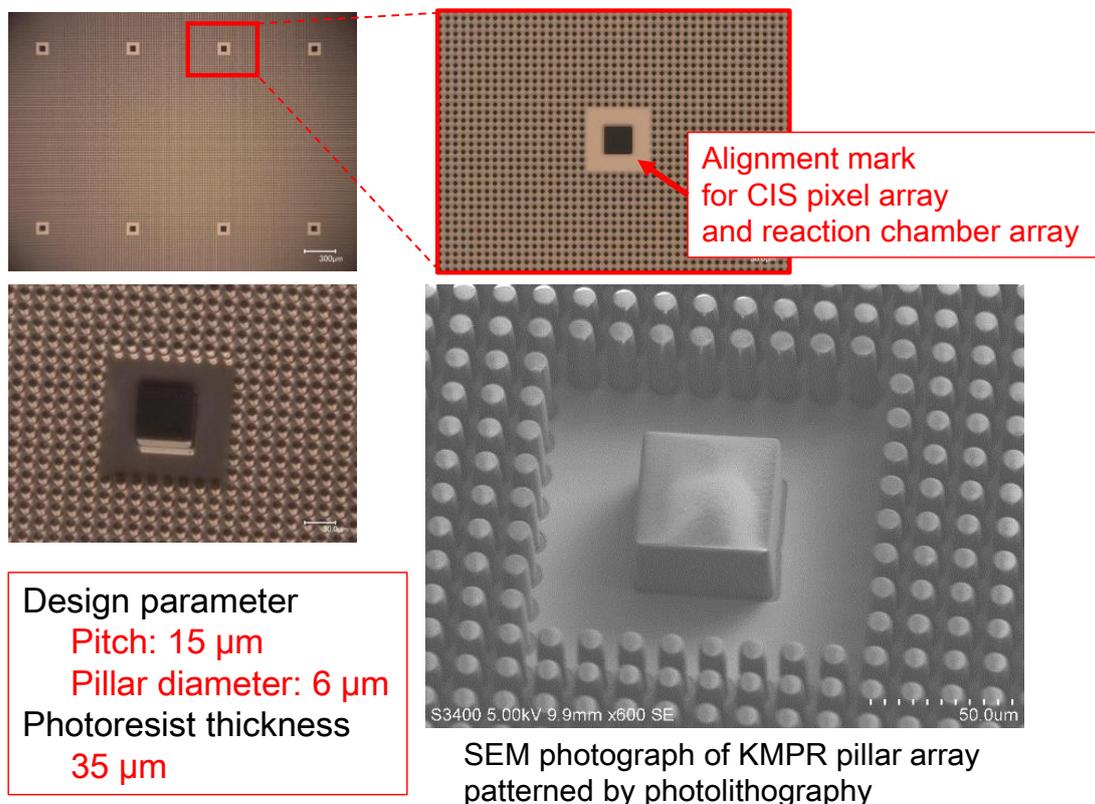


図 6-4 厚膜レジスト (KMPR 1035) パターン形成後光学顕微鏡および SEM 写真

O₂ プラズマアッシング (O₂, 40 Pa, 70 W, 240 秒) を行う (表面の KMPR 残渣はめっき形成不良につながるため十分に除去しておく必要がある)。厚膜レジストパターンの出来ばえを図 6-4 に示した

・銅めっき

めっき直前にシード層の脱脂、活性化した後、銅めっきを行う。めっき時の電流密度は 1.5 A/dm² とした。めっき厚は、30 μm とした。(KMPR ピラー高さより低くすることで、オーバーハング形状ができないようにしている)

・厚膜レジスト (KMPR) 除去

KMPR 専用の剥離液によって除去する。すなわち、まず 70 °C の Remover PG (Nippon Kayaku Co., Ltd.) に 20 分間浸漬し、膨潤剥離する。さらに、高アスペクト比パターンの剥離性能を高めるために 70 °C の Remover K (Nippon Kayaku Co., Ltd.) に 20 分浸漬し、常温の Neutralizer K (Nippon Kayaku Co., Ltd.) に浸漬し、十分に中和する。最後は、DIW リンスにより薬液を除去する。

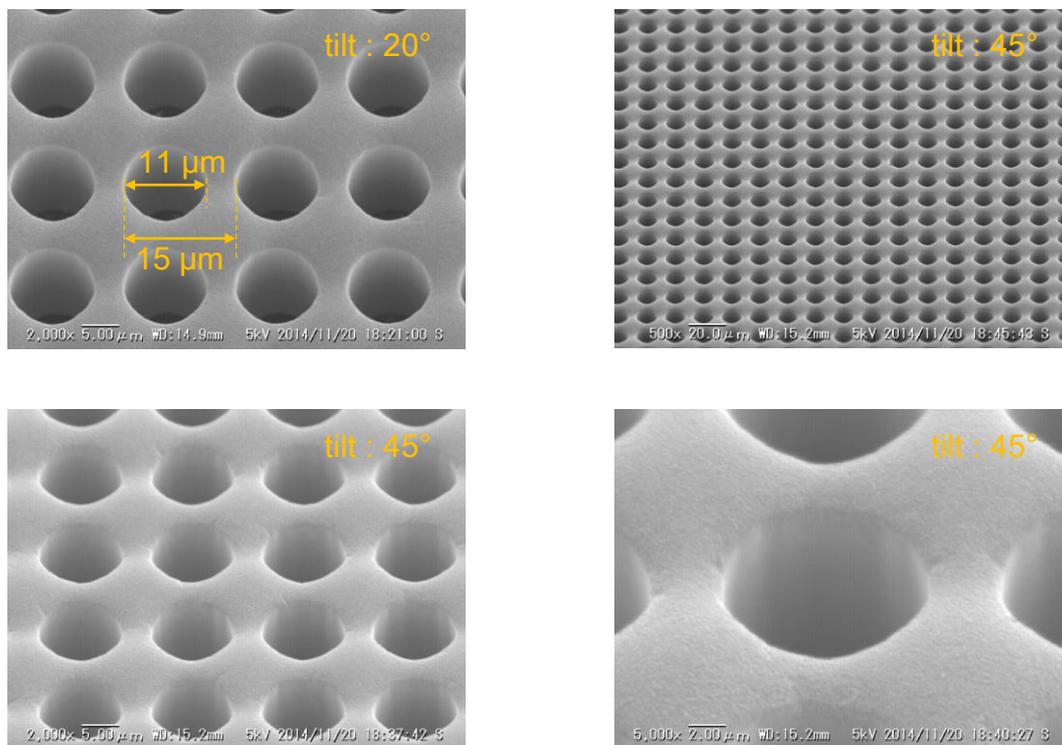


図 6-5 銅めっき、厚膜レジスト除去後 SEM 写真

6.3.2 マイクロピラー吸収フィルタアレイ

前節で作製したライトパイプに励起光を吸収する染料をドープした樹脂を埋め込んでいく。染料が均一に樹脂に溶け込んでいること、励起光の漏れの原因となるボイドやクラックの無い埋め込みが必要となる。30 μm の染料ドープフィルタで十分に励起光を除去するために、染料濃度は約 20 wt% となるよう調合した（前章の「励起光吸収フィルタの検討」の項を参照）。

・染料と樹脂の混合

染料は、黄色染料 Varifast Yellow 3150 (Orient Chemical Industries Co., Ltd.) を使用した。この染料は、「含金錯体及び造塩体技術を駆使したスピリットカラーであり、日光堅牢性が極めて高く、溶解性に優れ、昇華・ブリードが生じない」というものである[86]。Valifast Solubility (%) Chart[87]によると、アルコールや酢酸エチル、メチルエチルケトンなどの極性溶媒に対して 300 g/L 以上の極めて高い溶解性を持っている。また、高温に対しても安定で 200°C×1 分でも高い色堅牢度を示すとされている。

樹脂は、低粘度エポキシ樹脂「Z-1」透明型 (Nissin Resin Co., Ltd.) を使用した。主剤（粘度 1200 mPa·s @ 23°C）と硬化剤（粘度 400 mPa·s @ 23°C）を重量比 2:1 で混合することで架橋、硬化が始まるタイプの樹脂である。透明で自家蛍光の少ない材料として選定した。

・まず、容量 10 ml のバイアル瓶に Varifast Yellow 3150 の粉末 0.5 g を入れ、そこにシクロペンタノン (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) を 0.5 g 加え、よく攪拌し完全に溶解する。さらにエポキシ樹脂「Z-1」の主剤を 1 g 加え均一になるまで、攪拌する、最後に硬化剤を 0.5 g 加え攪拌して均一にする。直ちに硬化が始まるので、ここからの手順はすばやく行っていく。

・染料ドープ樹脂のライトパイプ内埋込み

調合した染料ドープ樹脂を直径 2 cm の小型シャーレに移し、その中にライトパイプアレイの銅板を、ホール側を上に向けて浸漬する。この状態で、真空デジケータ中に置いて、真空ポンプにより脱気する。デジケータの真空度が上がると染料ドープ樹脂は大量に発泡する。約 5 分間脱気状態を保持した後、大気圧に戻して消泡する。この脱気と大気圧へ戻す作業を 5 回繰り返す。

・余分な染料ドーブ樹脂の除去

シャーレから銅板を取り出すと、銅板が全体に染料ドーブ樹脂に覆われている。プラスチック製スパチュラのエッジを使って表面から余分な樹脂をそぎ落とす。さらに残った余分な樹脂はエタノールを染み込ませたキムワイブによってふき取ることで、ライトパイプ内の樹脂は保持した状態で、余分な樹脂を除去することができる。

・硬化

十分に硬化するために 100°C のホットプレート上で 5 分間保持する。このとき溶媒として使ったシクロペンタノンが急激に失われないよう、ライトパイプ開口側をカバーガラスにより覆った状態で硬化を行う。

