

# マイクロ流路デバイス

火原 彰 秀

## 1 はじめに

マイクロ加工の分離への応用の歴史は比較的長く、半導体製造技術とともに発展中であったマイクロ加工技術を利用したシリコンウェハ上のガスクロマトグラフィーデバイスが、1979年に発表されている<sup>1)</sup>。このデバイスでは、光リソグラフィとシリコン湿式エッチングにより流路構造（インジェクター・分離カラムなど）を作製し、追加工によりバルブや熱伝導度検出器を組み込んでいる。4インチウェハ上に幅 200 μm・深さ 30 μm の分離カラム流路を、らせん状に 1.5~3.0 m 加工して、理論段数 1000 程度の分離を達成している。ガスクロマトグラフィーとしては分離性能がもの足りないものの、マイクロ加工による分析技術集積化という意味で非常に先進的かつ独創的な研究である。

分離性能を議論するとき、いわゆる理論段高  $H$  と流速  $u$  に関する van Deemter 式<sup>2)</sup>

$$H = A + B/u + Cu \dots\dots\dots (1)$$

が用いられることが多い。ここで右辺各項は、

A 項：流路長多様性によるバンド拡がり（渦拡散）等

B 項：流速方向の拡散拡がり

C 項：移動相・固定相間の平衡（遅さ）による拡がり  
を表している。

1990年、日立（その後 Ciba-Geigy ほか）の Manzら<sup>3)</sup>は、シリコンマイクロ加工により、幅 8 μm・深さ 2 μm・長さ 6.4 cm のような液体クロマトグラフィー用カラム数種類を加工した結果を示している。アイデア段階では、

A 項：オープン流路なので渦拡散なし

B 項：流速設定により十分小さな拡散拡がり

C 項：短拡散距離で十分早い平衡

を達成でき、高速・高性能分離が実現可能と目論んだ。しかし、当時の周辺技術では分離は報告されていない。

分離法を含む様々な分析法が集積化できることは、その後の発展が証明している。マイクロ流路デバイスがど

のように作製され、分離に利用されるのかを紹介する。

## 2 加工法

ナノサイズ・マイクロサイズの構造をつくるには多種多様な手法がある。

例えば、光リソグラフィ・湿式エッチングは、マイクロメートルサイズの加工に多く用いられる。プロセスの例を図 1 に示す<sup>4)</sup>。金属層および紫外線照射によって溶媒耐性が変化する高分子層（光レジスト）が塗布されたガラス基板に対して、電子線描画法などで作製したパターンをもつ光マスクを通して紫外光を照射すると、露光部のみが現像溶媒によって除去されるようになる。現像後に露出した基板保護用の金属膜を除去し、フッ化水素酸（HF）水溶液によりガラスをエッチングする。HF 水溶液によるガラスエッチングは等方エッチングであるため、ガラス露出部からエッチングが等方的に進行する。加工深さと同程度の幅が転写したパターンより広がる。最後に上板接着することにより、流路構造として電気泳動等の分析に用いる。

その他の代表的加工法に、厚膜レジストにより鋳型を作り、シリコンゴムの一種であるポリジメチルシロキサン（PDMS）を硬化させる「ソフトリソグラフィ」<sup>5)</sup>がある。必要な機材が少なく、比較的低廉に加工を行うこ

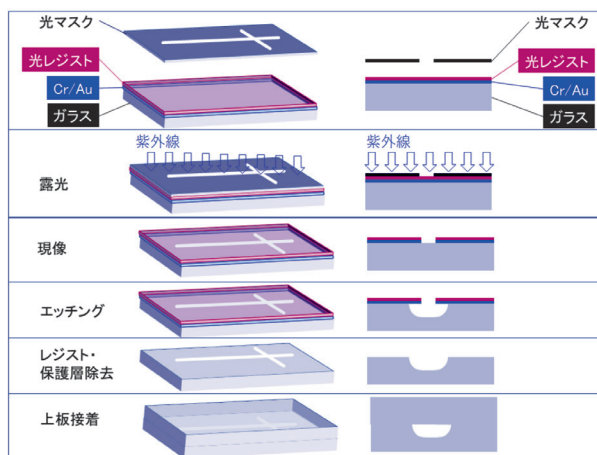


図 1 光リソグラフィ・湿式エッチングによるマイクロ加工の概要 (Ref. 4)

Microfluidic Devices.

