電気泳動用石英ガラス製マイクロチップの開発

正員 西本 尚弘 (島津製作所) 非会員 阿部 浩久 (島津製作所)
 非会員 叶井 正樹 (島津製作所) 正員 藤山 陽一 (島津製作所)
 正員 中西 博昭 (島津製作所) 非会員 荒井 昭博 (島津製作所)

Microfabricated Chips for Capillary Electrophoresis on Quartz Glass Substrates

Takahiro Nishimoto, Member (Shimadzu Corp.), Hirohisa Abe, Non-member (Shimadzu Corp.)
 Masaki Kanai, Non-member (Shimadzu Corp.), Yoichi Fujiyama, Member (Shimadzu Corp.)
 Hiroaki Nakanishi, Member (Shimadzu Corp.), Akihiro Arai, Non-member (Shimadzu Corp.)

Microchips for capillary electrophoresis have been fabricated in small size on quartz glass substrates. Microchannels with smooth sidewalls are etched by applying adopted etching condition. To fabricate quartz glass chips, we applied a novel bonding method with dilute hydrofluoric acid solution. Using fabricated microchips, we show that they permit to perform quantitative sample injection (several 10 pl or less), effective separation (the number of theoretical plates is over 2,500) and high speed analysis (~30 sec). In order to improve the detection sensitivity of UV absorbance method, we have developed the chips which have optical slit, and confirmed that the absorbance unit was improved about ten times.

キーワード：キャピラリー電気泳動，石英ガラス，マイクロマシニング

1. はじめに

近年、マイクロマシニング技術を用いてガラス基板上に微小流路を作製し、分析用チップとして用いる試みが多数発表されており、中でもチップ上で行う電気泳動に関する研究例が最も多い⁽¹⁾⁽²⁾。この理由は、バルブなどの流体制御部品が不要なためチップの構成が簡単であること、さらにチップ化することにより以下に示す非常に優れた特長をもつ電気泳動装置の実現が可能になるからである。

電気泳動チップは従来のキャピラリーと比較して、泳動によるジュール熱を効率良く放熱することができ、より強い電界中での泳動が可能となる。このため分析時間の短縮を図ることができる。また、チップ作製には半導体製造技術をベースとしたマイクロマシニング技術を用いるため、キャピラリーの長さ・深さ・幅、検出位置を μm 単位で精密に設定でき、分析再現性の向上が期待できる。さらに、十字にクロスさせた流路、マルチ流路、更に前処理用・後処理用反応容器の集積化等、流路デザインの自由度が大きい。例えば十字にクロスさせた流路においては一方をサンプル注入流路、他方を分析流路として用い、両方の流路に印加する電圧を適正にコントロールすることで、数十plという微量なサンプルを定量的に簡便に導入することが可能

である。これは、分析再現性の向上と共に、装置の自動化に大きく貢献すると考えられる。

電気泳動チップの材料としては、優れた化学的特性を持つこと、超高純度の材料供給が可能であることから石英ガラスが望ましい。また、石英製チップは検出方法として汎用性の高い紫外吸収検出法の適用が可能であるというメリットもある。ところが今までの電気泳動チップを用いた研究は、主にPyrex®ガラス基板を用いて行われてきた。これは、石英ガラスが高耐熱性材料であるため、熱融着による石英製チップの作製には1100℃以上の高温熱処理が必要であり、工程が困難であったことが1つの原因となっている。そこで我々は、石英ガラス同士をフッ酸水溶液を界面に介在させて接合する技術（以下、文中ではHF接合と呼ぶ）を開発⁽³⁾し、室温付近にて簡便に石英ガラス製チップを作製できるようにした。本報告では、電気泳動用石英ガラス製マイクロチップについて、その作製技術を中心に述べる。

2. 電気泳動チップの構成

図.1に今回作製した電気泳動チップの構成図を示す。幅 $50\mu\text{m}$ 、深さ $20\mu\text{m}$ の流路（図.1(b)）を形成した厚さ1mmの基板（ベースプレート）と、直径約1mmの貫通穴を形成

した基板（カバープレート）を接合することにより作製している。各々の流路の両端に配置された貫通穴は泳動液およびサンプルのリザーバとして機能する。図.2は電気泳動チップの外形および流路配置図である。12.5mm×35mm×1.2mmの外形を持つ基板に流路が形成されている。サンプル注入部からの分離用流路長さは25mm、各々のリザーバ容量は約1 μ lとなっている。

図.1 電気泳動チップの構成図
Fig.1. Structure of the micro CE chip.

