

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3762794号

(P3762794)

(45) 発行日 平成18年4月5日(2006.4.5)

(24) 登録日 平成18年1月20日(2006.1.20)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A
C 1 2 N 11/02 (2006.01)	C 1 2 N 11/02
C 1 2 N 11/14 (2006.01)	C 1 2 N 11/14
G O 3 F 7/26 (2006.01)	G O 3 F 7/26
H O 1 L 21/308 (2006.01)	H O 1 L 21/308 Z

請求項の数 3 (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平10-510436	(73) 特許権者	504324844
(86) (22) 出願日	平成9年8月22日(1997.8.22)		クロンディアグ チップ テヒノロギーズ
(65) 公表番号	特表2000-517177 (P2000-517177A)		ゲーエムペーハー
(43) 公表日	平成12年12月26日(2000.12.26)		ドイツ連邦共和国 デー—07749 イ
(86) 国際出願番号	PCT/EP1997/004589		エナ ローブシュテッター シュトラーセ
(87) 国際公開番号	W01998/008145		103-105
(87) 国際公開日	平成10年2月26日(1998.2.26)	(74) 代理人	100061284
審査請求日	平成14年5月31日(2002.5.31)		弁理士 斎藤 侑
(31) 優先権主張番号	19634122.1	(74) 代理人	100088052
(32) 優先日	平成8年8月23日(1996.8.23)		弁理士 伊藤 文彦
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)	(72) 発明者	エルマントラウト, オイゲン
			ドイツ連邦共和国 デー—07745 イ
			エナ ミューレンシュトラーセ 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微細システム技術や微細構造形成における薄層に微細構造を形成させる方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

微細システム技術や微細構造形成における薄層に微細構造を形成させる方法であって、所定の薄層に選択的に作用し、同時に添加される少なくとも二つの生物由来触媒及び／又は酵素とを含む溶液を添加する段階を含み、

前記少なくとも二つの生物由来触媒及び／又は酵素は構造を付与すべき層システムの層の順序に依存して選択され、インヒビター又は競合物質を添加することにより、前記少なくとも二つの生物由来触媒及び／又は酵素が、複数の層からなる層システムにおいて互いに異なる層に作用し、且つ、交互に、次々と又は同時に選択的な活性作用を示すようになっていることを特徴とする方法。

【請求項2】

前記インヒビター又は競合物質は、構造を付与すべき薄層への内部組込み又は付着により添加されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記同時に添加される生物由来触媒及び／又は酵素は、それらの選択的な作用が構造を付与すべき層システムの層の順序に依存してそれぞれ異なる温度で行われるように選択されることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、微細システム技術及び微細構造の幅広いアプリケーションにおいて必要とされ

る、微細構造を形成させるための新規な方法に関する。加えて、本発明の方法における浴（バス）は今まで前記分野において一般的ではなかった層又は層システムに対して構造を付与することも可能である。従来のエッチング剤を使用したのでは化学的な性質が似ているために選択的な構造付与が困難な場合や、エッチングバリアを取り付ける等の費用のかかる手段を補助的に行使しなければ構造付与が不可能な層システムに構造を付与する場合に、本発明を特に有利に利用することができる。

【0002】

微細構造形成において、技術水準に基づいて従来採用されてきたエッチング工程と現像工程は、基本的には、例えば強酸、アルカリ液、又は酸化剤等、健康に悪影響をもたらす有害な化学薬品の使用に基づくものであり、あるいは、反応性のイオンエッチング、すなわちプラズマエッチングのように法外なコストの掛かる工程を経たりしなければならない（B▲u▼ttgenbach, Mikromechanik, B.G. TeubnerStuttgart, 1994参照）。

10

【0003】

本発明は、微細構造を形成させるための公知の方法と比較してコスト面でより有利な、且つ、処理に際して環境にとってより好都合な方法となるような、微細構造を形成させるために新規な方法を提供するという課題をその根底に置くものである。

【0004】

前記課題は、請求項1に記載する代表的特徴によってその解決が図られる。その有利な実施形態については、請求項2以下に詳述するとおりである。

【0005】

20

本発明は、微細構造形成分野において従来使用されてきた、フォトレジスト層の様な構造付与の可能なマスキング層は、それが存在するだけで、バイオポリマーフィルムの性質に対して局所的な影響を与え得る、という発見に基づいている。本発明の本質は、薄層、特に有利には薄層システムに対し、生物由来触媒、特に酵素を目的に合せて選択し且つ使用する点にある。

【0006】

本発明の方法において「浴」とは、従来公知の技術による解決法においてエッチング浴と呼ばれてきた浴、又は、構造付与層やマスキング層の作成に利用される溶液を意味する。

【0007】

微細構造形成分野において従来使用されたことのないバイオポリマーは、多くの有機層、無機層、又は金属とは異なり、基本的には酵素分解が可能である。この目的のために多数の酵素を利用することが可能であるが、条件を変えると、これらの酵素はその本来の機能とは逆の作用を示す能力を発揮できる。例えば、リパーゼは有機溶媒中においてはアセチラーゼとして作用する。

