A Novel Micromixer with Three-Dimensionally Cross-Linked Capillary Array Structure Fabricated by Deep X-ray Lithography

Saki Kondo Non-member (Laboratory of advanced Science and Technology for Industry , University of Hyogo)

Yoshiaki Ukita Student Member (Laboratory of advanced Science and Technology for Industry , University of Hyogo,
Research Fellow (DC), Japan Society for the Promotion of Science)

Kuniyo Fujiwara Non-member (Laboratory of advanced Science and Technology for Industry , University of Hyogo)

Yuchi Utsumi Member (Laboratory of advanced Science and Technology for Industry , University of Hyogo)

Keywords : micromixing, three-dimension

There have been proposed many kinds of micromixers. Especially micromixer using three-dimensional (3D) structure is promising strategy for microfluidics. However there are some restrictions, for example it needs complex fabrication process with multiple photomasks, alignment and bonding. Furthermore it fabricated on planar substrate with long capillary, which is not favorable for large-scale integration aiming high-throughput screening because it needs large area to construct, while simultaneous operation of multiple microreactors for the high throughput screening is one of the biggest applications of microfluidics. We present novel micromixer using 3D microstructure with no complex fabrication process and long capillaries by using vertical fluid flow operation concept.

The new concept of this paper is to cross capillaries by controlling overlap level of crossing capillaries. The computational fluid dynamics (CFD) using CFD package 'FLUENT' is carried out to estimate the performance of the micromixer. To trace the mixing behavior, chemical species is assumed in initial condition. Figure 1 shows initial condition of water with chemical species (the property is the same as water) and mixed waters through cross-linked capillaries, and fig. 3 shows the time shift of the standard deviations (SD) of mass fraction of chemical species in the mixture. We assumed two crossing patterns which totally overlapping (fig. 1) and half overlapping (fig. 1) patterns and capillaries without crossing for

control. The results indicate that the crossing structure has much better mixing performance and half overlapped structure provides the best mixing, because it induces branch of flows around the cross (fig. 1) while totally overlapped one does not exhibit such behavior because it maintains the stable laminar flow (fig. 1).

Typical micromachining is not suitable to control the level of overlap, because it needs very complex processes. To generate the cross-linked structure, deep x-ray lithography is applied. The PMMA resist attached with x-ray masks are tilted up to x-ray beam for first exposure and then tilted down for second exposed. The level of overlap is controlled by slightly rotating the masks around normal axis.

To evaluate the mixing performance of this micromixer we applied this micromixer to enzyme reaction. Enzyme and substrate are mixed by passing the micromixer and the product of the enzyme reaction is measured by spectroscopy. Figure 4 compares the mixing results with cross-linked capillaries and without cross-linked capillaries. The result shows that the mixing with cross-linked capillary structure is speeding up the enzyme reaction by obtaining the uniform mixture.

Fig. 1. Fluid behavior cross type filter

Fig. 2. Analysis model of cross type filter

Fig. 3. Simulation result of cross type filter

Fig. 4. Time shift of the enzyme reaction

X線リソグラフィーにより作製した三次元交差型流路を持つ 新規マイクロミキサー

非会員 近藤 沙妃* 学生員 浮田 芳昭*,**
非会員 藤原 邦代* 正員 内海 裕一*

A Novel Micromixer with Three-Dimensionally Cross-Linked Capillary Array Structure Fabricated by Deep X-ray Lithography

Saki Kondo*, Non-member, Yoshiaki Ukita*,**, Student Member, Kuniyo Fujiwara*, Non-member, Yuichi Utsumi*, Member

A novel micromixer is proposed, fabricated and verified. The new concept of the micromixer is to cross-link the many capillaries in three-dimensional structure. The characteristic flow behaviors are simulated by using computational fluid dynamics(CFD) software "FLUENT". The results of the CFD shows unique mixing behavior in three-dimensionally cross-linked capillaries. The mixing performance of the micromixer is strongly influenced by controlling the three-dimensional crossing condition. The micromixer is fabricated by means of deep X-ray lithography with multi step exposure. The cross-linked capillary structures are successfully fabricated with controlled cross-link conditions. The performance of micromixer is evaluated by using a kind of enzyme reaction. By comparing mixture, mixed with cross-linked fluid filter and fluid filter without cross-linked capillaries, we found out the speeding up of the reaction by using new micromixer.