図.2 電気泳動チップの流路配置
Fig.2. Layout of the microchip.

3. 作製プロセス

図.3に電気泳動チップ作製プロセスの概略を示す。作製用基板として、合成石英基板VAIOSIL®（信越石英製）を用いた。使用する基板の研磨状態は厳密にコントロールさ

れる必要がある。表面の研磨状態の優劣は流路形成エッチング時の異常エッチング、接合強度等に大きく影響するからである。異常エッチングとは研磨時の潜傷がエッチングによって拡大したもので、エッチピットとして観察される。図.4に例を示す。

- a) アニール処理を施した基板の上に厚さ300nmのSiをスパッタ成膜する。Si膜はこの後に行うガラスエッチング工程の保護膜となる。
- b) Si上にフォトリソをスピンコートし、パターンニングした後、フォトリソをマスクとしてSiのエッチングを行う。ここではSiエッチングにSF₆ガスを用いたRIE (Reactive Ion Etching) を適用している。
- c) パターンニングしたレジスト/Si膜を保護膜として、フッ酸水溶液中で石英ガラスのウェットエッチングを行う。Siマスクは、従来ガラスエッチングに用いられていた金属マスク (Au/Cr等) と比較して、ガラスとの密着性が優れたマスクを簡単な成膜工程で形成でき、これを用いれば良好な流路形状を得ることが可能である。ただし、Si膜に圧縮応力が残留している場合にはエッチングの進行に伴ってマスクに皺が生じ、結果として流路側壁に凹凸が生じる (図.5(a))。逆に引っ張り応力が残留している場合にはエッチングの進行に伴って流路幅が拡大してしまう (図.5(c))。成膜条件あるいは成膜後の熱処理条件を最適化して、残留応力を低減することにより、エッチング深さ:

図.3 電気泳動チップの作製プロセス
Fig.3. Fabrication sequence of the microchip.

図4 研磨キズによる流路側壁の異常エッチングの例
Fig.4. Abnormally etched sidewalls due to the defects caused by polishing.

図5 Siマスク応力のエッチング形状への影響
(基板裏面より観察)
Fig.5. Sidewall shape variations of etched channels under different conditions of etching mask (backside view).
(a) with residual stress -compress
(b) without residual stress
(c) with residual stress -tensile

図6 流路交差部のSEM像
Fig.6. SEM image of etched channels.

エッチング横広がり=1:1の滑らかな側壁を持つ流路が得られる (図.5(b), 図.6) 。ガラス用エッチャントとしてはフッ酸水溶液 (40~50%(w/v)) , フッ硝酸水溶液などが報告されている。今回の試作ではバッファードフッ酸 (BHF-U110, 佐々木化学) を用いた。高濃度のフッ酸水溶液と比較してエッチングレートは約1/10であり, エッチングに長時間を要するが, フォトリソ膜へのダメージが少ないため, エッチングマスクのピンホールに起因するエッチ

図7 希フッ酸を用いた基板接合
Fig.7. Bonding of quartz substrates with hydrofluoric acid.

図8 HF接合条件と接合強度⁽⁴⁾
Fig.8. Bonding strength variations under different conditions.

ピットの発生を防止することが可能である。37℃に加温した場合の石英ガラスに対するエッチングレートは約150nm/minであり、面内均一性にも優れている。また、エッチング面をAFM観察した結果、非常に平滑な面 ($R_a \sim 0.4\text{nm}$) が得られることを確認している。

d)レジスト、Siの順にエッチングマスクを除去した後、必要に応じてチップ単位にダイシングする。

e)カバープレートは、基板表面の保護のために両面をシートレジストで覆い、貫通穴のパターニングを行った後にサンドブラスト加工を行う。加工後のリザーバ穴形状は表側約1.4mm、裏側約1mmのテーパ状であり、サンプルや泳動バッファ導入の際の空気溜まりを生じにくい構造になっている。

f)流路を形成したベースプレート、貫通穴を形成したカバープレートを洗浄後に接合する。ここでの洗浄（接合前洗浄）は接合の歩留まりを左右する重要な工程である。界面活性剤、有機溶剤、酸による洗浄を超音波を組み合わせ、表面の汚れ、ゴミを取り除く。接合には図.7に示す希フッ酸を用いた接合方法を用いた。この接合方法の特長として、室温での接合が可能であること、簡単な手順・装置での接合が可能であることが挙げられる。接合時のフッ酸濃度、接合時の温度、荷重によって接合強度は変化する（図.8）⁴⁾。今回の試作では1%フッ酸、室温、荷重1.3MPaの条件で接合した。この場合の接合強度は約7MPa程度であり、電気泳動用チップとして使用するのに十分な強度を有している。

