技術論文

マイクロマシニング技術を用いる石英及びガラス製電気泳動チップの作製とそれらの基本特性評価

中西 博昭^{*、} 阿部 浩久^{*}, 西本 尚弘^{*}, 荒井 昭博^{**}

Micro-fabrication and analytical performances of quartz and glass microchips for electrophoresis

Hiroaki NAKANISHI, Hirohisa ABE, Takahiro NISHIMOTO^{*} and Akihiro ARAI^{**}

^{*}Technology Research Laboratory, Shimadzu Corporation, 3-9, Hikaridai, Seika-cho, Soraku-gun, Kyoto 619-0237

^{**}HPLC Business Department, Analytical Instruments Division, Shimadzu Corporation, 1, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511

(Received 16 January 1998, Accepted 4 February 1998)

Microchips for capillary electrophoresis have been fabricated in small size on quartz or glass substrates. Each microchip is 11 mm × 28 mm in size and 1.5 mm in thickness. It has a sample loading channel, a separation channel and four reservoirs at the ends of each channel. To fabricate a quartz chip, we applied a novel bonding method with a 1% (w/v) hydrofluoric acid solution. Using fabricated microchips, we evaluated several of their analytical features. We have shown that the microchips permit quantitative sample injection (several 10 pl or less) with an adequate potential control, high-speed analysis (30 s) due to the high heat-dissipation capability and effective separation (the number of theoretical plates is over 2500 at separation length of 17 mm).

Keywords : micromachining; capillary electrophoresis; microchip; high speed analysis; quartz chip.

1 はじめに

近年、マイクロマシニング技術を用いて、分析装置の主要構成部品をデバイス化して装置の小型化を図る、更にはサンプリングから検出までの分析に必要な機能すべてを基板上に集積して、超小型分析装置の実現を目指す研究が注目されつつある。これらの研究は、 μ -TAS

(micro total analysis system) もしくは LOC (laboratory on a chip) と称され、欧米を中心に積極的に研究が展開されている。その目的は、小型・軽量・安価な分析装置を実現することで、医療や環境分析などの分野で要求されるオンサイト (on site) 分析を可能にすること、サンプルや溶媒の消費量を低減すること、分析の高速化を図ること、などである。

このような背景の中で、キャピラリー電気泳動装置のキャピラリーとリザーバーの機能を Pyrex[®] ガラス基板上に集積し (電気泳動チップ)、微量のサンプルや溶媒を用いて高速分析が可能であることが、Harrison らに

^{*} (株)島津製作所基盤技術研究所: 619-0237 京都府相楽郡精華町光台 3-9

^{**} (株)島津製作所分析機器事業部 LC 部: 604-8511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1

よって報告されている¹⁾²⁾。電気泳動チップは、泳動により発生するジュール熱を効率良く放熱できることから、より高い電圧で泳動が可能となるため、分析時間の短縮が図れる。又、自由な形状の流路を設計できることから、十字にクロスさせた流路も作製でき、これをサンプル注入流路と分析流路として用いることで、数 μl という微量のサンプルや溶媒で分析が可能であり、かつ流路クロス部の体積（例えば数十 pl ）の微量なサンプルを定量的に分析流路に導入できる可能性を有する。更に、電気泳動チップは流路の両端に電位を印加するだけで流体の流れを制御できるため、バルブやポンプといった可動部品が不要であり、装置の小型化や信頼性向上に有利であると考えられる。

一方、このような特長を有する電気泳動チップを実際の分析装置に応用する場合は、そのはん用性から検出方式には紫外-可視光吸収の適用が望ましい。しかしこれまで報告されている電気泳動チップの材料である Pyrex ガラスは紫外光を吸収するため、紫外吸収を検出に利用することができなかった。このため、紫外線の透過特性が優れた石英を材料とするチップの実現が望まれる。又、電気泳動チップを用いた分析装置の実現のためには、泳動液やサンプルを泳動させるために、チップに印加する電圧の詳細な制御や、サンプルのチップ内における泳動状態等の基本特性を十分に把握する必要がある。