埋め込み後の出来映えを示していく、なお、観察しているものは、ライトパイプピッチが 30 μm で、観察のための光が透過するようガラス基板上に作製したものである。

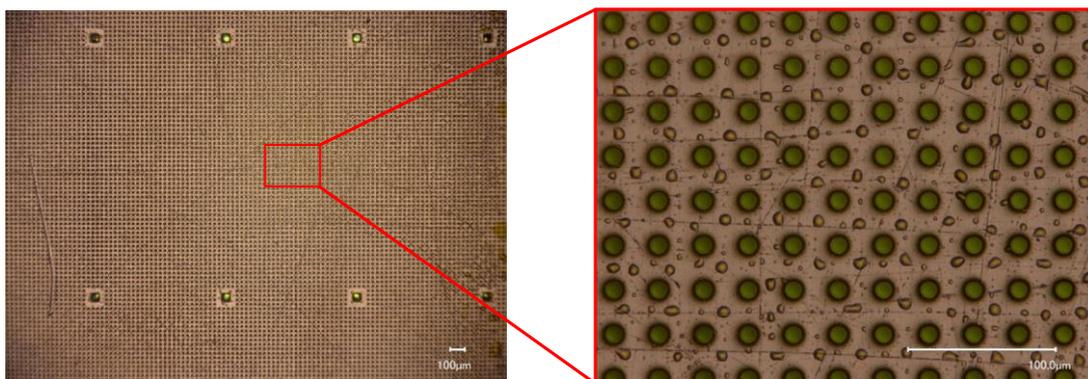


図 6-6 染料ドーブ吸収フィルタ埋め込み後のライトパイプアレイ
光学顕微鏡写真（裏面から白色 LED 照明、表面は通常の顕微鏡照明）

図 6-6 は、ライトパイプアレイ裏面から白色 LED 光を照射した状態で撮影した光学顕微鏡写真である。パイプ内が染料ドーブ樹脂で埋められていることが分かる。パイプ孔周辺に樹脂が残っているが、これは、硬化時に蓋をしたためシクロペンタノンと同時に気化した樹脂が再付着して硬化したものと考えられる。図 6-7 は、電子顕微鏡 (SEM) 写真である。少し窪んでいるが、均一に染料ドーブ樹脂が埋め込まれているのが分かる。クラックなどの異常は見られない。

図 6-8 は、サンプル裏面からの白色 LED 光照射のみで撮影した光学顕微鏡写真で、比較として、染料をドーブしないで樹脂のみを埋め込んだものを並べてい

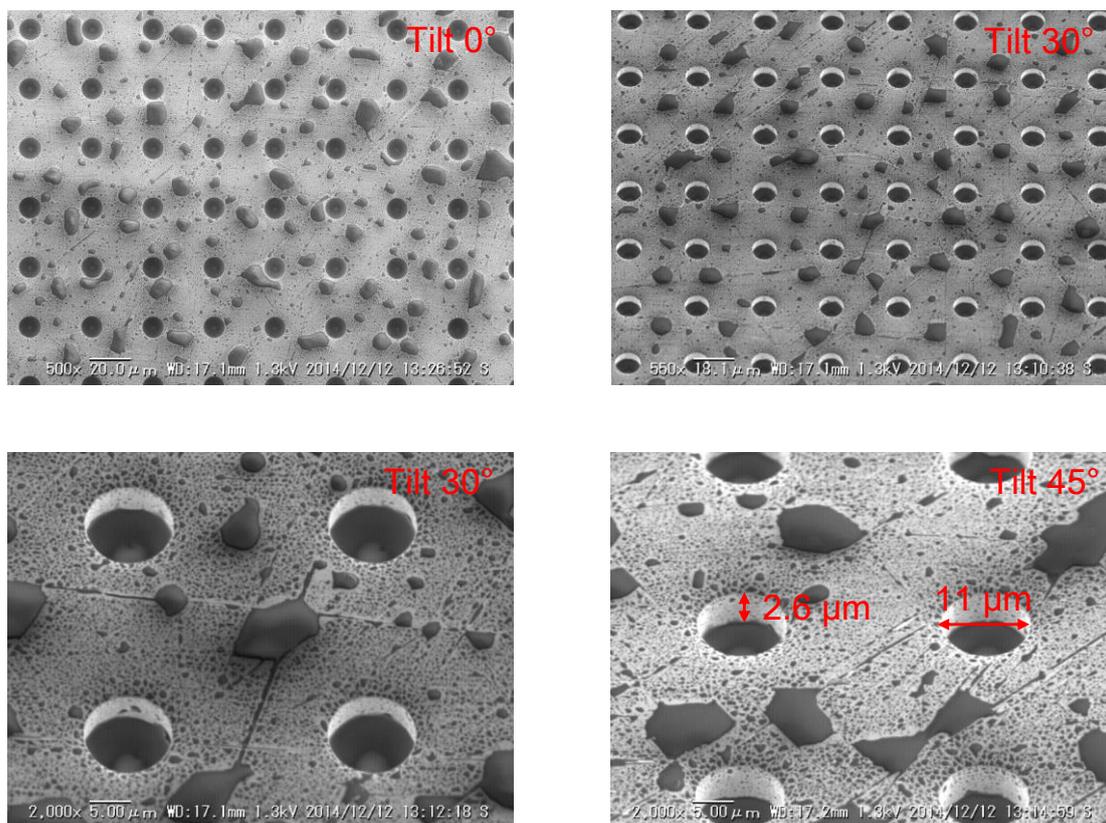


図 6-7 染料ドーブ吸収フィルタ埋め込み後のライトパイプアレイ SEM写真

る。染料ドーブしたものは黄色く光っている。埋め込み状態が不均一になった場合や、クラックが入った場合、輝きにムラが見られるが、このサンプルは、均一に光っている。

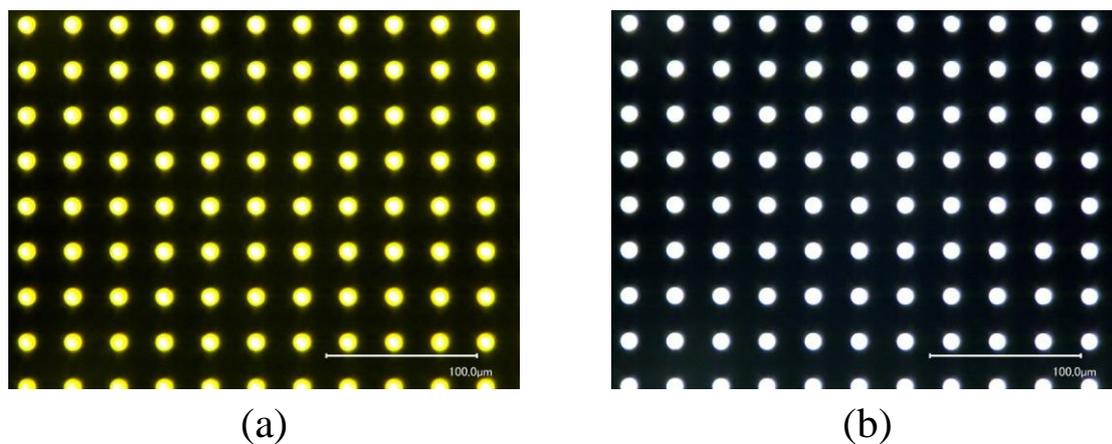


図 6-8 染料ドーブ吸収フィルタ埋め込み後のライトパイプアレイ
裏面白色LED照明のみで撮影(a)染料ドーブ、(b)比較用アンドーブ樹脂充填

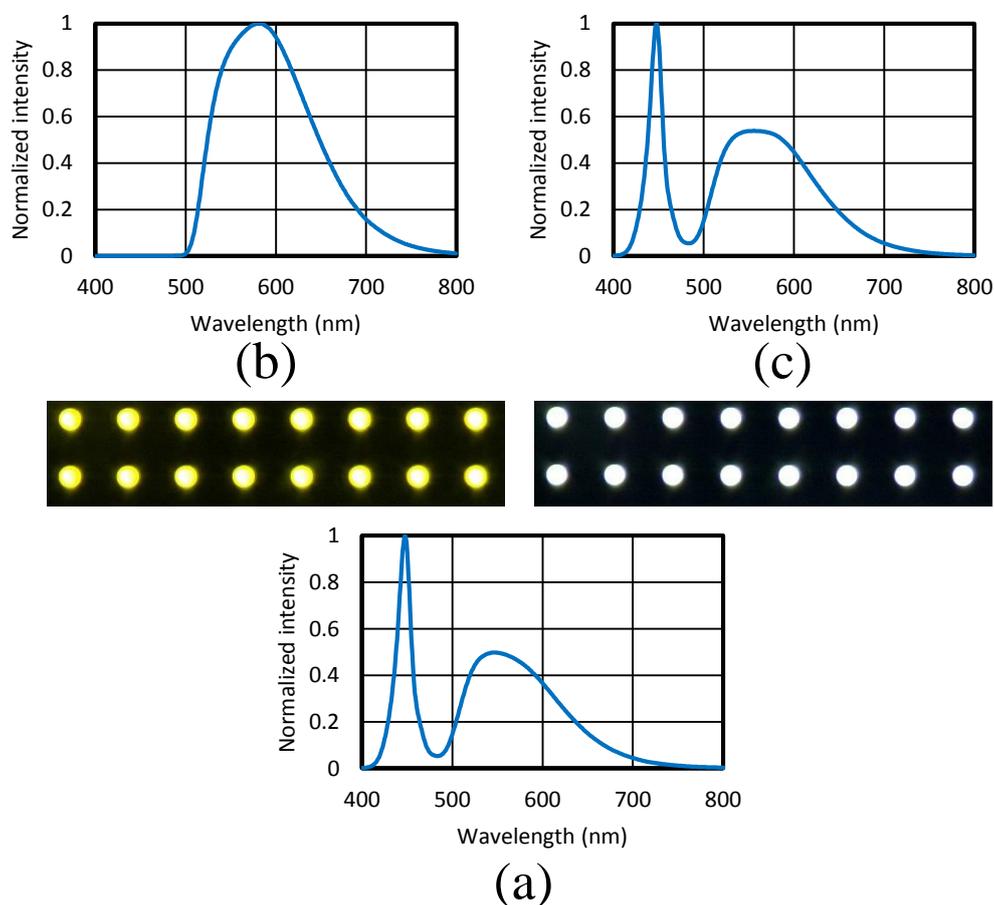


図 6-9 マイクロピラー吸収フィルタアレイ通過光スペクトル

(a)光源（白色 LED）スペクトル、(b)染料ドーピング樹脂フィルタ通過スペクトル
(c)アンドーピング樹脂フィルタ通過スペクトル

図 6-9 は、フィルタの透過光スペクトルを取得したもので、染料ドーピング樹脂を埋め込んだライトパイプアレイを通過した白色 LED 光は短波長成分が除去されている。一方、染料をドーピングしていない樹脂を埋め込んだものでは、ほぼ光源と同じスペクトルが観測された。このことは、ライトパイプに充填したマイクロピラー吸収フィルタによって、励起光の除去ができることを示している。