4. 電気泳動チップの評価

作製した電気泳動チップの基礎特性の評価には、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⁴⁾。アルゴンレーザー（488nm, 15mW）で励起し、フィルターで励起光をカットした後に光電子倍增管で検出している。レーザー光のスポット径はチップ上で約10 μm である。また、流路内の流れを観察するときには外部より固体ブルーレーザー（島津製作所製：HK5510、波長：473nm）をチップに照射（スポット径約1mm）し、観察するとともにCCDカメラにより記録した。

<4.1>印加電圧の制御 これまでに報告されているように⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁵⁾、サンプル導入用流路と分離用流路に加える電圧を切り替えて流路クロス部のサンプルを分離用流路に導くことで、定量性の良いサンプル注入を可能としている。実際には単純な切り替えだけではサンプル導入時には分離用流路への拡散、分離時にはサンプル用流路からの流入が起こるため、これらを防止するための電圧コントロールを行い、クロス部のサンプルの一部を分離用流路に導入することが必要である。サンプルの拡散が抑えられている様子を

図.9(a)に、このサンプルプラグが切り離されて分離用流路に導かれた様子を図.9(b)に示す。

図.9 サンプルの拡散を防ぐ電圧コントロールの例

(a)サンプル導入

(b)サンプルプラグ"切り出し"

Fig.9. Voltage control for preventing the diffusion of the sample plug.

(a) sample loading

(b) formed "sample plug"

<4.2>分析例 図.10に、蛍光試薬であるfluoresceinとcalsceinの混合物を石英製チップで分離した例を示す⁴⁾。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。この場合の理論段数は約2500段であった。

図.10 5 μM のFluoresceinとCalceinの Electropherogram

Fig.10. Electropherogram of 5 μM fluorescein and calcein using quartz chip.

5. 吸光度検出用スリット付きチップ

石英製チップを用いる最大のメリットは、検出法として汎用性のあるUV吸収による吸光度検出の適用が可能なこと

である。吸光度検出のリニアリティ、S/Nを考慮すると、流路を通過した光のみを検出器に導き、それ以外の光は検出器に入射する前に遮ることが望ましい。そこで我々は図.11(b)に示すスリット付きチップについて検討した。

このスリットにはガラスエッチング用のマスクとして用いたシリコンを除去せずにそのまま用いている。作製工程はスリットを形成しないチップとはほぼ同様であり特に煩雑な工程ではないが、比較的表面粗さの大きい ($R_a \sim 2\text{nm}$) シリコン膜と石英ガラス (通常 $R_a \sim 0.2\text{nm}$) の接合が必要となる。ここではシリコン膜表面を酸化した SiO_2 層と石英ガラス基板をHF接合することによりこの構造を実現している。直接接合と比較して、HF接合の場合は表面粗さに対するマージンが大きいので、このような構造においても接合が可能である。

図.11 スリット付きチップによる迷光低減の概念図
Fig.11. Concept of the stray light reduction using a chip with optical slit.

試作したチップを用いてサンプルの濃度を変化させた場合の吸光度を評価した結果を図.12に示す。スリットなしのチップと比較して約10倍程度の吸光度が得られている。今回試作したスリット付きチップでは、光源や検出器などの光学系に対してチップの位置合わせが容易であるという特長も併せ持っている。

6. まとめと考察

石英ガラス基板を材料とした電気泳動用マイクロチップについて、その作製方法を中心に述べた。また、石英製チップの特長を活かす検出法である吸光度検出の効率を上げるためのスリット付きチップについてもその基礎的な評価結果を評価し、スリットなしのチップと比較して10倍程度の信号が得られることを報告した。チップを用いた分析に関しては本文中で報告したデータの外、10 μl 程度のサンプルを精度良く定量的に注入できる事、従来のキャピラリーと比較して良好な熱放散特性を持つこと⁹⁾を確認している。図.9に示した電圧コントロールについての詳細例は参考文献⁹⁾を参照されたい。理論段数については改善のため

図.12 スリットの有無による吸光度の比較
サンプル: Urasil

($\epsilon = 6980 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\lambda = 254\text{nm}$)

