HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of Paper-based Analytical Devices for Low-cost, Rapid and Straightforward Measurement of Components in Human Whole Blood [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	小松, 雄士
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第14469号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81399
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KOMATSU_Takeshi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（工学）　　氏名　小松　雄士

学位論文題目

Development of Paper-based Analytical Devices for Low-cost, Rapid and Straightforward Measurement of Components in Human Whole Blood

（安価、迅速、簡便なヒト血中成分測定のためのペーパーデバイスの開発）

紙を部材にしたペーパー分析デバイス（PAD）は、印刷技術やカッティングにより流路やウェルを形成し、試料・試薬溶液の輸送や混合、反応を行うことで対象物質を分析するデバイスである。安価、容易な作製、携帯性、廃棄性、外部動力を使わずに液体操作が可能などの利点があることから、医療診断や環境分析、食品安全検査など様々な分析分野に PAD の応用が進められている。その中で、本論文は医療診断分野の血液検査に注目した。血中成分の測定は、検査機関だけではなく、在宅検査や災害場所での検査など多くのニーズがある。しかし、従来の血液検査は、比較的多くの採血量と複数の高価な専用装置が必要であるため、高コストである。さらに、測定結果を取得するまでには長時間を要する。そこで、本研究では、安価、迅速かつ簡便に血中成分測定ができる PAD の開発を目的とした。本論文は、以下のように構成されている。

第 1 章は、序論であり、本研究の背景および目的について述べた。

第 2 章では、血中成分を比色定量するための PAD の作製方法について検討した。PAD の一般的な作製方法として、クラフトカット、ワックスプリント、スクリーンプリント、フォトリソグラフィーがある。本章では、この四つの作製方法で、同一デザインの PAD を作製し、作製精度や比色法における分析性能などの比較・評価を行った。クラフトカットを除く他の三つの作製方法では、疎水性インクを印刷することで流路等を形成するため、紙表面に印刷した疎水性インクの紙部材への浸透が重要である。そこで、走査型電子顕微鏡で、三つの作製方法で作製した PAD を観察した結果、スクリーンプリントのみ、紙の裏面まで疎水性インクが浸透していることが観察された。続いて、血液検査への適用に向けて、比色法による牛血清アルブミンの定量を試み、PAD 作製法が物質定量に及ぼす影響を評価した。その結果、作製法によって異なる検量線が得られた。以上のことから、作製方法としてクラフトカットとスクリーンプリントが比色法を用いる PAD の開発に優れると結論付けた。

第 3 章では、PAD 上の多色変化を測定可能な画像解析法について検討した。将来的に血中の複数成分の同時検出を可能にするためには、複数の比色反応から生じる多色変化を測定可能な画像解析が必要である。CIE $L^*a^*b^*$色空間とよばれる、色の濃淡だけではなく色変化を数値化できる解析スケールを導入し、PAD 上でユニバーサル指示薬による多色変化（pH2-9）の測定に適用した。RGB スケールでは、pH に対応した応答を得ることは困難であったのに対して、明度（L^*）と二つの彩度（a^*, b^*）をパラメーターとして含む CIE $L^*a^*b^*$色空間を利用した解析では、pH に対応した応答が得られることを明らかにした。これらの結果から、CIE $L^*a^*b^*$色空間は、多色変化の測定に応用できることを実証した。