とができる点で優位性がある。この例のような低廉な実験器具によりマイクロ流路デバイスを作製するような Do-It-Yourself 的研究も、この分野では広く受け入れられている<sup>6)</sup>。

### 3 電気泳動

1990 年代の科学界の大きな話題の一つはヒトゲノム計画 (HGP) であった<sup>7)</sup>。30 億塩基対の全塩基配列を明らかにしようとする野心的な計画であり、ヒトの設計図を手にする利益は様々な方面に影響すると期待された。この計画の副産物として当初より見込まれていた成果に、ゲノム情報解析、特に塩基配列を決定するシーケンシング法の高速化・低廉化がある。ゲノム解析、その基幹技術としての分離技術が汎用化することによる、生命化学・医療などへの波及が当初より期待されていた。DNA シーケンシングに関しては、キャピラリーゲル電気泳動 (CGE) を中心に研究がすすんだ<sup>8)9)10)</sup>。実際並列キャピラリー電気泳動シーケンサーの上市により HGP は急速に進展し、2003 年に全ドラフトデータの発表に辿り着いた<sup>11)</sup>。そのような折、1993 年から 1994 年、前述の Manz のグループ<sup>12)</sup> および Ramsey のグループ<sup>13)14)</sup> からマイクロ流路デバイスを用いた電気泳動チップが提案された。ここでは、マイクロチップ電気泳動にかかわる基礎的事項と、特性について述べる。

簡単のためにガラス管 (キャピラリー) やガラス製電気泳動チップのような流路に中性水溶液を満たした状況を考える。ガラス表面のゼータ電位 ( $\zeta$  電位) は  $-20$  から  $-50$  mV 程度の負の値が報告されている。このような状況で流路に電位を印加して陽極から陰極に向けた電場  $E$  とすると、陰極側に向かって電気浸透流 (EOF) が発生する。その陽極から陰極に向けた速度  $v_{EOF}$  は、

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E \dots\dots\dots (2)$$

と表される。ここで、 $v_{EOF}$  は電気浸透流移動度で  $v_{EOF} = \epsilon\zeta/4\pi\eta$  ( $\epsilon$ : 誘電率,  $\eta$ : 粘度,  $\zeta$ : ゼータ電位) で表される。水溶液中の電気泳動移動度を  $\mu E$  とし、電気浸透流中での電気泳動速度は  $v_E = \mu_E E$  (カチオンで  $v_E$  が正, アニオンで  $v_E$  が負になるように符号をとる) となり、正味の速度  $v_{Total}$  は

$$v_{Total} = v_{EOF} + v_E \dots\dots\dots (3)$$

と表される。中性分子は EOF と同じ速度、カチオンは EOF よりも早く、アニオンは EOF よりも遅く流れる。

マイクロチップ電気泳動では、図 2A のように EOF を利用した流れにより、十字交差点に試料溶液を導入し、流路幅程度の試料バンドを分離チャンネルに送ることで、インジェクションを達成する。図 2B は、マイクロチップ電気泳動の結果の例である。この例では、ローダミン B とスルホローダミンを、十字交差点から 33 mm