キーワード：マイクロミキシング，三次元

Keywords : micromixing, three-dimension

1. はじめに

近年，環境，食品，医療など様々な分野において，高感度，ハイスループット，そして，高効率な分析システムが必要とされている。そこで，注目されているのが μ -TAS (Micro Total Analysis Systems) である。 μ -TAS とは，従来の分析システムをマイクロ化したマイクロ流体デバイスを用いて，分析に必要な単位操作をマイクロチップ上で行なうシステムである。システムを小型化することにより，省資源，省エネルギー，省スペース等を実現可能である。また，分子拡散距離の短縮による反応速度の高速化が可能となる。また，システムが小型化されたことにより，精密な温度制御や局所的な温度制御が可能となる。この様に，マイクロシステムを用いることにより高効率な反応を実現できる。しかし，マイクロ流体デバイスにはいくつか問題があ

る。マイクロ流体デバイスはキャピラリーが平面空間に展開するため，単位操作に毎に長いキャピラリーが必要となり，集積化，多検体化が困難となる。また，非常に長い微細キャピラリーを使用すると，圧力損失が大きくなるため，集積化されたシステムの動作には出力の大きなポンプが必要となる。また，微細な流路を用いるため，チャンネル内の流れは層流となり，ミキシングが困難になる。ミキシング効率が低下することにより，分析においては再現性に問題が生じ，化学合成においては収率の低下などの問題が生じる。そのため，単位操作をチップ上に統合するためには

Fig. 1. Schematic illustration of the vertical fluid flow operation

* 兵庫県立大学 高度産業科学技術研究所
〒678-1205 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-1-2
Laboratory of Advanced Science and Technology for Industry,
University of Hyogo, 3-2-1, Kouto, Kamigori, Ako, Hyogo
678-1205

** 日本学術振興会
〒102-8472 東京都千代田区一番町 8 番地
Japan Society for the Promotion of Science
8 Ichibancho Chiyodaku, Tokyo 102-8472

Fig. 2. Simulation result

Fig. 3. Time shift of the enzyme reaction

マイクロミキサーをシステムに集積化する必要となる⁽¹⁾⁽²⁾。このような微細な空間内で、極微量のサンプルを検出し定量するためには、高い空間分解能と検出感度を有する検出器が必要となる。このため高感度な検出手法が研究されているが⁽³⁾⁽⁴⁾、より実用的なシステムとしては、安価で簡便な手法で検出できることが好ましいと考えられる。

そこでわれわれは、平面構造であったマイクロ流体デバイスを立体的な構造にした垂直型マイクロリアクターを提案してきた^{(5)~(9)}。垂直型マイクロリアクターにおける立体的な構造内での流体操作は Fig.1 のように径数十 μm 程度の微細なキャピラリーを3次元的に集積化したマイクロフィルターを組み込み、これを用いて流体の挙動を制御することにより実現できる。キャピラリーの孔径は数十 μm と微細であるため、表面張力により溶液を保持することが可能である。また、保持状態にある溶液を加圧することによりフィルターを透過させ垂直方向への流体輸送を実現することが可能である (Fig.1)。このさい3次元的に集積化されたキャピラリー内壁での流体の拡散、およびキャピラリー出口での3次元的なコアンダ効果により、溶液がフィルターを透過する際、において顕著なミキシングが生じる。

従来、平面構造であったキャピラリーを三次元化することにより、立体的なキャピラリーの交差形状が許容され、キャピラリーのレイアウトの自由度が大きくなり、集積化、

多検体化に有利となる。また、先に述べたように溶液の保持、透過、攪拌という複数の流体挙動制御機能を受動的かつ単純な構造に集約化することにより、作製プロセスが簡便で信頼性の高いシステムとすることができる。

再現性のよい、単位操作のためには均一にミキシングされた混合溶液を得ることが必要となり、特に分析においては、不均一な溶液を用いることによりデータの再現性も悪化する。逆に、均一な溶液を用いることにより、反応を効率よく行なうことが可能となり、再現性が向上することが期待でき、検出感度そのものの上昇にもつながると考えられる。本研究では、三次元的なキャピラリークロスリンク構造を形成した、立体化学システムに実装可能な高効率マイクロミキサーを提案する。