第 4 章では、血中成分のモデルとして、双極性障害患者の薬物検査対象である Li^+を検出するための PAD の開発を行った。開発した PAD は、全血から血漿を分離する血漿分離ユニットと血漿中の Li^+検出する検出ユニットから構成される。血漿分離ユニットは、市販の血漿分離紙をストリップ状に裁断したものをポリマー基板上に設置し、血液導入用のポリマー製アダプターをストリップの上流側に配置した。検出ユニットは、スクリーンプリントにより直径 4 mm の円形の検出部をろ紙上に作製し、各検出部には、リチウム製剤の血中薬物濃度測定に実際に使用されている Li^+検出試薬（F28 テトラフェニルポルフィリン）を濃縮乾固した。したがって、この PAD は、血液を血漿分離ユニットに導入すると赤血球などの細胞成分は上流側にトラップされ、血漿のみが分離紙の下流に流れてくる。その後、血漿のみが流れてきた下流部に、検出ユニットを手動で加圧接触させると、血漿が検出ユニットの検出部に吸収され、血漿中の Li^+と検出試薬が反応して赤く変色する。測定は、画像解析により検出部の変色度合いをマゼンタ強度で算出した。この PAD では、ピペッティング操作をすることなく、両ユニットの接触とその時間調整により血漿の定容操作を実現した。Li^+標準溶液試料および Li^+含有血液試料を用いた性能評価から、開発したデバイスがマイクロプレートリーダーを用いた従来法と同等の測定性能を持つことを確認した。また、測定した各濃度で添加 Li^+の回収率 90%以上を達成したことから、PAD による血中 Li^+定量が可能であることを実証した。

第 5 章では、第 4 章で依然として課題となっていた必要な血液量の更なる削減および一定量の血液分取と導入を必要としない血中 Li^+定量のための融合デバイスの開発を行った。融合デバイスは、微量血液からの一定体積の血漿の分割、輸送、導入を可能とするデジタルマイクロフルイディクス（DMF）ユニットと Li^+検出試薬を濃縮乾固したろ紙製の円形 PAD ユニットで構成した。DMF は、上基板の全面電極と下基板に構築された複数の微小電極から構成されている。下基板の微小電極への電圧操作により、基板間の空隙に導入された液体の定容分割や輸送、混合ならびに液体中の粒子の分離などを行うことができる。本章では、全血からの血漿分離に誘電泳動力を利用した。赤血球は、電極に高周波電圧を印加した際に生じる不均一な電界に対し、反発する誘電泳動力が生じることが先行研究により明らかとなっている。一方で、血漿はその電界に引き込まれる誘電泳動力が生じる。先行研究を参考に、電極へ印加する高周波数電圧を調節することで、5 分以内に全血から血漿液滴（分離効率 99%）を分離することに成功した。次に、融合デバイスで、5 μL の血液から血漿液滴を分離して、PAD に輸送・導入することで血中 Li^+検出を試みた。その結果、融合デバイスは従来法と同等の検出性能を示したことから、融合デバイスにより血中 Li^+の定量が可能であると結論付けた。以上の結果より、本融合デバイスは、適当な微量体積（数 μL）の血液を導入するだけで、検出までの全工程を自動かつ迅速に行うことが可能であることを実証した。

第 6 章は、本論文の総括および本研究の将来性について述べた。血液検査に向けた PAD 開発の課題には、作製方法の選定や多色同時検出用の画像解析法、血漿分離と分離した血漿の定容操作が挙げられるが、先行研究でそれらを可能とする知見や革新的な技術は確立されていなかった。本研究では、まず PAD の作製方法および多色同時検出用の画像解析法の検討を行った。得られた情報は、PAD 開発における作製方法の選定や複数の測定対象の同時検出が可能な PAD を開発する際に有益な情報を提供するだけでなく、新たな PAD を開発する際の開発指針となると考えられる。また、Li^+を血中のモデル成分として、血漿分離と分離した血漿の定容操作を可能とする 2 つの異なるフォーマットの PAD を開発した。これらの成果は、医療分野におけるオンサイト分析用 PAD の研究開発に大きく貢献するものである。また、PAD と IoT 関連技術を融合することで、将来的には誰もが自宅、勤務先あるいは設備のない発展途上国など様々な場所で測定・診断することが可能になると考えられる。したがって本研究で開発した PAD は、遠隔診断を掲げる Society5.0 の実現や世界の医療の質の向上にも貢献することが期待される。