6.3.3 蛍光チャンバーアレイ

蛍光反応チャンバーアレイは Kim らによって発表されたデジタル ELISA 用反応チャンバーの作製方法と同様に作製することができる。Kim らは、親水性のガラス基板に図 6-10 に示すような撥水性の薄膜のスルーホール構造を作製している[6]。

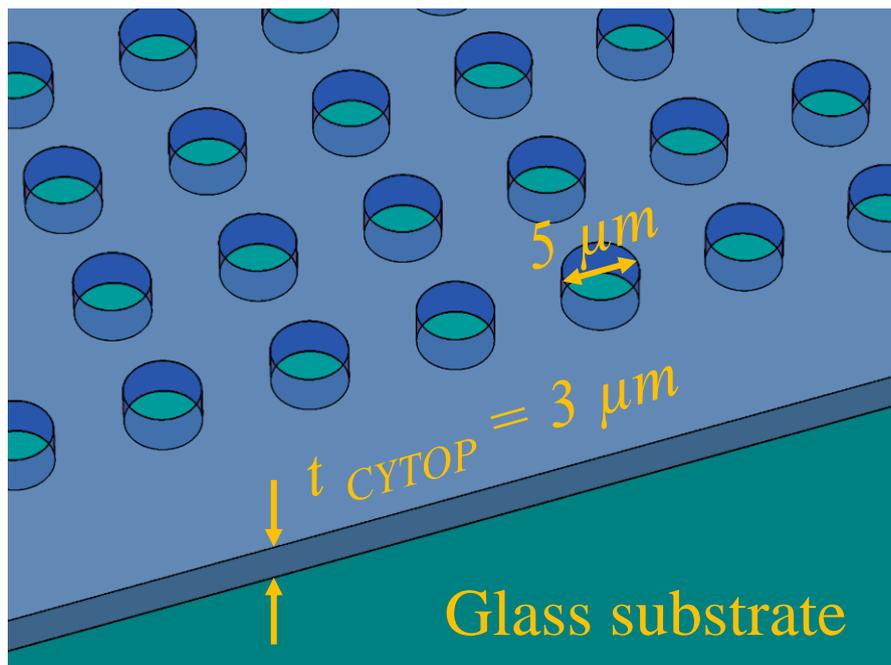


図 6-10 フェムトリッター蛍光反応チャンバーアレイの構造

まず、文献の作成方法を示す。

カバーガラス (Matsunami, Japan) 上に撥水性のアモルファスフッ素樹脂 (CYTOP809M, Asahi-glass, Japan) をスピンコートにより塗布する。塗布したカバーガラスをホットプレート上で 50℃、1 時間加熱し、さらに 1 時間かけて徐々に 180℃まで昇温し 1 時間保持することで良質の皮膜を得ることができる。CYTOP はこのプロセスを繰り返すことで厚膜化できるので、繰り返すことで厚さ 3 μm の CYTOP 薄膜を形成することができる。スルーホールの貫通は、高粘度のフォトレジスト (AZP4903, AZ Electronic Materials, Japan) を使用してフォトリソグラフィ技術によってパターンを形成し、このパターンをマスクとして O₂ プラズマを使ったリアクティブイオンエッチ (RIE-10NR, Samco, Japan) を行うことで実施する。RIE の後厚膜フォトレジストはアセトンによって除去する。

今回、基本的なフローは同じだが、別の作製方法も試みたので紹介する。CYTOP のような液体をはじきやすい材料では、フォトレジストもはじかれてスピンコートするのが困難である。そのため通常は、はじきにくい上記のような粘

度の高い厚膜塗布用のフォトレジストが使われることが多い[88]。厚膜フォトレジストは、微細加工には向いていないので、パターン形成が困難になる。そこで通常のフォトレジストを使って作製する方法を試みた。

CYTOP を酸素プラズマ処理することで、撥水性から親水性に変えることができる。こうすることによって薄膜用のフォトレジストの塗布が可能となる。但し、これでは、デジタル ELISA にも使えないので、撥水性の回復が必要である。今回、パターン形成後にベークすることで撥水性の回復が見られたので、デジタル ELISA 用に使用可能なパターンとすることができる (図 6-11)。

以下に、作製プロセスフローを示す。

Cytop 809M 1000 rpm スピンコート
 膜厚： 1.6 μm
 デスカム (Samco, FA-1) : O_2 , 10 W, 30 sec
 膜減り量： 約 0.05 μm , フォトレジストはじき防止
 レジスト塗布
 OAP 2000 rpm, 20 sec, 100°C×1 min
 OFPR-8600(33 cp) 3000 rpm ×20 sec×5 回
 (膜厚：1.9 μm)
 露光 コンタクトアライナー (Mikasa, MA-10, 8 sec)
 現像 NMD-3(2.38 %) , 65 sec, DIW リンス
 ポストベーク 90°C×5 min (アセトン除去を実施するため低温)
 アッシング Samco, FA-1: O_2 10 sccm, 100 W , 50 sec
 etch rate (Cytop: 2.25 $\mu\text{m}/\text{min}$, OFPR: 1.33 $\mu\text{m}/\text{min}$)
 OFPR 除去 アセトン×2 回→IPA→乾燥 (N_2 ガン)
 デスカム (Samco, FA-1) : O_2 , 10 W, 30 sec
 ポストベーク 180°C×30 min (撥水性回復のため)

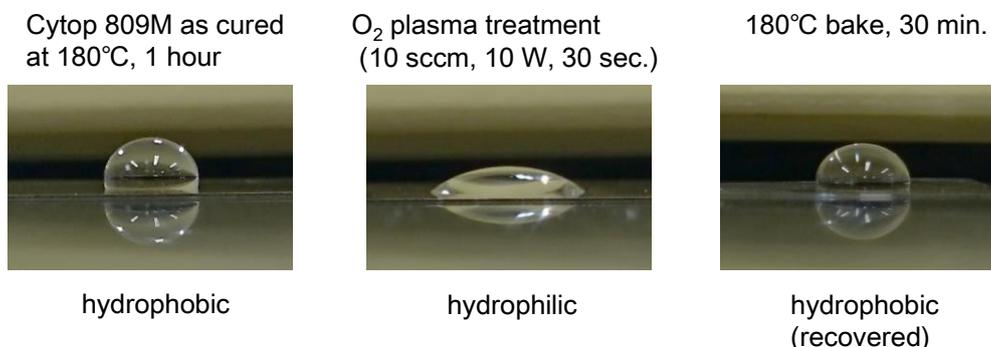


図 6-11 CYTOP 酸素プラズマ処理による親水化とベークによる回復

この方法で、作製した CYTOP のデジタル ELISA 用反応チャンバーアレイの光学顕微鏡写真を図 6-12 に示す。マスク設計寸法直径 $5\ \mu\text{m}$ の円形開口パターン ($15\ \mu\text{m}$ ピッチのアレイパターン) が、ほぼ設計値の大きさに仕上がっている。

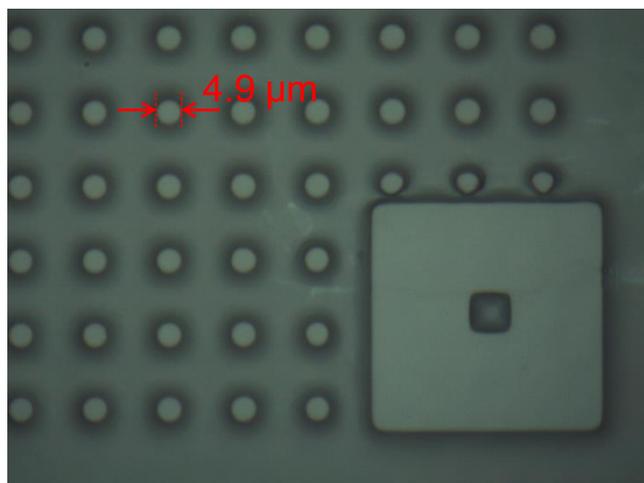


図 6-12 CYTOP パターン (蛍光反応チャンバーアレイ) 光学顕微鏡写真

低粘度フォトリソグリスを撥水性の基板に塗布する方法として、最近では、特殊な界面活性剤が使用する方法も開発されている[89]。この方法によると、撥水性回復のためのベーキング処理が不要になるため、さらに簡単なプロセスフローによる微細パターンの形成が可能になると考えられる。

6.4 アライメント機構

ライトパイプ (マイクロピラー吸収フィルタ) アレイと蛍光反応チャンバーアレイを形成した銅プレートを使って CMOS イメージセンサで蛍光検出を行うためには、ライトパイプアレイの開口部と CMOS イメージセンサの画素の位置を合わせて密着させる必要がある。そのためのアライメント機構の試作を行った。

図 6-13 に示した試作品について説明する。銅プレートは、CMOS イメージセンサのチップより少し大きければ十分なので、今回は、1 辺が 9 mm の正方形とした。また、厚さ 30 μm 程度と薄いため、変形しやすいので、3 方向を台座に固定した。固定した台座ごと、通常のデジタル ELISA のドロップアレイ作製工程ができるようになってきている。固定していない辺側から、CMOS イメージセンサチップを挿入して密着できるようにした。

CMOS イメージセンサは、フレキシブル基板先端に固定する形にして、アライメントの移動の際に銅プレートに強い衝撃を与えないようにしている。このフレキシブル基板は固定しておいて、反応チャンバーユニット側をマニュアルステージで可動としている。マニュアルステージは xyz の 3 方向移動およびツイストとチルトができるものを使用している。