Fig.12. Comparison of absorbance between the cells with and without optical slits.
sample: Urasil

の検討中である。

現在、流路内面処理法とその効果⁶⁾、微小リザーバで起こる電気分解の影響⁶⁾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の研究、さらに分離性能および分析再現性の向上を目的として、ウェハ面内の複数個のチップを用いた泳動時間のばらつき評価⁶⁾、流路内面のシラノール基の存在と電気浸透流、泳動特性との関係についての研究を継続中である。

謝辞

本報告の成果の一部は早稲田大学理工学部電子・情報通信学科・庄子教授との共同研究によるものである。チップ作製全般に互り有益な示唆をいただいた庄子教授と、HF接合条件について膨大な実験データを提供していただいた庄子研究室の方々に感謝の意を表します。

(平成11年2月16日受付)

文献

- (1) D. J. Harrison, K. Fluki, K. Seiler, Z. FAN, C. S. Effenhauser, A. Manz: Science, 261 (1993), 895-897
- (2) D. J. Harrison, Z. FAN, K. Seiler, A. Manz, H. M. Widmer: "Rapid separation of fluorescein derivatives using a micromachined capillary electrophoresis system", Anal. Chim. Acta, 283, (1993), 361
- (3) H. Nakanishi, T. Nishimoto, N. Nakamura, S. Nagamachi: "Fabrication of Electrophoresis Devices on Quartz and Glass Substrates Using a Bonding with HF Solution", IEEE MEMS'97 Proceedings (1997), 299

- (4) T. Nishimoto, H. Nakanishi, H. Abe, A. Arai, R. Nakamura, A. Yotsumoto, S. Shoji: "Microfabricated chips for capillary electrophoresis on quartz glass substrates using a bonding with hydrofluoric acid", *Proceedings of the μ TAS'98 Workshop*(1998), 311-314
- (5) 中西博昭・阿部浩久・西本尚弘・荒井昭博: 「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」 *分析化学*, 47(6), 361-368(1998)
- (6) 阿部浩久・西本尚弘・叶井正樹・中西博昭: 「電気泳動用チップ-微小リザーバにおける電気分解の影響について」, 第18回キャピラリ電気泳動シンポジウム講演要旨集, 45(1998)

西本 尚弘

(正員) 1965年6月2日生まれ。1989年京都大学理学部物理学科卒業。同年(株)島津製作所に入社。主としてシリコンおよびガラスを材料としたマイクロマシニング技術に関する研究に従事。現在(株)島津製作所基盤技術研究所(けいはんな)センサデバイスグループ所属。応用物理学会会員。

阿部 浩久

(非会員) 1961年10月10日生まれ。1986年北海道大学理学研究科修士課程修了。1988年(株)島津製作所に入社。細胞培養カプセル、抗体診断薬、遺伝子検査の研究を経て、現在はチップ電気泳動技術に関する研究に従事。(株)島津製作所基盤技術研究所(けいはんな)センサデバイスグループ所属。

叶井 正樹

(非会員) 1972年3月2日生まれ。1997年大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻修士過程修了。同年(株)島津製作所に入社。主としてシリコンおよびガラスを材料としたマイクロマシニング技術に関する研究に従事。現在(株)島津製作所基盤技術研究所(けいはんな)センサデバイスグループ所属。

藤山 陽一

(正員) 1962年5月9日生まれ。1986年京都大学工学部工業化学科卒業。同年(株)島津製作所に入社。主としてシリコンおよびガラスを材料としたマイクロマシニング技術及び磁気センサ作製技術に関する研究に従事。現在(株)島津製作所基盤技術研究所(けいはんな)センサデバイスグループ所属。日本応用磁気学会、日本AEM学会会員。

中西 博昭

(正員) 1960年3月15日生まれ。1984年大阪大学基礎工学部生物工学科卒業。同年(株)島津製作所に入社。高エネルギーイオン注入技術を中心としたイオン工学技術、シリコンおよびガラスを材料としたマイクロマシニング技術に関する研究に従事。現在、(株)島津製作所基盤技術研究所主任研究員。平成10年度より、奈良先端科学技術大学院大学客員助教授を併任。次世代センサ協議会会員。

荒井 昭博

(非会員) 1960年3月5日生まれ。1983年同志社大学工学部化学工学科卒。1990年(株)島津製作所に入社後、分析装置の開発に従事。現在、分析機器事業部LC部所属。