

蛍光材料と電子ビーム描画法を用いた蛍光顕微鏡用
微細発光スケールの作製に関する研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学大学院電子科学研究科 公開日: 2008-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 杉山, 達彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/1182

氏名・(本籍)	杉 山 達 彦 (岐阜県) 445
学位の種類	博 士 (工 学)
学位記番号	工博甲第 274 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規程第 5 条第 1 項該当
研究科・専攻の名称	電子科学研究科 電子応用工学
学位論文題目	蛍光材料と電子ビーム描画法を用いた蛍光顕微鏡用微細発 光スケールの作製に関する研究
論文審査委員	(委員長) 教授 神 藤 正 士 教授 川 田 善 正 教授 原 和 彦 教授 皆 方 誠

論 文 内 容 の 要 旨

バイオテクノロジー技術の急速な進展と共に、蛍光顕微鏡が生体観察に多く用いられるようになっており、より微細な細胞の解析を目指した共焦点蛍光顕微鏡などの高分解能蛍光顕微鏡の開発が精力的に進められている。高分解能蛍光顕微鏡の開発においては、2点分解能を評価する分解能評価チャートが重要である。また、蛍光顕微鏡による観察の際、被測定物の観察と同時に直接寸法を測定可能な蛍光スケールが作製できれば、観察の際に有用であると考えられる。近年、2光子吸収顕微鏡などの非線形顕微鏡が生体の観察に使われ始め、蛍光スケールに対する需要は高まっている。蛍光顕微鏡の分解能評価には微細加工チャートを用いる方法があるが、非常に高価で、観察者自らが蛍光材料を塗布して試料作製するなど取扱が面倒である。また、蛍光ビーズを散布する方法は、散布状況が不明のため2点間距離を定量的に評価することはできない。そこで、本研究では、試料そのものが発光して、取扱が容易かつ寸法を定量的に評価可能な蛍光スケールの作製を目指した。

本論文は、序論と結論を含む全6章で構成されている。

第1章では、本研究における背景及び目的について述べている。

第2章では、試料そのものが発光する基板の作製を目的に、ローダミンとPMMAを用いた蛍光薄膜を作製した。次に、電子ビーム(EB)を蛍光薄膜に照射して非発光部を形成することにより、明部と暗部からなるパターンを作製することができた。また、アニーリング処理が膜の均一化に有効であることがわかり、またパターンの高コントラスト化にも有効であることを示した。

第3章では、蛍光顕微鏡用分解能チャートに必要な、蛍光強度が高い薄膜・明暗のコントラスト(C.R.)が高いパターン・微細パターンの作製を目的として、高輝度蛍光発光薄膜の作製、高輝度薄膜

へのEB描画によるパターン化、パターンの高コントラスト化、及び微細パターンの作製について示している。まず、ローダミン濃度を限界近くまで増加させることにより、蛍光強度の高い薄膜を作製することができた。しかし、高輝度薄膜にEB描画を行ったところ、パターンのC.R.は減少した。この原因は、蛍光発光部である明部からの迷光の影響であることが分かった。一方、ベースのPMMAはEBレジストであり、EB照射部分は現像により除去可能である。この性質を利用して高輝度薄膜からなる2本のラインパターンを形成したところ、C.R.=6.0の高コントラストのパターンを作製することができた。また、金のバックコーティングをすることによりさらにコントラストは高まり、C.R.=8.3となった。この高コントラストパターンの寸法は数 μm 程度であったが、微細化を試みたところ、ライン幅110nm、ライン間隔370nmのパターンを形成することができた。このパターンは、観察時に十分な蛍光強度をもっている。さらに微細なパターンに関しても、EBの条件や描画装置を変えることで対応可能であると考えられることから、蛍光顕微鏡の分解能評価の目安となる「分解能評価チャート」は作製可能であることが示された。

第4章では、分解能評価チャートの作製過程を踏まえて、応用として各種蛍光スケールの作製を行った。レーザー走査型蛍光顕微鏡での使用を想定して、最小間隔1.0 μm 、および0.5 μm のスケールを作製したところ、明瞭な観察像が得られる蛍光スケールを作製することができた。また、各種用途を想定した格子状パターンやくさび状パターンも作製した。顕微鏡メーカーにてサンプル評価を行った結果、有用な評価を得られ、これらのスケールは、蛍光顕微鏡による細胞等の観察の際に非常に有効なものであると考えている。今後、実用化した場合、一定時間強力な励起光を照射し続けることが予想される。そこで考えられる退色性を調べた結果、パターン化作製に用いた蛍光薄膜が退色することが明らかとなり、顕微鏡メーカーからも同様の指摘を受けた。また、光るスケールにおいては、試料の発光色との関係から発光色を選択できることが望ましい。