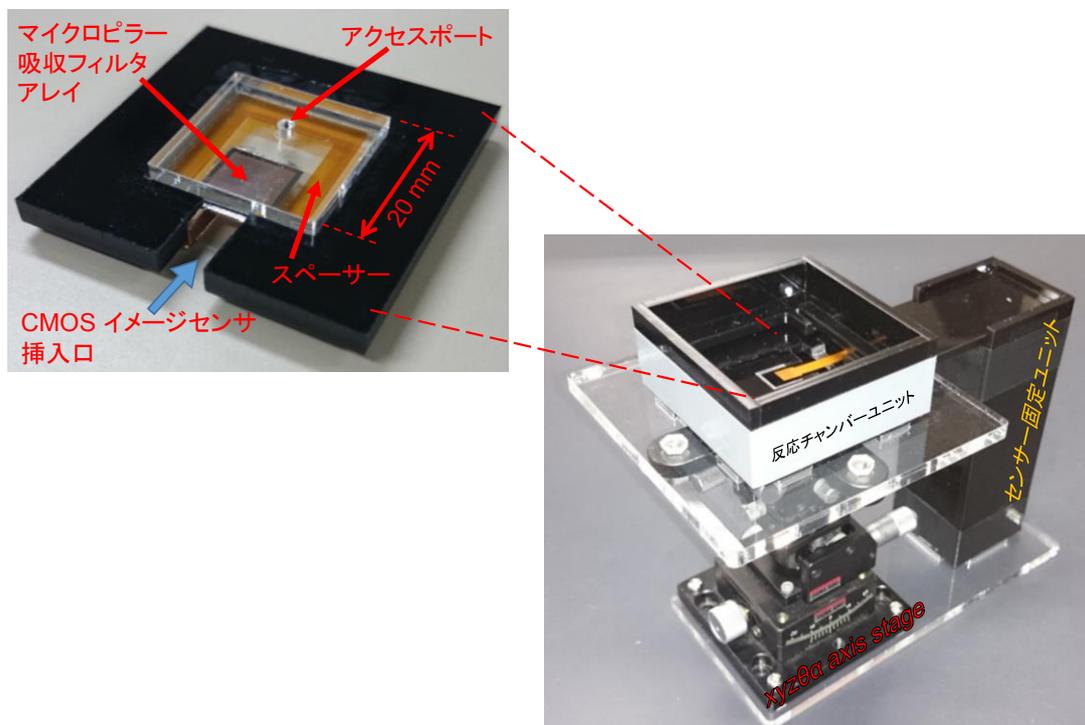


図 6-13 デジタル ELISA アライメントユニット試作品

6.5 考察とまとめ

前章で提案した新規レンズレス小型デジタル ELISA システムの作製プロセスについてシリコン基板を使った、両面加工プロセスを考案し、必要な要素工程について検討した。

ライトパイプアレイは、厚膜フォトレジストでパターンを形成し、そのパターン周辺に銅めっきを施すことで作製した。積層フォトダイオード CMOS イメージセンサの画素ピッチと同じ 15 μm ピッチで形成することに成功した。めっき後、厚膜フォトレジストを除去した状態の観察で、ライトパイプ内壁は、ほぼ垂直で滑らかな表面で仕上がっていることが確認できた。内壁での反射を使って蛍光を集光するものなので、滑らかな表面であることが重要である。

ライトパイプ内への励起光吸収フィルタの埋め込みに際しては、少量の溶媒を使用することで染料と樹脂をムラ無く混合することができ、また粘度もさげることができたので、均一に埋め込むことができた。埋め込み歩留まりを上げるためには、ライトパイプアレイを染料ドープ樹脂に浸し、減圧と常圧を繰り返すことが必要であった。

ライトパイプ内に充填形成されたマイクロピラー吸収フィルタアレイの白色 LED 光の透過スペクトル測定によって、作製したフィルタアレイが励起光を除去し、蛍光を透過するという基本機能を満たしていることが確認できた。

蛍光反応チャンバーアレイは、撥水性の薄膜としてアモルファスフッ素樹脂 CYTOP を使用し、フォトリソグラフィとドライエッチング技術を使って加工、形成することができた。

主な要素工程技術を確立することができたので、これらを組みあせることで、ライトパイプアレイおよびマイクロピラー吸収フィルタアレイを集積したデジタル ELISA 用、蛍光反応チャンバーアレイを作製することができる。

また、蛍光反応チャンバーおよびライトパイプアレイと CMOS イメージセンサの位置合わせを行う機構を検討し、試作した。

第 7 章 結論

7.1 本研究の成果

本研究では、CMOS イメージセンサを使用した高性能なレンズレス小型デジタル ELISA システムを構築するためのアーキテクチャの考案およびそれを構成する主要部品の機能、性能の向上を行った。

(1) CMOS イメージセンサの固定パターンノイズ (FPN) 低減

CMOS イメージセンサは画素毎、カラム毎にトランジスタ回路をもっており、それらの製造バラツキは、取得画像上では、固定化されたノイズとなる。定常状態を観察するデジタル ELISA の蛍光検出においては、時間変動ノイズは、積算により低減することが可能であるが FPN は低減できないので低 FPN 化が有効である。今回、使用するトランジスタのサイズおよびレイアウトを見直すことで、バラツキを低減することができた。画像上で縦スジとして現れるカラム FPN は従来のセンサに対して約 1/16 に、また画素 FPN は、約 1/5 に低減することができた。FPN を改善すると同時に感度のリニアリティも向上することができたので、広い光強度範囲における差分比較が正確に行えるようになった。この成果はデジタル ELISA への適用に留まらず、血流のコンタクトイメージング等、他の研究においても効果を発揮している。

(2) CMOS イメージセンサの高感度化

デジタル ELISA において検出時間を短縮するためには、極力、微弱な蛍光を検出する必要がある。本研究では、感度向上のために 4T-APS (4 トランジスタ・アクティブ・ピクセル・センサ) 構成を利用した。従来の 3T-APS センサの画素内にフォトキャリアをフォトダイオードより小さい容量に転送するためのトランジスタを 1 つ追加したもので、現在の市販されている CMOS イメージセンサで使用されている方式であるが、今回は、特に感度向上に重点を置いた設計を行った。4T-APS 採用以外の取り組みとして、同時に画素情報を出力に伝達するためのソースフォロワ回路にも改良を加えた。製造プロセスの特徴を活かし、MOS トランジスタのバックバイアス効果によるしきい値変動を抑えた構成とすることで、各段の伝達ゲインおよびそのリニアリティを向上させている。その結果、従来使用していた 3T-APS 構成の CMOS イメージセンサに対して感度を 5 倍以上向上することができた。

(3) 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサによる蛍光検出

イメージセンサを構成する画素内でフォトダイオード 2 個を深さ方向に積層（浅い側 PD1 と深い側 PD2）し、それぞれの出力画素値の比較することで、CMOS イメージセンサに励起光と蛍光を見分ける能力を付加することができた。デジタル ELISA における蛍光検出においては、励起光強度の揺らぎを蛍光であるとして誤検出する可能性があるが、この機能があることで改善が可能である。励起光中の微弱な蛍光を検出する能力については、LED 光源を使用した模擬実験で検証できた。

特に、4T-APS 構成の積層フォトダイオードは、高感度で低ノイズであった。この構成では、画素自体が光ショットノイズを平準化し低減する機能を備えたため、高光強度時でも微弱な変化量を見極めることができる。飽和画素値の 50% 光強度における微小変化量の検出能力は、従来使用していた 3T-APS 構成の CMOS イメージセンサに対して約 5 倍である。

(4) 新規小型デジタル ELISA システムの提案とシミュレーションによる検証

レンズレス小型デジタル ELISA システムとして、ライトガイドアレイ (LGA) やファイバーオプティクプレート (FOP) を使用したシステムが提案されているが、蛍光を受光部へ届ける効率（カップリング効率）が課題であった。蛍光カップリング効率を向上するために、励起光吸収フィルタを充填した金属製のライトパイプアレイ構造を考案し、その特性を単純化したモデルで、シミュレーションした。その結果、銅製の目標寸法ライトパイプにおいてカップリング効率は 2.9% 程度と算出された。これは、FOP 型のレンズレス小型デジタル ELISA システムに比べて約 180 倍の効率である。

(5) 新規構造デジタル ELISA システムの作製プロセス

提案したライトパイプ構造を実現するために、銅の電解めっき技術を使って作製するプロセスを検討し、積層フォトダイオード CMOS イメージセンサの画素ピッチと同じ 15 μm ピッチのライトパイプアレイの作製に成功した。また、ライトパイプ内への吸収フィルタ埋め込みプロセスも確立することができた。ここには、同じピッチで蛍光反応チャンバーアレイも形成される。

今回のシステムでは、CMOS イメージセンサは別ユニットとなるため蛍光検出時には、蛍光反応チャンバーアレイユニットとの位置合わせが必要となる。このための機構を考案し、試作した。

7.2 今後の展開と課題

本研究の成果を最大限に活かしてシステムを組んだ場合に予測される性能を従来の FOP 搭載システムと比較してみる。まず、ドロップレットから発生する蛍光のカップリング効率は 180 倍で、検出感度は、固定パターンノイズを改善した 3T-APS 構成の CMOS イメージセンサから 4T-APS 構成の積層フォトダイオード CMOS イメージセンサへの変更であり、5 倍向上している。すなわち、システムとしての感度は、約 900 倍の改善が見込める。FOP 搭載システムでは、CMOS イメージセンサの暗電流の影響を抑えるためにシステムを冷却しながら長時間露光を行った状態でフルオレセイン濃度 $10 \mu\text{M}$ (目標の 10 倍) まで検出が可能であった。従って、同様の条件で観測を行った場合、目標検出濃度に対して約 90 倍の余裕を持った性能が期待できる。露光時間を 1/10 にすれば冷却も不要となると考えられるが、この条件でも目標検出濃度を 9 倍のマージンをもって達成できると考えられる。

