

機能性マイクロチップの開発と応用

材料技術課 大永 崇 加工技術課 小幡 勤

1. はじめに

近年、微細な流路や液だめ等からなるマイクロ流体チップが開発され、医療検査や環境分析などへの応用の期待から、様々なアプリケーションに関する研究がなされている。筆者らもこれまでに、射出成形や光硬化を用いて樹脂の微細構造形成法を確立し、この方法により製造したマイクロ流体チップ等が既に県内企業により製品化されている。

さらに筆者らは、マイクロ流体チップのミクロな構造的機能を利用するだけでは十分な応用ができないと考え、マイクロ流路表面自体を機能化することを検討している。流路表面に機能分子を固定し、そこに機能分子が捕捉できる物質(=目的物)を含む液体を流すことにより、目的物を流路表面に捕捉・濃縮でき(図1参照)、さらには検出するようにもできる。機能分子としては抗体、酵素、ポリペプチド、DNA、クラウンエーテル、ポルフィリン、発光分子など様々なものが既に知られており、目的に合わせた表面機能設計が可能である。また機能分子は一般に高価なため、このようなミクロな環境で利用できれば、機能分子の新たなアプリケーション開発にも繋がる。

本研究ではこれらの樹脂微細構造形成法、表面機能化方法を応用して、汎用的な機能性マイクロチップを製作した。さらにこのようなチップにおいて表面に抗体を固定化し、マイクロ流路を流れる液体から、抗原抗体反応を利用して細胞を捕捉することを試みたので、以下に報告する。

2. 機能性マイクロチップの製作

長さ 10,000 μm 、深さ 50 μm 、幅 10,30,50,100 μm の4本

の直線流路が平行に並んだパターンのマイクロチップを設計し、それに対応するシリコン鋳型を用意した。この鋳型を用い、既に開発している光硬化性樹脂および成形方法(特開 2011-46853 参照)により上部が開いたマイクロ流路からなるマイクロチップ部品を作製した。光硬化性樹脂には、微細構造体の表面に反応基を導入するために、エポキシ基を有するモノマーを混合した。

このようにして得たマイクロチップ部品には、後で流路表面に機能分子を固定するため、および蓋を接合するために、表面のエポキシ基を利用してポリアクリル酸をグラフトした。

次に上記マイクロチップ部品に蓋をしてマイクロ流体チップとするために、蓋としてPP系樹脂からなる15mm角で厚さ1mmのシートを用意した。シートには流路の注入・排出口として位置合わせをして直径1mmの穴を開けた。このようにしたシートに、上記マイクロチップ部品と接着剤なしで接合できるよう、ラジカル重合により表面にポリグリシジルメタクリレート(特開 2008-115305)をグラフトした。

以上で用意したマイクロチップ部品および蓋を加熱圧着して、マイクロ流体チップとし、さらに送液用のチューブを接続した(図2参照)。このマイクロチップは種々のアプリケーション開発等に使用できると考えられるので、特許出願した(特願 2010-216093)。

チューブに小型ダイヤフラムポンプを接続して蒸留水を送液し、マイクロ流路に漏れや詰まりがないことを確認した後に、流路への抗体固定化を行った(図2参照)。固定化は流路表面のポリアクリル酸を利用し、カルボキ