そこで著者は、電気泳動チップを用いた小型分析装置の実現を目指す端緒として、Pyrex 基板及び石英基板を材料として、電気泳動チップをウェハー単位で作製するプロセスを開発し、作製したチップを用いてその基本特性を評価した。本報では、電気泳動チップの構成と作製プロセスについて概説するとともに、電気泳動チップに印加する電圧の制御と泳動液やサンプルの泳動状態の関係、チップの熱放散特性や実際の分析例について報告する。又、ウェハー単位で作製した電気泳動チップの分離性能のばらつきに関する評価についても言及する。

2 電気泳動チップの構成

Fig. 1(a) に、今回製作した電気泳動チップ（ $11\text{ mm} \times 28\text{ mm} \times t 1.5\text{ mm}$ ）の構成図を示す。電気泳動チップは、幅 $50\text{ }\mu\text{m}$ 、深さ $20\text{ }\mu\text{m}$ の流路 [Fig. 1(b)] を形成した厚み 1 mm の基板と、約 $\phi 1\text{ mm}$ の貫通穴を形成した厚み 0.5 mm のカバープレートとを直接接合して形成している。流路はサンプル注入流路と分析流路の2本を形成しており、各々の流路の両端にカバープレートの貫通穴を配置して、泳動液とサンプルのリザーバーとして機能させている。Fig. 2 に作製した電気泳動チップ

Fig. 1 Structure of the microchip
(a): schematic view of the microchip; (b): cross section (A-A) of a base plate

Fig. 2 Layout of the microchip
Section A-A' and B-B' shown in Fig. 3

の配置図を示す。サンプル注入流路の全長は 15 mm 、分析流路の全長は 29 mm であり、流路のクロス部から検出点までの有効分離長は 17 mm である。又、各々のリザーバーの容積は約 $1\text{ }\mu\text{l}$ と非常に少量である。

Table 1 Materials used in the studies

Material	Type	Specification	
Quartz (synthesized)	VIOSIL-SX (Shin-etsu Quartz)	Strain release temp.	1025 °C
Glass	Code 7740 (Iwaki Glass)	Softening temp.	1600 °C
		Strain release temp.	510 °C
		Softening temp.	820 °C

3 電気泳動チップの作製

電気泳動チップの作製に用いたガラス及び石英基板の特性を Table 1 にまとめる. いずれの基板も厚みは 1 mm で, 両面が機械研磨にて鏡面研磨されているものを用いた. 基板洗浄 (アセトン, メタノール, $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) の後, 各々のひずみ点近傍の温度で熱処理 (3 時間) を施し, 機械研磨による基板表面の残留応力を除去した. 機械研磨に起因する微小な傷や応力が基板表面に残っている場合, エッチングにより形成する流路の側壁に凹凸が発生する原因となる.

Fig. 3 に電気泳動チップの作製プロセスの概略を示す. 以下に述べる a) ~ d) の工程で基板には流路が形成され, e) ~ f) の工程で電気泳動チップが形成される.

a) アニール処理を施した基板上に, 厚み 200 Å の Cr と厚み 2000 Å の Au からなるメタルマスクを真空蒸着法により成膜する. 成膜時には, 基板表面の水分を除去するため 120°C に基板加熱を行った. Au 膜は後に行うガラスエッチング工程の保護膜として使用し, Cr 膜は基板と Au 膜の密着性を良くするための中間層である.

b) メタルマスク上に厚み約 7 μm のフォトリソグ (AZ4620, Hoechst) を塗布し, フォトリソグラフィ技術を用いてレジストを高精度にパターニング (現像液: AZ400K, Hoechst) する. その後, レジストを保護膜としてウエットエッチングにより Au/Cr マスクを順にパターニングする. Au のエッチングには $\text{I}_2 + \text{NH}_4\text{I} + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$ の混合液を用い, Cr のエッチングには市販の Cr エッチャント (TCR-1, 佐々木化学) を用いた.

c) 前工程でパターニングしたレジスト/Au/Cr マスクを保護膜として, 30°C, 46% (w/v) フッ化水素酸 (HF) 水溶液中にてウエットエッチングにより, ガラスもしくは石英基板に流路溝を形成する. 前工程終了後に除去せずに残したレジストは, Au/Cr マスクに存在するピンホールに起因するエッチピットの発生を防止する役割を果たす. 形成する流路溝の深さは, 時