2. 交差型マイクロフィルター

〈2.1〉 マイクロフィルター われわれは、これまでにマイクロフィルター透過時におけるミキシング挙動を数値流体力学 (CFD) により推定してきた。初期条件として、フィルター上部に保持された溶液の塊に仮想的に化学種が質量分率 1 で存在する領域を与える。次に溶液塊の上部を加圧することによりフィルター構造を透過させ、高濃度領域の変形と、化学種濃度の標準偏差によりミキシングの効率を評価した。さらに、透過した溶液を逆方向に透過させ、上下方向に繰り返し送液して、Fig.2 に示すような濃度標準偏差の時間的推移をえた。これより判ることは、一度目のミキシングにより顕著な攪拌が生じ、その後、繰り返しのよってもさらに溶液を攪拌することができるということである。これと同様の操作を、酵素反応を用いて行なった。C23O (酵素) を用いて、カテコール (基質) を開環反応させ、カテコール 2,3 ジオキシゲナーゼを得る。この反応で得る生成物は 375nm に吸収のピークを持っており、この波長を分光光度計 (USB2000 : Ocean Optics 社製) によりモニタリングした。実験結果を Fig.3 に示す⁽⁸⁾。ミキシングを行なわず酵素と基質の層が分離した状態で放置した場合には、生成物はほとんど検出されず、逆に一度のミキシングを行なった場合はこれに対して顕著な生成物の信号を検出した。また、繰り返し送液操作により 5 度、および、9 度のミキシングを行なうと、ほぼ同様の反応経緯をたどることから、5 度以内のミキシングで今回の系に対しては十分な攪拌が得られていることが示唆されている。しかしながら、より簡単な単位操作のためには、一度の攪拌により十分な攪拌効果を得ることが重要であり、より高効率な攪拌効果を示すミキサーの開発が必要となる。

〈2.2〉 交差型マイクロフィルター マイクロフィルターは Fig. 1 に示すような、まっすぐなキャピラリーのアレイ構造であった。この中で流体の攪拌効果はキャピラリー内での放物線状の流速分布に起因する流体の拡散、およびキャピラリー出口でのコアンダ効果によるものであった。さらに、キャピラリーを交差させ、3次元的な流体の振る舞いを積極的に用いることでミキシングの高効率化が実

現できる。これは、キャピラリーを交差させることにより、流れが衝突し、更なる攪拌の効果を付加することができる。特に、X線リソグラフィを用いることにより Fig.4 に示すような、一般的な微細加工技術では、複雑な作製プロセスを要する任意の交差形状を作製可能であることや、キャピラリーの断面形状も任意に設計できるなどの利点がある。

〈2・3〉 交差型マイクロフィルターの流体挙動解析
先に述べたように、キャピラリーを交差させることにより新たな 3 次元的な流体の挙動を誘起させて高効率なミキシングを実現する。特に Fig.4 に示すように、交差部での流体の挙動はキャピラリーの中心が完全に重なった形状と、中心がずれた状態で交差した場合とでは、流体の挙動が異なった様相を示す。たがいに交差するキャピラリーの中心をずらすことにより、キャピラリー内の層流により互いに反発し交差するキャピラリーに流れ込む流れと、反発せずに

Fig. 4. Fluid behavior cross type filter

Fig. 5. Analysis model of cross type filter

Fig. 6. Simulation result of cross type filter

直進する流れとの二種類の挙動を示し、顕著な攪拌効果を得ることができる。一方、中心が完全に重なった場合では、キャピラリー内の流れは層流であるため流れは互いに反発しあい、攪拌効果が減退することが推測できる。このような、推測を検証するために、我々は CFD により流体挙動のシミュレーションおよび攪拌能の推定を行なった。シミュレーションに用いる解析モデルは立体的な交差形状であるため 3 次元モデルを作成し、Fig.5(a)に示すような化学種が左右に分割されて分布する初期条件より、加圧により流体塊が交差したキャピラリーを一度透過する様子を解析した。また、キャピラリーの交差形状は直径 $40\mu\text{m}$ のキャピラリーの中央が完全に重なるものと、 $20\mu\text{m}$ ずれた状態で交差するもの、および比較対照として交差しない形状について解析を行なった。なお、解析には CFD ソフトウェアである FLUENT を用いた。Fig.5 に CFD により得た流体の挙動および、Fig.6 解析により得た流体透過中における濃度標準偏差の時間的推移を示す。Fig.5 に示すように、キャピラリーの中心を一致させた場合、左右の入り口から浸入した流れが交差部で衝突している様子が示されている。これに対して、キャピラリーの中心をずらした場合には、反発しあう流れと直進する流れとの 2 種類の挙動により交差部を通り過ぎることにより二つの流れの混合が生じる。Fig.6 の標準偏差が示すように、交差部での中心のずれが、ミキシングに顕著な影響を与えることを示しており、本手法の優位性が明らかになる結果となった。