(上), 66 mm (中), 165 mm (下) の点で蛍光検出している。わずか数十秒程度でベースライン分離が出来ていることが分かる。

図 2C は、クロマトグラフィーの様式に倣って、理論段高  $H$  を図 2B の検出点 33 mm の条件で計算した例である。理論段高は下記の様に表される。

$$H = H_{inj} + H_{det} + H_{geo} + H_{diff} \dots\dots\dots (4)$$

$H_{inj}$  は試料導入幅に起因する項であり、この項が十分小

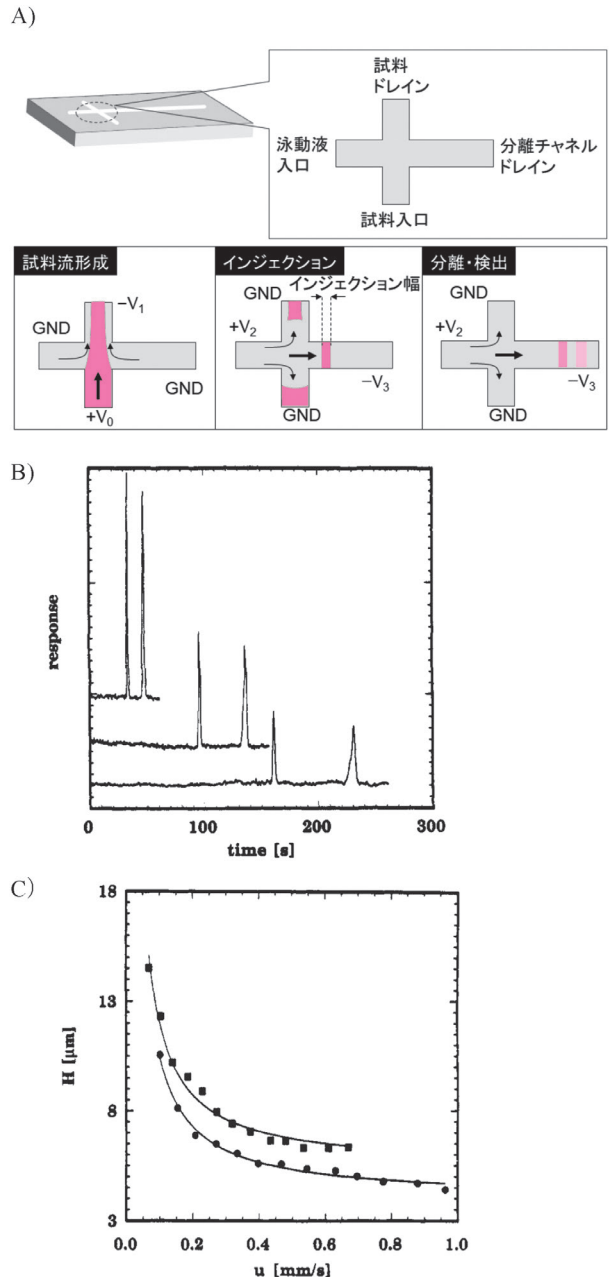


図 2 A) 電気泳動マイクロ流路形状と、十字型試料導入、高速分離のイラスト。試料導入の電圧設定は一例。B) マイクロチップ電気泳動の例。ローダミン B とスルホローダミンを分離・検出している。C) B の実験の理論段高さ

Reprinted with permission from Ref. 14. Copyright 1994 American Chemical Society.

さいことがマイクロチップ電気泳動の大きな特徴である。  $H_{det}$  は検出窓の幅に起因する項で蛍光画像検出の場合十分小さく出来る。  $H_{geo}$  は、分離流路に折り返し構造などを設置する場合など、流路構造に起因してバンド幅が広がる項でクロマトグラフィーにおける多流路拡散に相当するが直線流路を想定する場合は考えなくてよい。この3項が式(1)のA項に相当するが、試料導入・検出・分離流路構造を工夫することで十分小さくすることが可能である。

$H_{diff}$  は式(1)のB項に相当し、試料バンドを小さくしたことにより、相対的に大きな項をもつ。図2Cのように1 mm/sより試料の速度が遅いとき、速度の上昇とともに急激に  $H_{diff}$  が小さくなる。ゲルを用いないオープン型の電気泳動では、C項は存在しない。図2Cに示すように理論段高として5  $\mu\text{m}$  も可能で、これは200,000 plate/mであり、高い分離性能をもつといえる。

試料バンド幅を小さくするアプローチは大変有効であるが、ゲル電気泳動は例外となる。ゲル電気泳動では、溶液-ゲル間の試料導入部で試料濃縮がおこるため、マイクロ流路試料導入法は利点となりにくく、DNAシーケンクスとしてはCGEが主役の座を占め続けた。

電気泳動にマイクロ流路を用いる利点のもう一つはデザイン性である。試料導入部の工夫により、試料プラグより先にミセル溶液プラグを導入することで過渡的に試料をミセル内に濃縮し、分離するミセル導電クロマトグラフィー(MEKC)のような分離能を高める操作も可能である<sup>15)</sup>。

ナノ加工を用いてデザインされた分離空間を作製することも可能である。数百ナノメートルレベルの空間分解能で、規則配置をもつナノピラー構造は、ゲルの網目を人工的にデザインして加工したものと見なすことができる<sup>16)</sup>。ナノピラーの配置や流れに対する角度などを変更することにより、短鎖から長鎖のDNAの分離をデザインできるという意味でマイクロチップ電気泳動特有の分離といえる。