そこで、第5章では、発光色を選択できて、かつ退色の少ない蛍光発光スケールの作製を目的に、蛍光材料として半導体微粒子に着目して研究を進めた。CdSeをコアとし、ZnSをシェルとする半導体微粒子を用いて蛍光スケールの作製を試みた。そして、ローダミンと退色の比較を行ったところ、一定時間強力な励起光を照射し続けても半導体微粒子では退色が生じないことが判明した。EB描画法によりPMMA薄膜にパターン化した溝加工を行い、その溝に微粒子を流し込む方法でスケールの作製を行った。その結果、均一性に問題はあるが、明瞭な蛍光スケールを作製することができた。一方、半導体微粒子の発光色に関して理論的検討を行った。微粒子の波動関数と固有値の計算から、CdSeのコア径が10nm Φ より小さい領域から発光色は変化し、バルクの色からサイズで決まる色へとブルーシフトすることが判明した。以上の検討により、半導体微粒子を用いることにより退色が極めて少なく、発光色を選択可能な蛍光スケールを作製可能であることを明らかにした。

第6章では、本論文の結論を述べている。以上、本論文は、蛍光材料を用いたEB描画による蛍光顕微鏡用微細発光スケールの作製に関する研究であり、蛍光顕微鏡を用いた評価や測定に極めて有効で、かつ、これまでに存在しなかった作製・取扱共に容易な蛍光スケールを提案し実現した内容をまとめたものである。

論文審査結果の要旨

バイオテクノロジーの急速な進展に伴い、動きの速い生体にダメージを与えることなく、より微細な領域を解析可能な共焦点顕微鏡等の「高分解能蛍光顕微鏡」の開発が進められている。高分解能顕微鏡の開発においては、2点分解能の測定が重要である。蛍光顕微鏡用の分解能評価チャート(蛍光発光パターン)としては、高価で取扱の面倒な「微細加工チャート」を代用するか、定量的評価の不可能な「蛍光ビーズ散布法」を用いている程度であり、簡便で定量的な「高分解能評価チャート」は実在せず、その実現が強く求められている。また、生体観察に「2光子吸収顕微鏡(非線形顕微鏡)」が使われ始め、被測定物の観察と同時に寸法を直接測定可能な「蛍光スケール」の需要が高まっている。特に、微生物の個体数計測を行っている広範な分野においては、「網目状の光る目盛」があれば計測時間の短縮が可能であり、その実現が望まれている。本論文は、従来存在しなかった蛍光顕微鏡用微細発光スケールの提案と作製評価を行ったもので、全編6章より成る。第1章は、本研究の背景と目的を述べている。第2章では、蛍光材料ローダミンとベース材料PMMAの蛍光薄膜合成と評価、および電子ビーム照射による非発光部の形成条件等を検討している。第3章では、高輝度、高コントラスト化の検討を行っている。発光薄膜のパターン化、ローダミン濃度の調整等により、ライン幅110nm、間隔370nm、厚さ1 μ mの形状と十分な発光強度を持つパターンが得られており、「分解能評価チャート」実現の可能性を明らかにしている。第4章では、実用化を意識して試作を行っている。まず、最小間隔1 μ mと0.5 μ mの「光る目盛」を試作し、レーザー走査型顕微鏡により観察したところ明瞭な像が得られた。顕微鏡評価用楔状パターンや計数用網目パターン等も試作評価した。顕微鏡関連企業による評価でも、発光強度は細胞と同等以上で、均一性も良く、非常に有効であるとの結論を得た。しかし、強力な励起光下では蛍光の退色があることが判明した。第5章では、新蛍光材料としてCdSeをコア、ZnSをシェルとする半導体微粒子を採上げてスケールを試作したところ、懸案の退色が全くないことが判明し、微粒子の波動関数の計算からコア径が10nmより小さくなると、CdSeバルクの色からサイズで決まる色へとブルーシフトすること等を明らかにした。これより、退色耐性が高く、発光色を選択可能な所望の微細蛍光スケールの作製が可能であることを明らかにした。第6章は結論である。

以上の成果は、バイオテクノロジーの開発に多くの知見を与えるものであり、博士(工学)の学位を授与するのに適当な内容であると認定する。