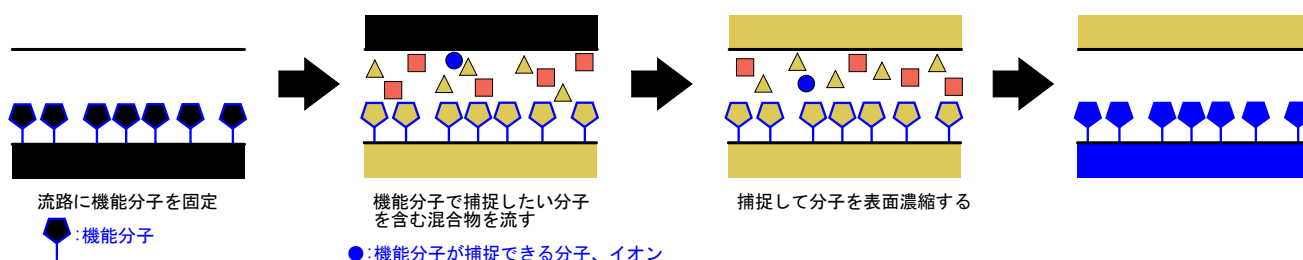


図1 マイクロ流路表面への機能付加

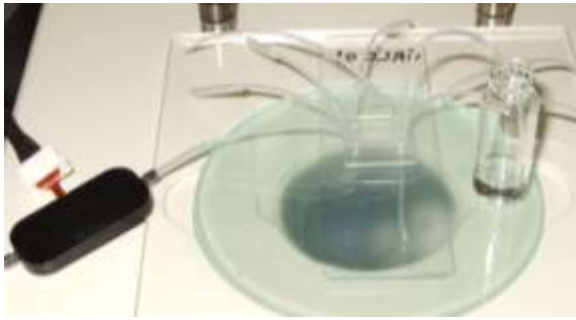


図2 作製したマイクロチップと送液の様子

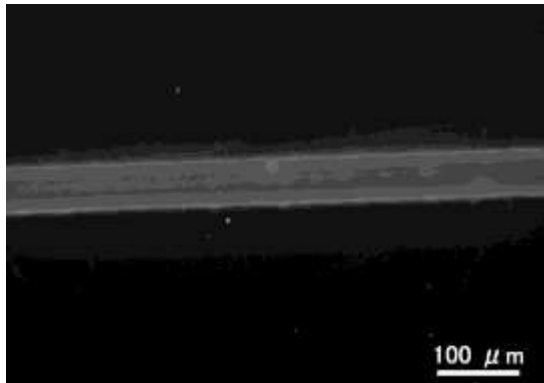


図3 蛍光標識抗体を固定化した流路

シル基を活性エステル化し抗体と反応させて行った。Cy3 標識抗体を固定化した流路の蛍光観察像を図3に示す。Cy3 による赤い蛍光発光が認められ抗体固定が確認された。

3. 抗原抗体反応を利用した細胞捕捉

上記のようにして用意したマイクロ流体チップの幅100μmの流路に、細胞表面の抗原タンパク質に結合する抗体を固定化し、細胞捕捉を試みた。細胞は表面にEpCAM(上皮細胞接着分子)を有する癌細胞株(KYSE220、富山大学 嶋田先生所有)を用意し、抗体は抗EpCAMを用いた。

マイクロ流路に細胞懸濁液を流すと、流速が速い場合

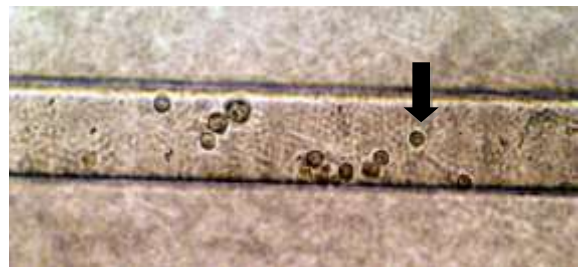
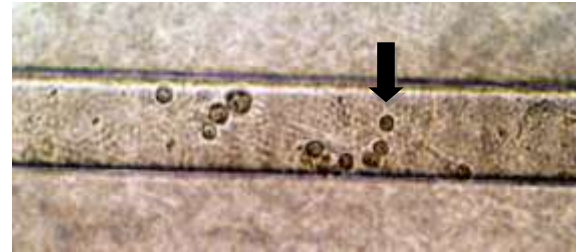
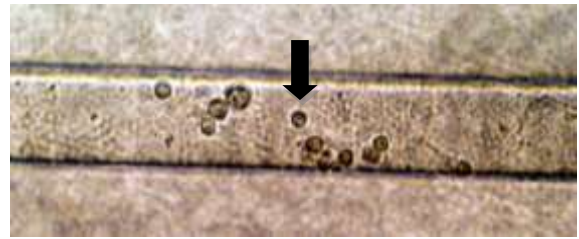


図4 マイクロ流路に捕捉された癌細胞

には細胞が流れるだけであったが、流速を徐々に落としていくと流路表面に付着する細胞が認められた。図4はその様子を示しており、浮遊して流れる細胞(矢印で示した)がある一方で、流路壁に付いて移動しない細胞が認められる。抗体を固定化しない流路では同じ流速でも細胞の付着は認められず、これらの結果から抗体により細胞が捕捉できることが確認された。

「謝辞」

本研究推進にあたり数多くのご指導を頂きました富山大学大学院医学薬学研究部 嶋田裕先生、岸裕幸先生に深く感謝致します。

キーワード：マイクロ流体チップ、機能分子、抗体、細胞、捕捉

Development and Application of Functional Micro-fluidic Chips

Takashi OHNAGA and Tsutomu OBATA

Novel functional micro-fluidic chips were developed. The chips were comprised of polymeric microstructures and were made quickly and easily with light-curing processes using resins at low cost. Since the resins included monomers having a reactive group, the surface of channels in the chip could covalently bond to specific molecules which provided the chips functionalities. We demonstrated to apply the chips to capturing tumour cells which expressed EpCAM and were flowing through the channel. If EpCAM antibodies were bonded to surfaces of the channel as the specific molecule, a part of the cells were observed to become immobile on the channel at a small flow rate during the flow test. However the immobilization never occurred without the antibodies.