3. 作製および評価

〈3・1〉 交差型マイクロフィルター作製プロセス
交差型マイクロフィルターは放射光を用いた X 線リソグラフィを用いて作製した。X 線リソグラフィでは X 線の吸収体 (Au) によりパターンニングされた X 線マスクを介し、レジストに X 線を照射する。X 線を照射することにより、X 線マスクのパターンがレジストに転写され、現像液に浸漬することにより構造体が形成される。以上の工程は光源こそちがうものの一般的に用いられているフォトリソグラフィプロセスと酷似したプロセスであるが、短波長 (高エネルギー) の X 線を用いることにより、mm オーダーという、レジストの深部にまでおよび超高アスペクト比の加工が実現できる。このような加工プロセスを用いることにより、一般的な作製プロセスでは実現困難である、流路の軸方向に掘り進む加工を実現できる。交差型マイクロフィルターの作製には Fig.7 に示すように、多段階にわけて X 線を照射する。今回用いた X 線露光装置は 5 軸露光ステージが備え付けられており、ステージの傾きを制御し、2 回の X 線照射を行なうことで交差形状のパターンニングを行なうことができる (Fig.7)。高アスペクト比の微細加工が可能なプロセスには SU-8 などの高感度な厚膜レジストを用いた UV-LIGA プロセスが挙げられるが、ネガ型のフォトリソトでは照射された部分が硬化するため、このような形状を作製することは不可能である。交差型フィルターのような

三次元の構造体は UV では作製が困難である。

作製した交差型マイクロフィルターの走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真を Fig.8 に示す。作製したキャピラリーの直径は $40\mu\text{m}$ であり、フィルターの厚みは $400\mu\text{m}$ である。X 線照射時の傾きはキャピラリーが 2 回交差するように設定した。キャピラリーの交差を半分ずらした状態での作製に成功していることが判る。

〈3・2〉 交差型マイクロフィルターの評価 作製した交差型フィルターの攪拌能を評価するために、カテコール (catechol) の開環反応を用いてその効果の検証を行った。混合物が均一に混ざり酵素が基質溶液中に均一に分布する状態では効率よく反応がすすむため、酵素反応の反応速度を評

Fig. 7. Schematic illustration of multi step exposure

Fig. 8. SEM image of cross-linked fluid filter

Fig. 9. Time shift of the enzyme reaction

価することによりミキシングを評価した。すなわち、吸光度の時間変化を計測し、酵素反応がより早く収束するほど均一な溶液が得られていると仮定した。生成物は 375nm に吸収を持つため、光ファイバ分光光度計 (Ocean Optics 社製) により反応の測定を行った。カテコールを $\text{pH}7.0$ に調整した 10mM のリン酸バッファ (PB) に溶かし 0.1mM とし、これを基質とした。酵素は、20 倍希釈したカテコール 2・3 デオキシナーゼ (C23O) を使用した。評価に用いたフィルターはキャピラリーの交差形状を有さないフィルターと交差型フィルターを用いた。測定結果を Fig.9 に示す。Fig.9 に示すラインは酵素の活性を示し、これは酵素反応が終結した際の吸光度である。結果より交差型マイクロフィルターを用いた場合、ストレートフィルターを用いた場合より反応が終結するまでの時間が短縮されていることが見出せる。これは、より高い性能を有するミキサーを使用して溶液を攪拌したため、酵素が基質溶液中に均一に分布することになり、効率よく反応が進行したためと考えられる。

4. まとめ

本稿では、垂直型マイクロリアクター内での、高信頼性・高効率な単位操作のための、交差型マイクロフィルターを提案した。CFD により示された流体挙動によると、ずれた交差形状を用いることにより、キャピラリー内での流れを複雑に分割する挙動を利用でき、高効率に攪拌が進行することが判明する一方、完全に中心を一致させた交差形状を用いる場合には、キャピラリー内での層流の特性によりミキシングの効率が比較的悪いことが示された。このような交差形状を簡便に作製できる唯一の手法は放射光を用いたディープ X 線リソグラフィーであり、我々はこれにより交差形状を任意に制御したマイクロミキサーの作製に成功した。ミキサーの性能を従来の構造と比較するために酵素反応を適用した結果、酵素反応の高速化が確認できた。これは、ミキサーが高効率化され、従来の交差形状を有さない構造により攪拌した場合よりも溶液を均一に攪拌する効果が得られたためと推測される。