しかしながら、まだ改善すべき点は残っている。

(1) CMOS イメージセンサ

本研究において、4T-APS 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサはレンズレス小型デジタル ELISA システムでの蛍光検出器としては非常に良い特性が得られている。しかしながら、積層フォトダイオードを形成するために使用した不純物拡散層は改善の余地があると考えられる。特に表面側のフォトダイオードにおいて、テンポラリーノイズが大きい画素が散見される。これらの画素は、検出感度が落ちており誤検出に繋がるので、デジタル ELISA における検出対象から除外しないとイケない。既存の製造プロセスで拡散層 (マスク) を選んでレイアウトするので、選択自由度は低い、改善を試みる必要がある。

(2) システム作製プロセス

主要な工程については、作製方法を確立できたが、全体の組み合わせについては、検討が必要である。特に、製作途中で、 $30 \mu\text{m}$ 厚の銅プレートに対して低ダメージでハンドリングするための工夫が必要である。

蛍光反応チャンバーアレイユニットと CMOS イメージセンサの位置合わせについては、マニュアルステージによる試作を行ったが、小型のアクチュエータの導入により小型のユニット内に納めるような取り組みが必要である。

励起光源についても組み込み型のものを開発する必要がある。励起光除去のために吸収フィルタを使用しているため、励起光源波長幅が広いと漏れ量が増してしまうので出来るかぎり狭波長域の光源開発が必要である。光源について

は、光退色の影響を低減するため、観測時だけ光らせるのが望ましいので、**CMOS** イメージセンサと連動した制御系の開発が必要である。

現状、ドロップレット作製はマニュアル作業であるが、これの自動化も望まれる。さらに、蛍光反応以前に実施する必要がある一連の抗原-抗体反応についても小型化や一体化へ向けた検討が必要になると思われる。

本研究の成果が、非常に高感度で早期癌やその他の疾病の診断ができるデジタル **ELISA** を広く臨床現場、ひいては家庭内にまで普及するための一助となることを期待する。

参考文献

-
- [1] Sino Biological Inc., “ELISA encyclopedia.” [Online]. Available: <http://www.elisa-antibody.com/>.
- [2] Y. Rondelez, G. Tresset, K. V Tabata, H. Arata, H. Fujita, S. Takeuchi, and H. Noji, “Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, no. 3, pp. 361–5, Mar. 2005.
- [3] S. Sakakihara, S. Araki, R. Iino, and H. Noji, “A single-molecule enzymatic assay in a directly accessible femtoliter droplet array.,” *Lab Chip*, vol. 10, no. 24, pp. 3355–62, Dec. 2010.
- [4] D. M. Rissin and D. R. Walt, “Digital concentration readout of single enzyme molecules using femtoliter arrays and Poisson statistics.,” *Nano Lett.*, vol. 6, no. 3, pp. 520–3, Mar. 2006.
- [5] D. M. Rissin, C. W. Kan, T. G. Campbell, S. C. Howes, D. R. Fournier, L. Song, T. Piech, P. P. Patel, L. Chang, A. J. Rivnak, E. P. Ferrell, J. D. Randall, G. K. Provuncher, D. R. Walt, and D. C. Duffy, “Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, no. 6, pp. 595–9, Jun. 2010.
- [6] S. H. Kim, S. Iwai, S. Araki, S. Sakakihara, R. Iino, and H. Noji, “Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules.,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 23, pp. 4986–91, Dec. 2012.
- [7] K. Sasagawa, K. Ando, T. Kobayashi, T. Noda, T. Tokuda, S. H. Kim, R. Iino, H. Noji, and J. Ohta, “Complementary Metal–Oxide–Semiconductor Image Sensor with Microchamber Array for Fluorescent Bead Counting,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 51, no. 2, p. 02BL01, Feb. 2012.
- [8] K. Sasagawa, H. Takehara, K. Miyazawa, D. Okabayashi, T. Noda, T. Tokuda, S. H. Kim, R. Iino, H. Noji, and J. Ohta, “Lensless imaging device for digital counting of fluorescent micro-droplet chambers,” in *2013 Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim (CLEOPR)*, 2013, pp. 1–2.
-

-
- [9] K. Sasagawa, S. H. Kim, K. Miyazawa, H. Takehara, T. Noda, T. Tokuda, R. Iino, H. Noji, and J. Ohta, "Dual-mode lensless imaging device for digital enzyme linked immunosorbent assay," in *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE*, 2014, vol. 8933.
- [10] D. C. Ng, T. Tokuda, S. Shiosaka, Y. Tano, and J. Ohta, "Implantable Microimagers," *Sensors*, vol. 8, no. 5, pp. 3183–3204, May 2008.
- [11] D. C. Ng, H. Tamura, T. Mizuno, T. Tokuda, M. Nunoshita, Y. Ishikawa, S. Shiosaka, and J. Ohta, "An implantable and fully integrated complementary metal–oxide semiconductor device for in vivo neural imaging and electrical interfacing with the mouse hippocampus," *Sensors Actuators A Phys.*, vol. 145–146, pp. 176–186, Jul. 2008.
- [12] J. Ohta, T. Tokuda, K. Sasagawa, and T. Noda, "Implantable CMOS Biomedical Devices.," *Sensors (Basel)*, vol. 9, no. 11, pp. 9073–93, Jan. 2009.
- [13] K. Sasagawa, M. Mitani, T. Sugiyama, T. Noda, T. Tokuda, and J. Ohta, "Implantable Image Sensor with Light Guide Array Plate for Bioimaging," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 49, no. 4, p. 04DL03, Apr. 2010.
- [14] M. Haruta, C. Kitsumoto, Y. Sunaga, H. Takehara, T. Noda, K. Sasagawa, T. Tokuda, and J. Ohta, "An implantable CMOS device for blood-flow imaging during experiments on freely moving rats," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 53, no. 4S, p. 04EL05, Mar. 2014.
- [15] C. Richard, A. Renaudin, V. Aimez, and P. G. Charette, "An integrated hybrid interference and absorption filter for fluorescence detection in lab-on-a-chip devices.," *Lab Chip*, vol. 9, no. 10, pp. 1371–6, May 2009.
- [16] M. Dandin, P. Abshire, and E. Smela, "Optical filtering technologies for integrated fluorescence sensors.," *Lab Chip*, vol. 7, no. 8, pp. 955–977, 2007.
- [17] O. Hofmann, X. Wang, A. Cornwell, S. Beecher, A. Raja, D. D. C. Bradley, A. J. Demello, and J. C. Demello, "Monolithically integrated dye-doped PDMS long-pass filters for disposable on-chip fluorescence detection.," *Lab Chip*, vol. 6, no. 8, pp. 981–7, Aug. 2006.
-

-
- [18] Y. Sunaga, C. Kitsumoto, M. Motoyama, Y. Ohta, T. Noda, K. Sasagawa, Y. Ishikawa, T. Tokuda, S. Shiosaka, and J. Ohta, “Needle Type CMOS Imaging Device for Fluorescence Imaging of Deep Brain Activities with Low Invasiveness,” in *2013 Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim*, 2013, p. TuJ1_3.
- [19] 加藤真吾, 今井光信, “HIV 検査の新たな展開,” *日本エイズ学会誌*, vol. 13, no. 3, pp. 132–6, 2011.
- [20] J. M. Barletta, J. M. Barletta, D. C. Edelman, D. C. Edelman, N. T. Constantine, and N. T. Constantine, “Lowering the Detection Limits of HIV-1 Viral Load Using Real-Time Immuno-PCR for HIV-1 p24 Antigen,” *Am. J. Clin. Pathol.*, pp. 20–27, 2004.
- [21] E.-Y. Kim, J. Stanton, B. T. M. Korber, K. Krebs, D. Bogdan, K. Kunstman, S. Wu, J. P. Phair, C. A. Mirkin, and S. M. Wolinsky, “Detection of HIV-1 p24 Gag in plasma by a nanoparticle-based bio-barcode-amplification method.,” *Nanomedicine (Lond)*, vol. 3, pp. 293–303, 2008.
- [22] UNITAID, “HIV/AIDS DIAGNOSTICS TECHNOLOGY LANDSCAP 4th EDITION,” 2014. [Online]. Available: http://www.unitaid.eu/images/marketdynamics/publications/UNITAID-HIV_Diagnostic_Landscape-4th_edition.pdf.
- [23] UNITAID, “HIV/AIDS DIAGNOSTICS TECHNOLOGY LANDSCAP SEMI-ANNUAL UPDATE January 2015,” 2015. [Online]. Available: http://www.unitaid.eu/images/marketdynamics/publications/UNITAID_2015_Semi-annual_Update_HIV_Diagnostics_Technology_Landscape.pdf.
- [24] A. Ozcan and U. Demirci, “Ultra wide-field lens-free monitoring of cells on-chip.,” *Lab Chip*, vol. 8, pp. 98–106, 2008.
- [25] S. Moon, H. O. Keles, A. Ozcan, A. Khademhosseini, E. Haeggstrom, D. Kuritzkes, and U. Demirci, “Integrating microfluidics and lensless imaging for point-of-care testing.,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 11, pp. 3208–14, Jul. 2009.
- [26] D. H. Wilson, D. W. Hanlon, G. K. Provuncher, L. Chang, L. Song, P. P. Patel, E. P. Ferrell, H. Lepor, A. W. Partin, D. W. Chan, L. J. Sokoll, C. D. Cheli, R. P. Thiel, D. R. Fournier, and D. C. Duffy, “Fifth-generation digital immunoassay for
-