<< Section A-A' in Figure 2 >>

-
- a) Deposition of metal mask (base plate)
- b) Patterning of metal mask (base plate)
- c) Etching of substrate (base plate)
- d) Removal of metal mask & Dicing (base plate)

<< Section B-B' in Figure 2 >>

-
- e) Ultrasonic drilling of through holes (cover plate)
- f) Bonding of cover and base plates
- g) Sputtering of electrodes for electrophoresis

Fig. 3 Process flow of the microchip

a) ~ d): show fabrication steps of a base plate through cross section A-A' from Fig. 2; e) ~ g): show steps of a cover plate and after bonding step through cross section B-B'

間制御でサブ μm 精度のコントロールが可能で, この条件での基板のエッチングレートは石英基板で 1.2 μm/min, ガラス基板で 10 μm/min である. Fig. 4 に, 石英基板に形成した流路溝の走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真を示す. 非常に滑らかな底面, 側壁を有する流路溝が形成されている.

d) レジスト, Au, Cr の順にエッチングマスクを除去

Fig. 4 A SEM image of etched channels on the quartz substrate

Fig. 5 Procedure of cleaning before bonding

した後、必要に応じてチップ単位にダイシングし、Fig. 5に示す手順で接合前洗浄を行う。アセトン、メタノール、 $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ による洗浄は有機成分の除去であり、1% (w/v) HF水溶液による洗浄は、基板表面層の除去を目的とする。

- e) カバープレートは、基板表面の傷保護のため両面をフォトレジストで覆った後に、超音波加工もしくはサンドブラスト加工にて約 $\phi 1 \text{ mm}$ の貫通穴を形成する。その後レジストを除去し、基板と同様に Fig. 5 の手順で接合前洗浄を行う。
- f) カバープレートと基板を接着剤などを使わずに直接接合し、電気泳動チップを形成する。ガラス基板の場合には、Fig. 6(b)に示すように、0.03 MPa 程度の荷

Fig. 6 Experimental set up of bonding process
(a): quartz-quartz bonding with hydrofluoric acid;
(b): glass-glass thermal bonding

重を印加しつつ、基板の徐冷点 (560°C) 近傍温度に5時間程度加温して基板界面を融着させる熱融着法により接合した。石英基板の場合には、徐冷点が1120°Cと高温であるため、熱融着法を適用した場合、基板のひずみによる接合不良や接合後のチップへの熱応力の残留などの不具合が発生する。これに対し著者らはその問題を解決するため、Fig. 6(a)に示すように、1% (w/v) HF水溶液を基板界面に介在させ、室温にて荷重を印加する接合方法³⁾を開発し、石英製チップの作製に用いた。

- g) 今回の評価実験には使用していないが、必要に応じて接合後のチップ表面に、各リザーバーに高電圧を印加するための電極と外部との電気的コンタクトをとるためのパッドを形成する。これらは、チップを装置にセットする場合に簡便な装着を実現するためには重要である。この場合の電極 (厚み 500 Å の Cr と厚み 3000 Å の Au) 成膜には、リザーバー内壁にも電極膜を形成する必要があるため、ステップカバレッジに優れたスパッタ成膜法を用いた。

Fig. 7 Schematic view of the laser induced fluorescence detection system using a collinear optical arrangement

4 電気泳動チップの基本特性評価

4.1 評価装置

作製した電気泳動チップの評価には、蛍光顕微鏡を改良したレーザー励起蛍光測定装置を用いた。Fig. 7に示す構成図のように、励起光にはアルゴンレーザー（488 nm, 15 mW）を用いた。レーザー光のスポット径はチップ流路上において $10\text{ }\mu\text{m}$ である。チップ流路とレーザー光の位置合わせは、マイクロメーターを装着したX-Yステージを用いた。流路内からの励起光は、フィルターを通過させた後に光電子増倍管により検出した。又、流路内のサンプルの流れを観察するときには、外部より波長が473 nmの固体ブルーレーザー（HK5510, 島津製作所）をチップに照射（スポット径：約 $\phi 1\text{ mm}$ ）し、同測定装置を用いて観察するとともに、電荷結合素子（CCD）を用いて記録した。評価に用いた電気泳動チップは、本測定装置による光学観察のため表面に電極を形成せず、各リザーバーにPt電極を挿入して電圧を印加した。