ナノ構造と電気泳動(電場印加)の組合せをより積極的に利用して、特異的試料濃縮を実現することもできる(図3)<sup>17)</sup>。前述のようにガラス表面は負に帯電している。流路深さを十ナノメートル程度まで小さくすると、ガラスに接触した液相に形成される(正電荷過剰な)電気二重層が流路全体を占める。深さが十分ある場合に表面から十分離れた部分に存在する中性溶液部が存在しない。この接続部に電位差を印加すると、カチオンは電気二重層部のカチオンとの入れ替えによりナノ流路部を通過できるが、アニオンはここに入れないため、ナノ流路部は一種のカチオンフィルタとして作用する。拡散や対流によるカチオン供給よりも速くカチオンを接続部から泳動させると、接続部のマイクロ流路側にカチオン欠乏層(脱塩層)が形成される。電気的中性を維持するため

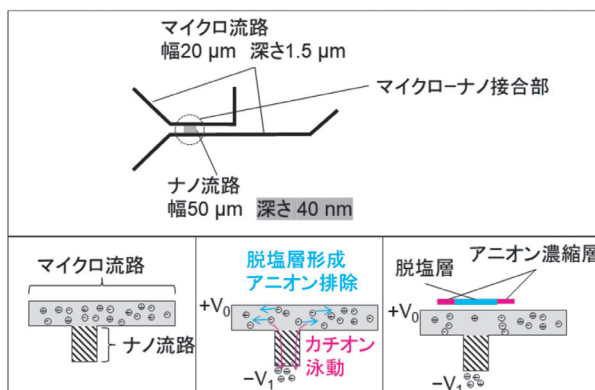


図3 マイクロ流路-ナノ流路接続構造におけるイオン欠乏層および帯電液相による試料濃縮法の原理図

Reprinted with permission from Ref. 17. Copyright 2005 American Chemical Society.

アニオンは、マイクロ流路方向にこの欠乏層から排除される。以上の過程を経て、マイクロ・ナノ接続部に形成された脱塩部の両側にアニオン(試料)濃縮部が形成される。接続構造や印加電位パターンの設計により百万倍の前濃縮も可能となる方法であり、マイクロ流路チップの前濃縮法として用いられる。

#### 4 液体クロマトグラフィー

マイクロ加工を用いた導入試料バンドの制御は、液体クロマトグラフィーでも有効である。図4は3.5  $\mu\text{m}$ あるいは5.0  $\mu\text{m}$ 径粒子が充填された分離カラムをもつポリイミドフィルム製マイクロ流路デバイスである<sup>18)</sup>。液体導入コネクタ部の工夫により試料導入バンドを小さくし、カラム出口がエレクトロスプレーイオン化用tipとなっているため検出による拡がりもほとんど考慮に入れなくてよい。ナノ流路の複数の出入口にマイクロ流路を接続し、その流路内流体圧力を空圧制御することにより、十字ナノ流路で、マイクロチップ電気泳動と同様の試料導入を実現した例もある<sup>19)</sup>。

この例だけでなく、周辺機器を含めた集積化による可搬型クロマトグラフィーシステムなどが多く実現している<sup>20)</sup>。

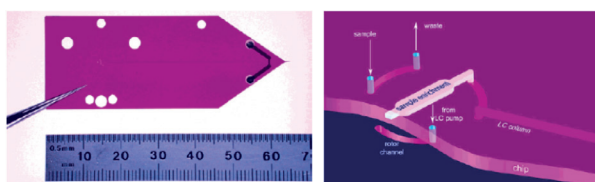


図4 ポリイミドフィルムに作製した粒子充填型液体クロマトグラフィーチップ。

Reprinted with permission from Ref.18. Copyright 2005 American Chemical Society.