-
- prostate-specific antigen by single molecule array technology,” *Clin. Chem.*, vol. 57, pp. 1712–1721, 2011.
- [27] Z. Ye, M. Tan, G. Wang, and J. Yuan, “Preparation, characterization and application of fluorescent terbium complex-doped zirconia nanoparticles,” *J. Fluoresc.*, vol. 15, pp. 499–505, 2005.
- [28] P. Huhtinen, T. Soukka, T. Lövgren, and H. Härmä, “Immunoassay of total prostate-specific antigen using europium(III) nanoparticle labels and streptavidin-biotin technology,” *J. Immunol. Methods*, vol. 294, pp. 111–122, 2004.
- [29] D. S. Grubisha, R. J. Lipert, H.-Y. Park, J. Driskell, and M. D. Porter, “Femtomolar Detection of Prostate-Specific Antigen: An Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Scattering and Immunogold Labels,” *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 21, pp. 5936–5943, Sep. 2003.
- [30] K. Lind and M. Kubista, “Development and evaluation of three real-time immuno-PCR assemblages for quantification of PSA,” *J. Immunol. Methods*, vol. 304, pp. 107–116, 2005.
- [31] Y. P. Bao, T.-F. Wei, P. A. Lefebvre, H. An, L. He, G. T. Kunkel, and U. R. Müller, “Detection of Protein Analytes via Nanoparticle-Based Bio Bar Code Technology,” *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 6, pp. 2055–2059, Feb. 2006.
- [32] D. A. Healy, C. J. Hayes, P. Leonard, L. McKenna, and R. O’Kennedy, “Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection,” *Trends in Biotechnology*, vol. 25, pp. 125–131, 2007.
- [33] H. Kettler, K. White, and S. Hawks, *Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections*. 2004.
- [34] D. Mabey, R. W. Peeling, A. Ustianowski, and M. D. Perkins, “Diagnostics for the developing world,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, pp. 231–240, 2004.
- [35] D. A. McPartlin and R. J. O’Kennedy, “Point-of-care diagnostics, a major opportunity for change in traditional diagnostic approaches: potential and limitations,” *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 14, pp. 979–998, 2014.
-

-
- [36] 幸山裕亮, 山下浩史, “高 SN の CMOS イメージセンサを実現する画素技術,” 東芝レビュー, vol. 67, no. 10, pp. 6–9, 2012.
- [37] L. Chang, D. M. Rissin, D. R. Fournier, T. Piech, P. P. Patel, D. H. Wilson, and D. C. Duffy, “Single molecule enzyme-linked immunosorbent assays: theoretical considerations,” *J. Immunol. Methods*, vol. 378, no. 1–2, pp. 102–15, Apr. 2012.
- [38] L. Cai, N. Friedman, and X. S. Xie, “Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level,” *Nature*, vol. 440, no. 7082, pp. 358–62, Mar. 2006.
- [39] A. Mata, A. J. Fleischman, and S. Roy, “Characterization of polydimethylsiloxane (PDMS) properties for biomedical micro/nanosystems,” *Biomed. Microdevices*, vol. 7, no. 4, pp. 281–93, Dec. 2005.
- [40] T. Wang, M. Zhang, D. D. Dreher, and Y. Zeng, “Ultrasensitive microfluidic solid-phase ELISA using an actuatable microwell-patterned PDMS chip,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 21, pp. 4190–7, Aug. 2013.
- [41] D. M. Rissin, D. R. Fournier, T. Piech, C. W. Kan, T. G. Campbell, L. Song, L. Chang, A. J. Rivnak, P. P. Patel, G. K. Provuncher, E. P. Ferrell, S. C. Howes, B. A. Pink, K. A. Minnehan, D. H. Wilson, and D. C. Duffy, “Simultaneous detection of single molecules and singulated ensembles of molecules enables immunoassays with broad dynamic range,” *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 6, pp. 2279–85, Mar. 2011.
- [42] R. Iino, S. Araki, S. H. Kim, S. Sakakihara, and H. Noji, “FEMTOLITER MICRODROPLET ARRAY DEVICE FOR SINGLE-MOLECULE DIGITALE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY,” in *Proceedings of 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 2011, pp. 24–26.
- [43] C. W. Kan, A. J. Rivnak, T. G. Campbell, T. Piech, D. M. Rissin, M. Mösl, A. Peterça, H.-P. Niederberger, K. a Minnehan, P. P. Patel, E. P. Ferrell, R. E. Meyer, L. Chang, D. H. Wilson, D. R. Fournier, and D. C. Duffy, “Isolation and detection of single molecules on paramagnetic beads using sequential fluid flows in microfabricated polymer array assemblies,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 5, pp. 977–85, Mar. 2012.
-

-
- [44] F. Mugele and J.-C. Baret, “Electrowetting: from basics to applications,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 17, no. 28, pp. R705–R774, Jul. 2005.
- [45] S. K. Cho, H. Moon, and Chang-Jin Kim, “Creating, transporting, cutting, and merging liquid droplets by electrowetting-based actuation for digital microfluidic circuits,” *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 12, no. 1, pp. 70–80, Feb. 2003.
- [46] W. C. Nelson and C.-J. “CJ” Kim, “Droplet Actuation by Electrowetting-on-Dielectric (EWOD): A Review,” *J. Adhes. Sci. Technol.*, vol. ahead-of-p, no. ahead-of-print, pp. 1–25, Jan. 2012.
- [47] K. Choi, A. H. C. Ng, R. Fobel, and A. R. Wheeler, “Digital microfluidics,” *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto, Calif.)*, vol. 5, pp. 413–40, Jan. 2012.
- [48] D. Witters, K. Knez, F. Ceysens, R. Puers, and J. Lammertyn, “Digital microfluidics-enabled single-molecule detection by printing and sealing single magnetic beads in femtoliter droplets,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 11, pp. 2047–54, Jun. 2013.
- [49] 中野武雄, 前田真, 馬場茂, “任意の屈折率を持つ層からなる光学多層膜フィルタの最適設計,” 成蹊大学工学研究報告, pp. 43–49, 2002.
- [50] 小田有城, “CMOS イメージセンサによるオンチップ蛍光計測の画質向上に関する研究(修士論文),” 奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科, 2012.
- [51] 岡林大恭, “デジタル ELISA に向けたレンズレスオンチップイメージングデバイスに関する研究(修士論文),” 奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科, 2013.
- [52] 宮澤和也, “デジタル ELISA に向けた CMOS イメージングデバイスの高感度化に関する研究(修士論文),” 2014.
- [53] A. El Gamal, B. a. Fowler, H. Min, and X. Liu, “Modeling and Estimation of FPN Components in CMOS Image Sensors,” in *PROCEEDINGS OF THE SOCIETY OF PHOTO-OPTICAL INSTRUMENTATION ENGINEERS (SPIE)*, 1998, pp. 168–177.
-

-
- [54] S.-W. Han and E. Yoon, "Area-efficient correlated double sampling scheme with single sampling capacitor for CMOS image sensors," *Electron. Lett.*, vol. 42, no. 6, pp. 335–7, Mar. 2006.
- [55] M. H. White, D. R. Lampe, F. C. Blaha, and I. A. Mack, "Characterization of surface channel CCD image arrays at low light levels," *IEEE J. Solid-State Circuits*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, Feb. 1974.
- [56] M. J. M. Pelgrom, A. C. J. Duinmaijer, and A. P. G. Welbers, "Matching properties of MOS transistors," *IEEE J. Solid-State Circuits*, vol. 24, no. 5, pp. 1433–1439, Oct. 1989.
- [57] M. J. M. Pelgrom, "Matching properties of MOS transistors," *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.*, vol. 305, no. 3, pp. 624–626, 1991.
- [58] M. J. M. Pelgrom, H. P. Tuinhout, and M. Vertregt, "Transistor matching in analog CMOS applications," in *International Electron Devices Meeting 1998. Technical Digest (Cat. No.98CH36217)*, 1998, pp. 915–918.
- [59] P. G. Drennan, M. Kniffin, and D. Locascio, "Implications of Proximity Effects for Analog Design," in *IEEE Custom Integrated Circuits Conference 2006*, 2006, pp. 169–176.
- [60] B. Bayer, "Color imaging array," *US Pat. 3,971,065*, 1976.
- [61] R. Lukac and K. N. Plataniotis, "Color filter arrays: design and performance analysis," *IEEE Trans. Consum. Electron.*, vol. 51, no. 4, pp. 1260–1267, Nov. 2005.
- [62] M. A. Green, "Self-consistent optical parameters of intrinsic silicon at 300K including temperature coefficients," *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, vol. 92, no. 11, pp. 1305–1310, Nov. 2008.
- [63] Y. Maruyama, K. Sawada, H. Takao, and M. Ishida, "The fabrication of filter-less fluorescence detection sensor array using CMOS image sensor technique," *Sensors Actuators A Phys.*, vol. 128, no. 1, pp. 66–70, Mar. 2006.
-

- [64] Y. Maruyama, K. Sawada, H. Takao, and M. Ishida, “A Wide Dynamic Range Photogate-Type Active Pixel Sensor Using a Self-Regulation Principle,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 47, no. 1, pp. 173–178, Jan. 2008.
- [65] Y. Maruyama, M. Ishida, and K. Sawada, “Multiwavelength Photosensor for On-Chip Real-Time Monitoring of Fluorescence and Turbidity,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 48, no. 6, p. 067003, Jun. 2009.
- [66] 澤田和明, “フィルタレス蛍光バイオイメージセンサ-CMOS イメージセンサ技術とバイオ科学の融合に向けて,” *光アライアンス*, vol. 19, no. 2, pp. 21–25, 2008.
- [67] R. Merrill, “Color separation in an active pixel cell imaging array using a triple-well structure,” *US Pat. 5,965,875*, 1999.
- [68] P. M. Hubel, J. Liu, and R. J. Guttosch, “Spatial frequency response of color image sensors: Bayer color filters and Foveon X3,” in *Proc. SPIE 5301, Sensors and Camera Systems for Scientific, Industrial, and Digital Photography Applications V*, 2004, pp. 402–407.
- [69] D. L. Gilblom, S. K. Yoo, and P. Ventura, “Real-time color imaging with a CMOS sensor having stacked photodiodes,” 2004, vol. 5210, pp. 105–115.
- [70] P. M. Hubel and M. Bautsch, “Resolution for color photography,” in *Proc. SPIE 6069, Digital Photography II*, 2006, p. 60690M–60690M–7.
- [71] R. Merrill, “Pinned photodiode CMOS pixel sensor,” *US Pat. 8,115,242 B2*, 2012.
- [72] Life technologies, “Fluorescence SpectraViewer.” [Online]. Available: <http://www.lifetechnologies.com/jp/ja/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>.
- [73] 井上郁子, 山口徹也, 野崎秀俊, 宮川良平, 真鍋宗平, “CMOS イメージセンサにおける低電圧駆動埋込み PD の解析 (埋込み PD 構造による低リーク電流の検討),” vol. 55, no. 2, pp. 257–263, 2001.
- [74] Z. Liu, T. Gurlo, and H. von Grafenstein, “Cell-ELISA using β -galactosidase conjugated antibodies,” *J. Immunol. Methods*, vol. 234, no. 1–2, pp. P153–P167, Feb. 2000.