4.2 結果

4.2.1 印加電圧の制御 各リザーバーに印加する電圧と泳動液やサンプルの泳動状態の関係について Fig. 8に概要を示す。図中の①～④は各リザーバーに対応している。サンプルを導入する場合は、リザーバー①にサンプルを滴下した後に①～②間に電位差（ $V_{1:2}$ ）

Fig. 8 Sequence of applying voltage control

1.2 kV) を与える。流路のクロス部にサンプルが十分満たされた後に、リザーバー③～④間に電位差（ $V_{3:4}$: 1.0 kV）を与えることで、分析流路にサンプルを注入し分離を行う。実際には、サンプル導入時に①～②間に電位差を与えた場合は、リザーバー③、④方向へサンプルが拡散する問題が発生するため、リザーバー③、④から流路のクロス部方向に泳動液が流れるような電圧を③（ $V_{3:2}$: 1.0 kV）、④（ $V_{4:2}$: 1.2 kV）に印加することでサンプルの拡散を防止した。その状態を CCD により撮像した図を Fig. 9 に示す。又、分離時に③～④間に電位差を与える場合は、リザーバー①、②から分析流路へのサンプル流入を防止するため、リザーバー③から

Fig. 9 Photograph of cross point of channels when 5 μ M Fluorescein is loaded with 45 mM of Tris-borate buffer (pH 8.2)

①, ② 方向に泳動液が流入するような電圧を① (V_{1-4} : 0.5 kV), ② (V_{2-4} : 0.5 kV) に印加した。このようにして、流路クロス部の容積 (数十 pl) 程度のサンプルを精度良く定量的に注入することが可能となった。

4・2・2 熱放散特性 電気泳動チップの熱放散特性を調べるため、ガラス製のチップを用いて電界-電流特性を測定した。比較のために、内径 50 μ m の溶融シリカキャピラリーについても同様の測定を行った。Fig. 10 にそれらの結果を示す。いずれの場合も、電界強度を上げるとキャピラリー内部で発生するジュール熱により泳動液の抵抗率が下がり、初期の抵抗率とキャピラリーの断面積から得られる計算値に対して電流が流れやすくなる。この現象が発生する単位長さ当たりの電力は、溶融シリカキャピラリーの場合は 0.6 W/m, 電気泳動チップの場合は 2.1 W/m であった。これらの結果より、電気泳動チップは従来の溶融シリカキャピラリーと比べて、熱放散特性が数倍優れていることが分かる。すなわち、単位長さ当たりに大きな電界強度の印加が可能であり、分析の高速化に有利である。

4・2・3 分析例 Fig. 11 に、蛍光試薬であるフルオレセインとカルセインの混合物を石英製チップで分離した例を示す。又、フルオレセインで標識したアルギニン、メチオニン、グリシンのアミノ酸 3 成分をガラス製チップで分離した例を Fig. 12 に示す。いずれも数十秒で分離が実現しており、従来のキャピラリー電気泳動装置より高速分析が可能であることを示している。いずれの場合も、理論段数は約 2500 段であった。又、ウェハー単位で作製した複数の石英製チップを用いて、同じ泳動条件における流路クロス部から検出点までのカルセイン

Fig. 10 Plots of current versus field strength for fused silica capillary and Pyrex chip with 40 mM of (Na) phosphate buffer (pH 6.9)

Fig. 11 Electropherogram of 5 μ M fluorescein and calcein using quartz chip

の泳動時間のばらつきを評価した。1 セット (基板とカバープレート) の 3 インチウェハーから 6 個の石英製チップを作製し、2 セット分で合計 12 個のチップについて評価を行った。その結果、光学顕微鏡による検査で流路形状、接合状態に全く問題のないチップ (7 個) については、ばらつきは 2% 以下であった。歩留まりに関しては改善の余地を十分に残すものの、量産の可能性