高効率、かつ信頼性の高いマイクロミキサーは分析、合成等様々な応用面で非常に重要な流体素子であり、特に分析では均一に溶液を混ぜることによりデータの再現性や、検出感度そのものの上昇が期待できる。

(平成 20 年 5 月 23 日受付)

文 献

- (1) R. Yang et. al.: "A rapid micro-mixer/reactor based on arrays of spatially impinging micro-jets", *J. Micromech. Microeng.*, Vol.14, p.1345 (2004)
- (2) H. M. Xia et. al.: "Chaotic micromixers using two-layer crossing channels to exhibit fast mixing at low Reynolds numbers", *Lab. Chip.*, Vol.5, p.748 (2005)
- (3) E. Tamaki et. al.: "Single-Cell Analysis by a Scanning Thermal Lens Microscope with a Microchip : Direct Monitoring of Cytochrome c Distribution during Apoptosis Process", *Anal. Chem.*, Vol.74, p.1560 (2002)

- (4) R-H Horng et. al.: "PMMA-based capillary electrophoresis electrochemical detection microchip fabrication", *J. Micromech. Microeng.*, Vol.015, p.6 (2005)
- (5) Y. Utsumi, T. Asano, Y. Ukita, K. Matsui, M. Takeo, and S. Negoro : "Proposal of a new microreactor for vertical chemical operation", *J. Vac. Sci. Technol. B*, Vol.24, pp.2606-2611 (2006)
- (6) Y. Ukita, T. Asano, K. Fujiwara, T. Yokoyama, K. Matsui, M. Takeo, S. Negoro, T. Saiki, and Y. Utsumi : "Novel characteristics of multifunctional fluid filters fabricated by high-energy synchrotron radiation lithography", *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol.45, pp.7203-7208 (2006)
- (7) 内海裕一・浮田芳昭 : 「放射光 LIGA プロセスを用いた 3 次元マイクロ化学システムの開発」, *ケミカルエンジニアリング*, **15**, 11, p.32 (2007)
- (8) 藤原邦代 他 : 「多機能フィルターを用いた垂直流体操作の挙動予測と検証」, *電学論 C*, **127**, 2, pp.201-216 (2007-2)
- (9) Y.Ukita et. al.: "Application of vertical microreactor stack with polystyrene microbeads to immunoassay", *Sensors and Actuators A*. (2008) in press
- (10) E.W. Becker, W. Eherfeld, P. Hagmann, A. Maner, and D. Münchmeyer : "Fabrication of microstructures with high aspect ratios and great structural heights by synchrotron radiation lithography, galvanofarming, and plastic moulding (LIGA process)", *Microelectronic Engineering*, Vol.4, pp.35-56 (1986)
- (11) Y. Utsumi and T. Kishimoto : "Large area and wide dimension range x-ray lithography for lithographite, galvanofarming, and abforming process using energy valuable synchrotron radiation", *J. Vac. Sci. Technol. B*, Vol.23, pp.2903-2909 (2005)

近 藤 沙 妃

(非会員) 2008 年 3 月兵庫県立大学卒業 現在、兵庫県立大学大学院工学研究科機械系工学専攻博士前期過程在学中。

浮 田 芳 昭

(学生員) 2006 年 3 月兵庫県立大学大学院工学研究科機械系工学専攻博士前期過程修了。現在、兵庫県立大学大学院工学研究科博士後期課程在学中。日本学術振興会特別研究員 (DC2)。

藤 原 邦 代

(非会員) 2008 年 3 月兵庫県立大学大学院工学研究科機械系工学専攻博士前期過程修了。現在、総合研究大学院大学物理化学研究科構造分子科学専攻博士後期課程在籍中。

内 海 裕 一

(正員) 1984 年名古屋大学大学院工学研究科修士課程修了。同年、日本電信電話公社入社。物性科学基礎研究所主任研究員を経て、2000 年 3 月より兵庫県立大学・高度産業科学技術研究所 助教授。現在は流体デバイスを主とするナノ・マイクロシステム研究に従事。博士 (工学)。日米機械学会共催・材料プロセス国際会議 2002 (M&P2002) ベストポスター賞, 2003 年精密工学会ベストオーガナイザー賞等を受賞。