-
- [75] V. Zanker and W. Peter, "Die prototropen Formen des Fluoresceins," *Chem. Ber.*, vol. 91, no. 3, pp. 572–580, Mar. 1958.
- [76] S. A. Smith and W. Pretorius, "Spectrophotometric determination of pKa values for fluorescein using activity coefficient corrections," *Water SA*, vol. 28, no. 4, pp. 395–402, Apr. 2002.
- [77] N. Klonis and W. Sawyer, "Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution," *J. Fluoresc.*, vol. 6, no. 3, pp. 147–57, Sep. 1996.
- [78] D. M. Rissin, H. H. Gorris, and D. R. Walt, "Distinct and long-lived activity states of single enzyme molecules.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 15, pp. 5349–53, Apr. 2008.
- [79] B. P. English, W. Min, A. M. van Oijen, K. T. Lee, G. Luo, H. Sun, B. J. Cherayil, S. C. Kou, and X. S. Xie, "Ever-fluctuating single enzyme molecules: Michaelis-Menten equation revisited.," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 87–94, Feb. 2006.
- [80] M. N. Polyanskiy, "RefractiveIndex.INFO - Refractive index database." [Online]. Available: <http://refractiveindex.info/>. [Accessed: 09-Apr-2014].
- [81] L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young, and H. J. Tanke, "Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy.," *Biophys. J.*, vol. 68, no. 6, pp. 2588–600, Jun. 1995.
- [82] M. Beutler, I. M. Heisterkamp, B. Piltz, P. Stief, and D. De Beer, "Microscopic oxygen imaging based on fluorescein bleaching efficiency measurements.," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 77, no. 5, pp. 341–7, May 2014.
- [83] R. Y. Tsien, L. Ernst, and A. Waggoner, "Fluorophores for Confocal Microscopy: Photophysics and Photochemistry," in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Third Edit., J. B. Pawley, Ed. 2006, pp. 338–352.
- [84] "AGC 旭硝子 Cytop ホームページ." [Online]. Available: <http://www.agc.com/kagaku/shinsei/cytop/index.html>.
- [85] 日本化薬, "KMPR 1000 日本語カタログ," 2013. [Online]. Available: http://nkc-mems.com/info2013/Resist/KMPR-1000_TDS_Japanese_Ver5.pdf.
-

- [86] オリエント化学工業株式会社, “製品リスト.” [Online]. Available: <http://www.orientchemical.com/product04/>.
- [87] オリエント工業株式会社, “Valifast Solubility (%) Chart,” 2011. [Online]. Available: <http://www.orient-usa.com/userfiles/file/20110718080036.pdf>.
- [88] T. Yasuda, K. Suzuki, and I. Shimoyama, “Automatic Transportation of a Droplet on a Wettability Gradient Surface,” in *The 7th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems*, 2003, pp. 1129–1132.
- [89] T. Sakanoue, M. Mizukami, S. Oku, Y. Yoshimura, M. Abiko, and S. Tokito, “Fluorosurfactant-assisted photolithography for patterning of perfluoropolymers and solution-processed organic semiconductors for printed displays,” *Appl. Phys. Express*, vol. 7, no. 10, p. 101602, Oct. 2014.
- [90] R. Sjöback, J. Nygren, and M. Kubista, “Absorption and fluorescence properties of fluorescein,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 51, no. 6, pp. L7–L21, Jun. 1995.
- [91] M. B. Gholivand, J. B. Ghasemi, S. Saaidpour, and A. Mohajeri, “Spectrophotometric study of the effects of surfactants and ethanol on the acidity constants of fluorescein,” *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 71, no. 3, pp. 1158–65, Dec. 2008.
- [92] V. R. Batistela, J. da Costa Cedran, H. P. Moisés de Oliveira, I. S. Scarminio, L. T. Ueno, A. Eduardo da Hora Machado, and N. Hioka, “Protolytic fluorescein species evaluated using chemometry and DFT studies,” *Dye. Pigment.*, vol. 86, no. 1, pp. 15–24, Jun. 2010.

研究発表目録

発表論文

1. Hironari Takehara, Kazuya Miyazawa, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, and Jun Ohta, “A CMOS image sensor with stacked photodiodes for lensless observation system of digital enzyme-linked immunosorbent assay,” *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 53, no. 4S, pp. 04EL02–1–5, Feb. 2014.

参考論文

1. Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, Yoshinori Sunaga, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, “An implantable CMOS device for blood-flow imaging under freely moving experiments of rats,” *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 53, no. 4S, pp. 04EL05-1-6, Mar. 2014.
2. Makito Haruta, Yoshinori Sunaga, Takahiro Yamaguchi, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, and Jun Ohta, “Intrinsic signal imaging of brain function using a small implantable CMOS imaging device,” *Japanese Journal of Applied Physics*, Jan. 2015, accepted.

国際会議における発表

1. Hironari Takehara, Daisuke Okabayashi, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, “Lensless digital fluorescent detector using CMOS image sensor,” *International Conference on BioElectronics, BioSensors, Biomedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications 2012 (Bio4Apps 2012)*, National University of Singapore, Nov. 20, 2012.
2. Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, Yoshinori Sunaga, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, “Intrinsic Optical Signal Imaging Based on Blood Flow with a Biomedical Photonic LSI,” *Seventh International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE7)*, Fukuoka International Congress Center, Mar. 19, 2013

3. Hironari Takehara, Kiyotaka Sasagawa, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Kazuya Miyazawa, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, "A CMOS Image Sensor with Low Fixed Pattern Noise Suitable for Lensless Observation System of Digital Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)," *International Meeting for Future of Electron Devices, Kansai (IMFEDK 2013)*, A-5, Kansai University, Japan, Jun. 5, 2013.
4. Kiyotaka Sasagawa, H. Takehara, Kazuya Miyazawa, Daisuke Okabayashi, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, "Lensless Imaging Device for Digital Counting of Fluorescent Micro-droplet Chambers," *The 10th Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim (CLEO-PR 2013)*, Kyoto International Conference Center, Kyoto, JAPAN, Jul. 2, 2013.
5. Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, Yoshinori Sunaga, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "An implantable CMOS device for functional brain imaging under freely moving experiments of rat," *2013 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM)*, Hilton Fukuoka Sea Hawk, JAPAN, Sep. 25, 2013.
6. Hironari Takehara, Kiyotaka Sasagawa, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Kazuya Miyazawa, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, "A CMOS Image Sensor with Low Fixed Pattern Noise Suitable for Lensless Observation System of Digital Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)," *2013 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM)*, Hilton Fukuoka Sea Hawk, JAPAN, Sep. 26, 2013.
7. Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, Yoshinori Sunaga, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, "Functional brain imaging under freely moving experiments by an implantable CMOS imaging device," *Asian Symposium on Advanced Image Sensors and Imaging Systems*, Shizuoka University, JAPAN, Oct. 8, 2013.
8. Hironari Takehara, Kazuya Miyazawa, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, "A CMOS Image Sensor Having Stacked Photodiodes for Fluorescence Observation of Digital Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)," *Bio4apps 2013*, PNM-4, Tokyo Medical and Dental University, Japan, Oct. 30, 2013.

9. Makito Haruta, Yoshinori Sunaga, Takahiro Yamaguchi, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, “Development of an Implantable Imaging Device for Observation of Intrinsic Signals in the Brain,” *Bio4apps 2013*, PNM-4, Tokyo Medical and Dental University, Japan, Oct. 30, 2013.
10. Kiyotaka Sasagawa, Soo Hyeon Kim, Kazuya Miyazawa, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, “Lensless CMOS-based imaging device for fluorescent femtoliter droplet array counting,” *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013)*, Messe Freiburg, GERMANY, Oct. 30, 2013.
11. Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, Yoshinori Sunaga, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, “Implantable device for intrinsic signals imaging in cortices of freely moving rats,” *Neuroscience2013*, San Diego Convention Center, USA, Nov. 13, 2013.
12. Makito Haruta, Chikara Kitsumoto, Yoshinori Sunaga, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, “Implantable CMOS imaging device with absorption filters for green fluorescence imaging,” *Photonics West*, , The Moscone Center San Francisco, California, United States Feb. 2, 2014.
13. Kiyotaka Sasagawa, Hironari Takehara, Kazuya Miyazawa, Soc Heyen Kim, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, “Dual-mode lensless imaging device for digital enzyme linked immunosorbent assay,” *Photonics West*, , The Moscone Center San Francisco, California, United States Feb. 2, 2014.
14. Makito Haruta, Yoshinori Sunaga, Takahiro Yamaguchi, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Jun Ohta, “A multi-modal implantable CMOS imaging device with two-color light source for intrinsic signal detection in a brain,” *International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM)*, Tsukuba International Congress Center, Sep. 11, 2014.
15. Kiyotaka Sasagawa, Soo Hyeon Kim, Lisa Yamauchi, Kazuki Kitaguchi, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Ryota Iino, Hitoyuki Noji, Jun Ohta, “Single-molecule enzyme assay with a lensless fluorescent image device,” *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014)*, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, TX, USA, Oct. 29, 2014.