Fig. 12 Electropherogram of fluorescein labeled 10 mM arginine metionine and glycine using glass chip

を確認できた。

5 考 察

石英製及びガラス製の電気泳動チップ作製プロセスを開発した。特に石英製の電気泳動チップについては、室温で接合が可能な HF 水溶液を用いた接合方法を開発して応用し、ウェハー単位で作製したチップが良好な基本特性を示すことを確認した。しかし、分離特性のばらつきが 2% 以下であるチップの歩留まりは 58% であった。この歩留まり低下の原因は、メタルマスクと基板の密着性のばらつきに起因する流路幅の拡大や流路側壁の凹凸、接合界面への異物の混入に起因する部分的な接合不良、流路内面の最終処理方法等である。今後は、それらについてプロセスの改善検討を行っていく予定である。又、作製した電気泳動チップの基本特性評価に関しては、従来のキャピラリーと比較してチップの熱放散特性は数倍良好なこと、 μl オーダーの微量の泳動液やサ

ンプルを用いて数十秒オーダーの高速分析が可能なこと、それらの理論段数は約 2500 段であることを確認した。実際の CCD 観察からは、流路のクロス部から数 mm 泳動させるだけでも試料の分離が観測できているため、適用する分析対象によっては、さらなる分析の高速化も可能であると考えられる。理論段数については改善の余地があるが、今後、流路内面のシラノール基の存在と泳動特性などの詳細な特性検討と併せて評価を継続していく。

電気泳動チップを用いた小型分析装置の実現を目指して、チップの作製プロセスを開発し、 μl オーダーの泳動液とサンプル量で数十秒オーダーの高速分析が可能であることを確認した。現在、石英製チップを用いた UV 吸収検出による分析について実験を開始している。今後は、分離性能及び分析再現性の向上を目的として、流路内面に存在するシラノール基の存在と泳動特性の関係、流路内面処理法など、分析ツールとして電気泳動チップに要求される事項について研究を継続するとともに、ウェハー単位のチップ作製プロセスの改善、歩留まりの向上を図る予定である。更に将来は、チップの使い捨て化による分析再現性の向上、分析に要する作業の簡便化に結びつけたいと考えている。

(1997 年 12 月, 第 17 回キャピラリー電気泳動シンポジウムにて一部発表)

文 献

- 1) D. J. Harrison, K. Fluki, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, A. Manz: *Science* (Washington D. C.), **261**, 895 (1993).
- 2) D. J. Harrison, Z. Fan, K. Seiler, A. Manz, H. M. Widmer: *Anal. Chim. Acta*, **283**, 361 (1993).
- 3) H. Nakanishi, T. Nishimoto, N. Nakamura, S. Nagamachi, A. Arai, Y. Iwata, Y. Mito: *Proceedings of IEEE MEMS '97*, p. 299 (1997), Nagoya.

要 旨

マイクロマシニング技術を用いて、石英基板及びガラス基板上に電気泳動用のキャピラリーを形成した電気泳動チップを作製する技術を開発した。今回、作製・評価した電気泳動チップの大きさは $11\text{ mm} \times 28\text{ mm} \times t 1.5\text{ mm}$ であり、幅 $50\text{ }\mu\text{m}$ $\times$ 深さ $20\text{ }\mu\text{m}$ の2本の流路を形成した基板と、泳動液のリザーバーを形成したカバープレートを直接接合することで形成している。石英チップの接合には、室温にて接合可能な HF 水溶液を用いた接合技術を応用した。更に、作製した電気泳動チップを用いて、印加する電圧の制御で数十 pI という微量なサンプルを定量的に簡便に導入できること、熱の放散特性が優れ秒オーダーの高速分析が可能なこと、分離長 17 mm において理論段数は約 2500 段であることなどを確認した。又、ウェハー単位で作製した石英製チップの分離特性のばらつきは、約 2% (歩留まり 58%) であった。石英製チップは、応用範囲の広い紫外光の吸光度検出が利用できる。