## 5 その他の特徴的分離法

電気泳動・クロマトグラフィー以外にも、マイクロ流路構造の特徴を活用した様々な分離法が提案されている。ここではその代表的な数例を紹介する。

### 5.1 水力学ろ過法

まず、水力学ろ過法の概要を図5に示す<sup>21)22)</sup>。マイクロ流体内の圧力駆動流では、極端な条件としない限り、流れのレイノルズ数が小さく、慣性よりも粘性の強いことを特徴とする層流となる。層流では、流路中心部の流速が大きく、壁面では流速がゼロとなる。

層流中をマイクロ粒子が流れる状況を考えると、ある粒子の速度は、その粒子中心の座標での層流流れに乗って移動するとみなせる。壁面付近のマイクロ粒子は、粒子が有限の大きさをもつため、粒子中心は粒子半径以上には壁面に近づくことはできない。より大きな半径をもつ粒子の中心は、より壁面から離れた位置にしか存在し得ない。

ここで、図5のような左から流れてきて、右と上に分かれる分岐マイクロ流路を考える。上へ排出されるマイクロ流路の流路抵抗を、流路長さや流路幅で調整すると、上と右への流量比 ( $Q_1/Q_0$ ) を設計できる。層流の流速分布すべてを積分した流量に対し、壁面から黒塗りになった部分の積分流量が、前述の流量比になるように

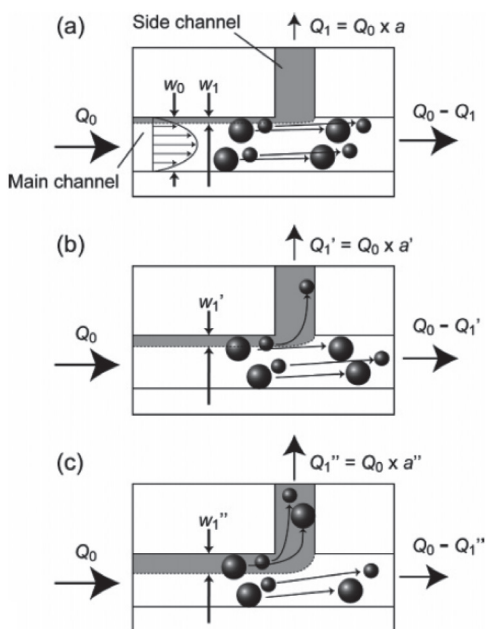


図5 水力学ろ過法による粒子分級法の原理図

(a) サイド流路への流量が少なく粒子が全てメイン流路に流れる場合。(b) サイド流路への流量が中程度で小粒子はサイド流路へ大粒子はメイン流路へ分離される場合。(c) サイド流路への流量が多く小粒子・大粒子ともにサイド流路に流れることが可能な場合。 Reprinted with permission from Ref. 22. Copyright 2006 American Chemical Society.

分岐が起こる。このとき、この黒塗り部分に粒子中心が存在する粒子は上へ分岐され、それ以外の粒子は右に分岐される。黒塗り部分の幅よりも粒子半径が小さな粒子は、偶然により（あるいは意図的な操作により）、粒子中心がこの上への分離ゾーンに入り得る。これに対して、黒塗り部分の幅よりも粒子半径が大きな場合は、粒子中心がこの分離ゾーンに入り得ないため、決定論的に右流路に輩出される。この粒子分級原理は、マイクロ流体の構造により流量比、つまり粒子分級設定値を設計できるため、マイクロ流体特有の分離原理といえる。

### 5.2 マイクロ水滴選択濃縮法

マイクロ流体デバイスの分析化学応用が研究されている技術の一つにマイクロ水滴がある。マイクロ空間で油や気液の二相操作を行う場合、表面張力が支配的な力となることが多く、この原理を利用すると均一系のマイクロ水滴を形成することができる<sup>23)</sup>。マイクロ水滴は、分子・粒子・細胞などを閉じ込めた孤立水相であり、並列実験を行う場として、デジタルPCR<sup>24)</sup>など様々な化学・バイオ分析に利用可能であるが、外部有機相との物質の出入りの制御は困難である。

図6Aに示すように、固定したマイクロ水滴の周りに中性界面活性剤逆ミセルを流すと、逆ミセル中の親水空間にマイクロ水滴から溶媒である水が分配して、水滴の縮小がおこる<sup>25)26)</sup>。このとき溶質は、その化学的性質や分子量にしたがって分配されるため、分配を適切に設計することにより、分配を通したマイクロ水滴選択濃縮法が実現する<sup>27)</sup>。