国内学会、研究会

1. 岡林 大恭, 竹原 浩成, 宮澤 和也, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “デジタル ELISA に向けたレンズレスオンチップイメージングシステム”, 関西学生研究論文講演会, 和歌山大学, 2013 年 3 月
2. 竹原 浩成, 宮澤 和也, 岡林 大恭, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, 太田 淳, “デジタル酵素結合免疫吸着法に向けた高感度蛍光検出用 CMOS イメージセンサの開発,” バイオ・マイクロシステム研究会, 東京大学 本郷キャンパス, 2013 年 3 月
3. 宮澤 和也, 岡林 大恭, 竹原 浩成, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “デジタル ELISA 法に向けた Fiber Optic Plate と画像処理によるオンチップ蛍光計測デバイスの開発,” 応用物理学会春季講演会, 神奈川工科大学, 2013 年 3 月
4. 春田 牧人, 橋本 力, 竹原 浩成, 須永 圭紀, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “脳内内因性光シグナル計測用埋植型 CMOS イメージングデバイス,” 情報センシング研究会, 埼玉大学東京ステーションカレッジ, 2013 年 5 月
5. 宮澤 和也, 竹原 浩成, 岡林 大恭, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “デジタル ELISA 法に向けた画像処理によるレンズレスオンチップ蛍光検出デバイスの開発,” 情報センシング研究会, 埼玉大学東京ステーションカレッジ, 2013 年 5 月
6. 竹原 浩成, “標準プロセスを用いた低固定パターンノイズ CMOS イメージセンサ,” VDEC デザイナーズフォーラム 2013, 東京大学武田先端知ビル, 2013 年 8 月
7. 竹原 浩成, 宮澤 和也, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “レンズレスデジタル ELISA システム向け積層フォトダイオード CMOS イメージセンサの開発,” 映像情報メディア学会年次大会, 工学院大学 新宿キャンパス, 2013 年 8 月
8. 宮澤 和也, 竹原 浩成, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Kim Soo Hyeon, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “Digital ELISA に向けた高感度 CMOS イメージセンサと画像処理によるレンズレスオンチップ蛍光計測デバイスの

- 開発,” 応用物理学会秋季学術講演会, 同志社大学 京田辺キャンパス, 2013年9月
9. 須永 圭紀, 春田 牧人, 竹原 浩成, 元山 真由美, 太田 安美, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “GFP 計測用埋植型 CMOS イメージングデバイスの開発,” 情報フォトニクス研究会秋合宿, 研修保養施設倶楽部錦溪, 札幌, 2013年9月
10. 笹川 清隆, 竹原 浩成, 宮澤 和也, 野田 俊彦, 徳田 崇, 金 秀炫, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “レンズレスイメージングデバイスによるマイクロドロップレットアレイ蛍光観察,” バイオ・マイクロシステム研究会, 東京大学生産技術研究所, 2013年10月
11. 竹原 浩成, 宮澤 和也, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “デジタル ELISA 蛍光観察向け積層フォトダイオード CMOS イメージセンサ,” 応用物理学会関西支部平成 25 年度第 2 回講演会, 奈良先端科学技術大学院大学, 2013年10月
12. 春田 牧人, 須永 圭紀, 竹原 浩成, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳 “埋植型 CMOS イメージングデバイスによる脳表の血流計測,” 応用物理学会関西支部平成 25 年度第 2 回講演会, 奈良先端科学技術大学院大学, 2013年10月
13. 宮澤 和也, 竹原 浩成, 北口 一樹, 神山 直也, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, 山内 理沙, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳 “デジタル ELISA に向けた レンズレス CMOS イメージングデバイスの高感度化,” 関西学生研究論文講演会, 神戸大学, 2014年3月
14. 須永 圭紀, 春田 牧人, 竹原 浩成, 山口 貴大, 元山 真由美, 太田 安美, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳 “生体埋植型 CMOS イメージングデバイスの緑色蛍光検出感度改善,” バイオ・マイクロシステム研究会, 東京大学 本郷キャンパス, 2014年3月
15. 竹原 浩成, 宮澤 和也, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “デジタル酵素結合免疫吸着法に向けた積層フォトダイオード CMOS イメージセンサの開発,” 応用物理学会春季学術講演会, 青山学院大学相模原キャンパス, 2014年3月
16. 北口 一樹, 宮澤 和也, 山内 里紗, 竹原 浩成, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田
-

- 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “レンズレス CMOS 蛍光計測デバイスによる酵素アッセイ,” 電気学会全国大会, 愛媛大学 城北キャンパス, 2014 年 3 月
17. 竹原 浩成, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳 “デジタル ELISA 向けレンズレス蛍光観察システムの設計,” 情報センシング研究会, 東京理科大学 森戸記念会館, 2014 年 6 月
18. 北口 一樹, 竹原 浩成, 笹川 清隆, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “レンズレスデジタル ELISA 法に向けた高感度蛍光計測用 CMOS イメージセンサの設計,” 映像情報メディア学会年次大会, 大阪大学 吹田キャンパス, 2014 年 9 月
19. 春田 牧人, 須永 圭紀, 山口 貴大, 竹原 浩成, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “行動実験を目的とした埋植用 CMOS イメージングデバイスによる脳機能イメージング,” 日本神経科学大会(Neuroscience2014), パシフィコ横浜, 2014 年 9 月
20. 笹川 清隆, 北口 一樹, 竹原 浩成, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 山内 里紗, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “行動実験を目的とした埋植用 CMOS イメージングデバイスによる脳機能イメージング,” 応用物理学会秋季学術講演会, 北海道大学 札幌キャンパス, 2014 年 9 月
21. 笹川 清隆, 竹原 浩成, Soo Hyeon Kim, 山内 里紗, 北口 一樹, 野田 俊彦, 徳田 崇, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “1 分子計測に向けたレンズレス CMOS 蛍光観察デバイス,” 情報センシング研究会, 機会振興会館, 2014 年 9 月
22. Hironari Takehara, Kazuya Miyazawa, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, “A CMOS Image Sensor Having Stacked Photodiodes for Lensless Observation System of Digital Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA),” 第 14 回「関西コロキウム電子デバイスワークショップ」大阪工業大学 うめきたナレッジセンター, 2014 年 11 月, (招待講演)

受賞

1. VDEC デザイナーズフォーラム 2013, VDEC デザインアワード敢闘賞,
2012年8月

謝辞

本研究は奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 光機能素子科学講座において、太田淳教授の温かい御指導の下で遂行されました。太田淳教授には主指導教官として、素晴らしい研究テーマとめぐり合わせて頂き、要所で有益な助言をいただきました。なにより、私のような熟年を学生として受け入れて頂いたことに深く感謝いたします。

同研究科 情報機能素子科学研究室 浦岡行治教授には副指導教官として本研究を進めるにあたり、副指導教員として研究指針や研究内容に関する多様な方面で御指導を頂きました。ここに深く感謝いたします。

同研究科 量子物性科学研究室 柳久雄教授にはスーパーバイザとして本研究を進めるに当たり、研究指針や研究内容に関する多様な方面でアドバイスを頂きました。ここに深く感謝いたします。

同研究科 光機能素子科学研究室 徳田崇准教授にはスーパーバイザとして、本研究を進めるにあたり、研究内容や実験内容に関して、日々、有益な御提言や御指導を賜り、ここに深く感謝いたします。

同研究室 笹川清隆助教には、本研究を進めるに当たって、多くの関連情報やアイデアを賜りました。LSI 設計、イメージセンサ評価等研究を進める上で貴重な御指導をいただきました。また、論文や学会発表の内容についての的確な御提言を賜りました。ここに深く感謝いたします。

同研究室 野田俊彦助教には、特にプロセス技術に関して豊富な知識と経験に基づき御指導、御提言を賜りました。また、定期的開催された実験基礎講座は大変役に立ちました。ここに深く感謝いたします。

同研究室 竹原宏明特任助教には、実験を進めるあたり貴重な御指導、御指摘をいただきました。ここに深く感謝いたします。

同研究室 研究員 春田牧人博士には、イメージセンサの評価方法や実験器具の使用法など細かな点まで詳しく御指導を賜りました。ここに深く感謝いたします。

同研究室 研究員 太田安美博士、野田佳子氏、元山真由美氏、河原麻実子氏には、設備の使用法などの的確な御指導、御提言を賜りました。ここに深く感謝いたします。

同研究室 若間範充氏（2014年3月博士前後期課程修了）、橋本力氏（2013年3月博士前期課程修了）、横田昇吾氏（2013年3月博士前期課程修了）には、私が初めてイメージセンサの設計をする際に多大な御協力と的確な御指導、御指摘を賜りました。ここに深く感謝いたします。

同研究室 岡林大恭氏（2013年3月博士前期課程修了）、宮澤和也氏（2014

年3月博士前期課程修了)、北口一樹氏(博士前期課程2年)、神山直也氏(博士前期課程2年)、永崎瑞樹氏(博士前期課程1年)には、デジタルELISAに関わるイメージセンサの設計や、実験において多くの御協力、貴重な御意見をいただきました。ここに深く感謝いたします。

同研究室 河村敏和氏(博士後期課程2年)、須永圭紀氏(博士後期課程1年)には、本研究を進めるにあたり様々な情報交換や貴重な御意見を賜りました。ここに深く感謝いたします。

同研究室 秘書松本和美氏には、研究活動を円滑に進める上で多大な御協力を頂きました。ここに深く感謝いたします。

東京大学 野地博行教授、飯野亮太准教授(現、自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター教授)、Soo Hyeon Kim 助教、田端和仁講師、小野堯生博士、研究員 山内里紗氏には、共同研究先として、研究を遂行する上で様々な御協力、御提言を賜りました。ここに深く感謝いたします。

大学連携 CMOS イメージセンサ開発プロジェクトにおいては、主幹として御尽力頂いた、東北大学 須川成利教授、黒田理人准教授をはじめ関係者の方々に深く感謝いたします。

株式会社 太洋工作所 喜多村康一常務取締役、藤田喜則氏、村上洋介氏には、めっきおよびその関連技術について御協力いただきました。貴重な情報を賜り、実際のプロセス処理には多くのお時間を割いていただきました。ここに深く感謝いたします。

半導体チップ試作にあたり、御協力頂いた東京大学大規模集積センター、株式会社トッパン・テクニカル・デザインセンターに心から感謝いたします。

本研究の一部は、戦略的創造研究推進事業(CREST)「プロセスインテグレーションによる機能発現ナノシステムの創製」、「平成26年度奈良先端大発新産業創出支援事業」の助成を受けて遂行されました。関係者の方々に深く感謝いたします。

最後に、大学院への進学に理解を示し、研究生活を行うにあたり多大な支援を与えてくれた家族、特に妻 広実(ひろみ)に心から感謝いたします。