30

【0008】

酵素は、適切な条件のもとでは特異性の高い生物由来の触媒である。また、酵素は特異的なインヒビターや競合物質によってその機能が阻害され得る。原則として酵素反応は、室温条件下、環境を損なうことなしに処理できる緩和な緩衝液の中で進行する。酵素自体はその性質に呼応して、例外なしに生物分解が可能である。酵素が作用する温度範囲は狭いことが多い。したがって、酵素は熱によっても、その活性を調節することが可能である。慣用の酵素は、40～120℃の範囲で、基本的に熱によって失活させることが可能であって、通常は60℃以上に加熱すれば失活させるに十分である。このようにして、酵素、すなわち生物由来の触媒を1種類又は複数種類添加した溶液を、微細構造形成における「エッチング浴」として使用するための前提条件が整えられる。

40

【0009】

下記の5種類の実施例に基づき、本発明の詳細について以下に説明する。

【0010】

第1の実施例は、微細システム技術分野において従来使用されたことのない、且つ、例えばフォトレジストよりなるマスキング層を設けた、バイオポリマーよりなる2層システムに対して構造を付与するものである。この2層システムにはゼラチンを使用しているが、

50

本発明はこれによって限定されるものではない。構造付与の際には、異なる酵素が非常に似通った緩衝液の中で選択性良く高効率でその機能を発揮できることが多いという事実を十分に利用する。このためには、例えば洗浄したシリコンウェーハ等の基板の表面を、約200nm厚さの第一のゼラチン層で被覆する。このゼラチン層にはグルタルジアルデヒドを添加しておいて架橋反応を行わせる。この第一のゼラチン層の上に、第二のゼラチン層を重ねさせるが、この第二のゼラチン層には短鎖オリゴヌクレオチド（例えば8個のヌクレオチドよりなるもの）を添加しておき、またグルタルジアルデヒドを添加しておいて交差架橋反応を行わせてある。オリゴヌクレオチドとしては、制限酵素の特異的切断部位を含む塩基配列を示すようなものを使用する（例えば、EcoRIに対する5'-GAATTC-3'）。通常、クラスII制限酵素は金属イオン（例えば Mg^{2+} ）をミリモル濃度で含有している緩衝液中においてその機能を発揮する。下層である第一のゼラチン層はプロテアーゼを用いて分解させることができる（例えば、プロテアーゼK）。プロテアーゼは金属イオンによってその機能が阻害されることが多く、このためプロテアーゼ緩衝液には通常EDTA、EGTA、又はその他のキレート形成物質が含有されるが、これらのキレート形成物質は溶液中に含まれている金属不純物を排除する。

10

【0011】

第二のゼラチン層と第一のゼラチン層を相前後してワン・ステップで分解するが、これには、10mMのNaCl、5mMの $MgCl_2$ 、及び1%のグリセリンよりなる緩衝液を使用する。その際には、制限酵素を使用することにより、上層である第二のゼラチン層の、マスキング層によって露出させた領域が選択的に分解される。顕微鏡によって追跡確認が可能であるが、前記の分解が完全に行われた段階で、使用した緩衝液にミリモル濃度のキレート形成物質（例えば、10mMのEDTA）を添加すると、下層である第一のゼラチン層が選択的に分解されるようになる。

20

【0012】

上層である第二のゼラチン-オリゴヌクレオチド層を調製する際に、キレート形成物質を既に添加しておくという、もうひとつの可能性も存在する。こうしておくことにより、オリゴヌクレオチドの分解が進むに連れて、前記キレート形成物質が遊離してきて、緩衝液中に含有されている金属イオンに基づくプロテアーゼの失活が終結する。その後、前記プロテアーゼは、制限酵素としても下層である第一のゼラチン層を分解するようになる。金属イオンによるこの酵素のアロステリック制御は可逆的なため、連続的な使用が可能になる。しかし、金属イオンを使用して初めて機能が発揮できるプロテアーゼも存在するので、そのような場合には、同時使用が許容される（例えば、カルボキシペプチダーゼA等の亜鉛プロテアーゼ群）。さらに、バイオ技術研究の現技術水準に鑑みた場合には、耐金属性又は金属感受性を有する突然変異種の酵素を得ることも問題なく可能である。

30

【0013】

第2の実施例は、カンチレバータイプの膜を作成するための、本発明に基づく浴の使用に関する。洗浄したシリコンウェーハの表面に、層厚約200nmのバイオポリマー薄層をスピニング法によって被覆させる。例えば、前記薄層は水に10%の割合で溶解させたゼラチンに3%のグルタルアルデヒドを添加したものによって形成させることができる。前記薄層は、非水溶性であり、通常のフォトリソグラフィ現像剤に耐性を有する。これに続き、例えば市販のフォト反転レジストを重ねさせる。このフォトリソレジスト層は、規定通りに処理を行い、最終的に希望する構造に対応させてマスクを取り付け、露光して構造を付与する。シリコンウェーハ、交差架橋結合の行われたゼラチン層、及び構造付与したフォトリソレジスト層よりなる前記の層状体全体を酵素浴内に入れる。バイオポリマー層にゼラチンを使用している場合には、概ね10%のSDS、10mMのNaCl、10mMのEDTAならびに10mMのトリス-HClより調製して、10mg/mlの割合でプロテアーゼKを添加したプロテアーゼK緩衝液が好ましい酵素浴である。この酵素浴のpHは8.5である。このような酵素浴を使用することにより、室温で約8時間以内に、約200nm厚さのゼラチン層の完全分解が行われる。この「エッチング工程」の結果として、カンチレバータイプのフォトリソレジスト膜が得られる。