マイクロ水滴選択濃縮法に用いるマイクロ流体デバイスを図6Bに示す。幅広のマイクロ流路の天井部分に複数個のウェル構造を配置する。試料水溶液を導入すると、マイクロ流路とウェルがすべて満たされる。次に有機層を導入すると、ウェル構造部分に水相が残り、マイクロ流路部分に有機相が導入される。ここに中性界面活性剤逆ミセルを含む有機相を流すと、水相がマイクロ水滴となり、分離濃縮がはじまる。図6B下部には、マイクロ水滴中の溶媒である水が、逆ミセルに分配してマイクロ水滴が縮小していく様子が示されている。マイクロ水相体積は、直径縮小の三乗に従って縮小している。図6Cには、この水滴縮小に伴う、溶質ローダミン123の分配の様子を示している。有機相の流速、つまり固定されたマイクロ水滴近傍を逆ミセルが通過する時間に依存して、溶質が濃縮して濃度上昇するか、逆ミセル側に分配して濃度低下するかが異なる。この現象は、ミセルに分配した水と溶質から算出したミセル内溶質濃度と、マイクロ水滴側の溶質濃度の平衡により説明される。分配過程が速度論的であるため、現象・操作としては濃縮と希釈が制御できる。この例のように、マイクロ流体の構造や安定した流れを利用して、溶質・溶媒両方の分配を

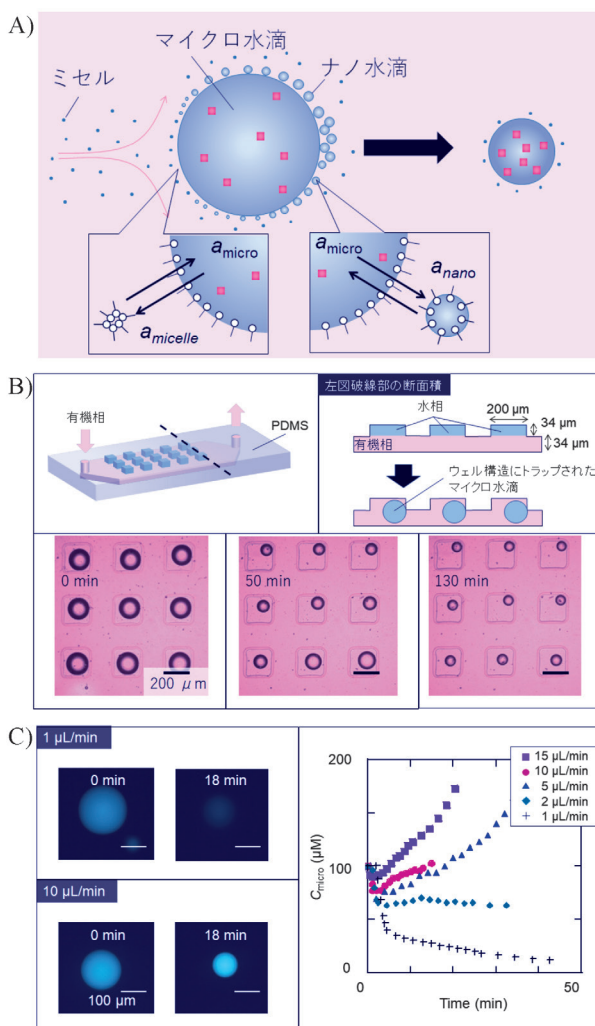


図 6 A) 油中マイクロ水滴と油中逆ミセル内部親水空間 (水相) の間の溶質・溶媒分配を利用する選択的濃縮分離法の原理図。B) 複数のウェルを設置した幅広マイクロ流路を用いる油中水滴生成デバイスと、水の逆ミセルへの分配を利用した試料濃縮 (水滴縮小) の写真。C) 溶質の逆ミセルへの分配速度を利用したマイクロ水滴内溶質の希釈・濃縮の制御

Reprinted with permission from Ref. 27. Copyright 2017 American Chemical Society.