40

50

【0014】

第3の実施例は、分解停止層（従来公知のエッチング停止層に類似）を有する場合の、本発明に係る浴の効果に関する。

【0015】

ここでも再びゼラチンを例にとって説明するが、例えばバイオ有機化合物から薄膜を作成するに当たって、選択した層を外部の影響から保護すると同時に、この層の一定部分を露出させなければならない可能性が存在する場合には、後ほど膜を形成することになるゼラチン層に、金属、又は、分解に使用する酵素に特異的なインヒビターを予め組み込んでおけば、前記のことが問題なく可能になる。基本的に、このようなインヒビターとは、ペプチド結合を開裂させるプロテアーゼに対する例えばエーテル化合物のような、酵素によって開裂することのない化合物を用いて、酵素分解基質を人工的に遷移状態にした類縁物質のことである。このようにして調製した薄層に約1 μm 厚さのアガロースよりなる第二の薄層を重ねさせる。0.1 g/ml のアガラーゼ、5 mM のEDTA、10 mM のNaCl、及び10 mM の Na_2HPO_4 よりなる浴を用いて、予め適当なマスキング層を設けておいたこの第二の薄層の希望する部分だけを溶解させる。前記のように調製した第一の薄層にまで分解が進んだ段階で、第一の薄層の表面に存在するインヒビターによって、アガラーゼによる分解のそれ以上の進行が阻止される。

10

【0016】

第4の実施例においては、ゼラチンとアガロースよりなる二重層システムに構造を付与するための、本発明に係る浴を使用するが、この場合の浴は、5 mM のNaCl、5 mM の Na_2HPO_4 、0.1 mg/ml のアガラーゼ、及び好熱性生物（例えば、*Thermus thermophilus*）から得られた1 mg/ml の耐熱性プロテイナーゼよりなる浴、即ち、2種類の酵素を添加した浴である。この場合には、アガラーゼは室温で作用が活性化するという特徴を示す一方、耐熱性プロテイナーゼは室温では検出され得るほどの活性を示すことがない。この最初の分解工程においては、アガロースよりなる上層に対してのみ希望する構造が付与される。その後、浴の温度を72 $^{\circ}\text{C}$ に上昇させると、プロテイナーゼは活性化するが、その一方で、アガラーゼは検出され得るほどの活性をもはや示さなくなる。二重層システムのゼラチンよりなる下層だけが分解されるようになる。

20

【0017】

第5の実施例は、本発明に係る浴を一種又は複数種使用した、鉄-ゼラチン-脂質よりなる薄層システムの構造付与に関する。アエロバクチン又はエンテロバクチンのような親鉄物質を約10 mg/ml の割合で添加した溶液を使用する。20 $^{\circ}\text{C}$ で約1時間後には、約100 nm 厚さの鉄層のうちマスクをしていない部分だけが溶解する。ゼラチン層は、第2の実施例に記載した、タンパク分解酵素が添加されている緩衝液を利用すると、構造付与された鉄層によってマスキングされたままの状態での分解が行われ、脂質層が露出してくる。この脂質層は、1%のグリセリンと、脂質層の分解に適した1 mg/ml のリパーゼよりなる水溶液によって構造を付与ことができる。

30

【0018】

本発明は、上記の各実施例に記載した浴によって制約を受けるものではない。具体的な実務面において構造を付与すべき薄層に対して行われる、特異性の高い生物由来の触媒、特に酵素の選択は、バイオ技術の専門知識を応用すれば、更に発明性を有する手順を必要とせず実施可能である。

40

フロントページの続き

- (72)発明者 ブォールファート, クラウス
ドイツ連邦共和国 デー—0 7 7 5 1 ラーザン ヌンマー 3
- (72)発明者 ケーラー, ヨハン ミヒヤエル
ドイツ連邦共和国 デー—0 7 7 5 1 ゴルムスドルフ ウンターガッセ 8
- (72)発明者 シュルツ, トルステン
ドイツ連邦共和国 デー—0 7 7 4 3 イェナ ノレンドルファー シュトラーセ 1 1

審査官 斎藤 真由美

- (56)参考文献 特開平0 6－1 9 4 5 1 3 (J P, A)
特開昭5 5－1 3 8 7 4 1 (J P, A)
特開昭6 0－2 3 5 1 3 2 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12M 1/00 - 3/10
C12N 9/00 - 11/18
G03F 7/26
PubMed, MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)