制御し、選択的濃縮を実現できる特異な手法であるといえる。

## 6 おわりに

ナノサイズ流路を含むマイクロ流体デバイスは、複数原理の集積化や、大きさに基づく分離など、デバイスならではの分離を実現可能である。さらに高い生産性や可搬性などにより、個別診断やオンサイト分析などの分析イノベーションの中心に今後も利用されるであろう。

本稿では、分析化学の既存概念を打ち破り、分野に新しい風を吹き込んだ手法を取り上げ、その原理を中心に説明してきた。ここで紹介したもの以外にも多くの分離法がマイクロ流路デバイスを利用して提案されている。今後の発展に期待頂くとともに、この分野に参入する

研究者が増えることを期待する。

## 文 献

- 1) S. C. Terry, J. H. Herman, J. B. Angell : *IEEE Trans. Electron Devices*, **26**, 1880 (1979).
- 2) 宗林由樹監訳, 岩本俊一訳: “ハリス分析化学 原著 9 版 (下)”, p768, (2017), (化学同人).
- 3) A. Manz, Y. Miyahara, J. Miura, Y. Watanabe, H. Miyagi, K. Sato : *Sensors Actuators B Chem.*, **1**, 249 (1990).
- 4) A. Hibara, S. Iwayama, S. Matsuoka, M. Ueno, Y. Kikutani, M. Tokeshi, T. Kitamori : *Anal. Chem.*, **77**, 943 (2005).
- 5) D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides : *Anal. Chem.*, **70**, 4974 (1998).
- 6) J. H. Shin, S. Choi : *Sensors Actuators B Chem.*, **347**, 130624 (2021).
- 7) J. D. Watson : *Science*, **248**, 44 (1990).
- 8) Y. Baba, N. Ishimaru, K. Samata, M. Tshako : *J. Chromatogr. A*, **653**, 329 (1993).
- 9) S. Takahashi, K. Murakami, T. Anazawa, H. Kambara : *Nucleic Acids Res*, **66**, 2038 (1994).
- 10) N. J. Dovichi : *Electrophoresis*, **18**, 2393 (1997).
- 11) F. S. Collins, M. Morgan, A. Patrinos : *Science*, **300**, 286 (2003).
- 12) D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, A. Manz : *Science*, **261**, 895 (1993).
- 13) S. C. Jacobson, R. Hergenroder, L. B. Koutny, J. M. Ramsey, R. J. Warmack : *Anal. Chem.*, **66**, 1107 (1994).
- 14) S. C. Jacobson, R. Hergenroder, L. B. Koutny, J. M. Ramsey : *Anal. Chem.*, **66**, 1114 (1994).
- 15) K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka : *Anal. Chem.*, **80**, 1255 (2008).
- 16) N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi, Y. Baba : *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 948 (2010).
- 17) Y. C. Wang, A. L. Stevens, J. Han : *Anal. Chem.*, **77**, 4293 (2005).
- 18) H. Yin, K. Killeen, R. Brennen, D. Sobek, M. Werlich, T. Van De Goor : *Anal. Chem.*, **77**, 527 (2005).
- 19) T. Tsukahara, K. Mawatari, A. Hibara, T. Kitamori : *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**, (2008).
- 20) A. Ishida, M. Fujii, T. Fujimoto, S. Sasaki, I. Yanagisawa, H. Tani, M. Tokeshi : *Anal. Sci.*, **31**, 1163 (2015).
- 21) M. Yamada, M. Seki : *Lab Chip*, **5**, 1233 (2005).
- 22) M. Yamada, M. Seki : *Anal. Chem.*, **78**, 1357 (2006).
- 23) S. Y. Teh, R. Lin, L. H. Hung, A. P. Lee : *Lab Chip*, **8**, 198 (2008).
- 24) P. L. Quan, M. Sauzade, E. Brouzes : *Sensors*, **18**, 1271 (2018).
- 25) M. Fukuyama, A. Hibara : *Anal. Chem.*, **87**, 3562 (2015).
- 26) M. Fukuyama, A. Hibara : *Bunseki Kagaku*, **65**, 57 (2016).
- 27) M. Fukuyama, A. Hibara, Y. Yoshida, K. Maeda : *Anal. Chem.*, **89**, 9279 (2017).



火原 彰秀 (Akihito HIBARA)

東京工業大学理学院 (〒152-8550 東京都目黒区大岡山 2-12-1-W4-19)。東京大学工学部化学生命工学科卒業。東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻博士課程中退。博士 (工学)。《現在の研究テーマ》マイクロ流体を用いる分析化学、マイクロ気液界面レーザー計測法など。《趣味》スポーツ観戦。

E-mail : hibara.aa@m.titech.ac.jp