

Paper-Based Analytical Devices  
with Simplified Signal Detection for Medical Screening

August 2017

YAMADA, Kentaro

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	甲	第	号	氏 名	山田 健太郎
主 論 文 題 名 :  Paper-Based Analytical Devices with Simplified Signal Detection for Medical Screening  (医療スクリーニングを目的とした簡易検出型ペーパー分析デバイス)					
(内容の要旨)  紙をベースとした分析デバイス (paper-based analytical device: PAD) は、尿検査試験紙や妊娠検査薬を例とし、手頃なコストで簡易的に行う医療検査に実利用されている。近年、デバイス基板である紙に試料溶液の流れ道 (マイクロ流路) を設けた PAD (microfluidic PAD: $\mu$ PAD) が、従来の $\mu$ TAS のように化学操作の自動化や多項目同時分析が行える、新規の分析プラットフォームとして注目を集めている。過去 10 年、様々な生体物質を測定する $\mu$ PAD の研究開発が世界的に行われてきたが、医療現場での実利用には至っていない。臨床サンプルを用いての実用性評価が不充分であることや、色や発光に基づいた分析結果を使用者に判りやすい形で表示する方法が不足していることが原因である。そこで本研究では、重要な臨床ターゲットとしてタンパク質に焦点を当て、涙液ラクトフェリンと尿アルブミンを目視で簡易的に検出可能な( $\mu$ )PAD を開発し、臨床サンプルを用いて実用性を示すことを目的とした。 第 1 章では、紙をベースとした医療診断デバイス開発の歴史と、医療応用を指向した $\mu$ PADs に関する最新の研究開発および課題について概説した。 第 2 章では、涙液タンパク質の一種であるラクトフェリンを、蛍光の強さを観測することで測定可能な $\mu$ PAD 開発について述べた。涙液中のラクトフェリン濃度は、ドライアイやシェーグレン症候群など、種々の疾患の指標として知られる。本研究では、蛍光性金属の一種であるテルビウム ( $Tb^{3+}$ ) が、ラクトフェリンと結合して緑色蛍光を発する性質を利用し、抗体を用いることなくラクトフェリンを特異的に検出することに初めて成功した。開発した PAD は、既存の分析技術である ELISA 法と 6%以内の誤差で、健常者涙液に含まれるラクトフェリンを正確に定量できることが分かった。コストは従来の 1%以下となり、2.5 $\mu$ L の試料を一度滴下するのみであるため、所要時間は数時間から 15 分に短縮された。 第 3 章では、第 2 章で開発されたラクトフェリン測定用 $\mu$ PAD の定量分析の更なる利便化について述べた。直線状の流路から見られる蛍光の“線の長さ”をシグナルとすることで、アナログ温度計の要領で目盛りから直接ラクトフェリン濃度が測定可能な $\mu$ PAD を開発した。蛍光の強さを数値化するために用いていたカメラや、ソフトウェアによる画像の色解析が不要となり、目視による定量測定が可能となった。眼病患者の検体を含む 18 種類の涙液サンプルに含まれるラクトフェリン測定結果は、ELISA 法と高い相関を示し、実用性の高いヒト涙液ラクトフェリン分析方法を確立した。 第 4 章では、尿タンパク質 (アルブミン) を簡易的に測定する新規方法の提案について述べた。尿アルブミン測定は通常、尿検査試験紙の色変化を色見本と目視比較して行われる。本研究では、尿アルブミン測定結果を表す“文字”が表示される PAD を開発した。健常者の尿サンプルにアルブミンを添加し、複数のユーザーによる読み取りテストを行った結果、市販品の尿検査試験紙と同等の正確性が確認された。色弱のユーザーによる読み取り結果は、開発された文字表示型 PAD の方が市販の試験紙より正確であり、PAD 使用者の幅を広げられる可能性が示唆された。 第 5 章では、開発されたデバイスの位置付けを、 $\mu$ PAD の実用化への展望を交えたうえで述べることで、本研究の成果を要約した。					

## Thesis Abstract

No. \_\_\_\_\_

Registration Number	<input type="checkbox"/> “KOU” <input type="checkbox"/> “OTSU” No. _____ *Office use only	Name	YAMADA, Kentaro
Thesis Title <p style="text-align: center;">Paper-Based Analytical Devices with Simplified Signal Detection for Medical Screening</p>			
Thesis Summary <p>Recently, (microfluidically) patterned paper-based analytical devices - (<math>\mu</math>)PADs - have gained significant attention as revolutionary diagnostic platforms, because of their advantages including low-cost, disposability, multiplexation of assays and capillarity-based pump-free sample liquid transportation, among others. Despite active academic research in the last decade, real-world application of <math>\mu</math>PADs for medical diagnosis is still delayed, mainly due to insufficient evaluation in practical sample matrices and a lack of simplicity in result interpretation based on optical signals (<i>e.g.</i> color change, emission).</p> <p>This work aimed at the development of (<math>\mu</math>)PADs targeting biological protein analysis. Two clinically-relevant proteins, tear lactoferrin and urinary albumin, have been successfully quantified free of any signal readout equipment, with validation studies performed on real samples.</p> <p>Chapter 1 introduces the history of paper-made diagnostic devices and recent academic research developments in the field of <math>\mu</math>PADs for medical diagnosis.</p> <p>Chapter 2 describes the development of a <math>\mu</math>PAD for the antibody-free detection of tear lactoferrin. The lactoferrin concentration-dependent fluorescence emission from lactoferrin-terbium (<math>Tb^{3+}</math>) complexes was employed as the detection signal. The elaborated device successfully determined lactoferrin concentrations in human tear samples within 6% errors of the conventional ELISA method. This <math>\mu</math>PAD enables human tear lactoferrin assays in 15 min by simply pipetting 2.5 <math>\mu</math>L of sample.</p> <p>Chapter 3 describes a method for further simplified lactoferrin detection. A fluorescence emission “distance”-based quantitative signaling method mimicking a classical analog thermometer was introduced, which allows naked-eye signal readout eliminating the needs of a camera and software-based color analysis. The analytical reliability of the <math>\mu</math>PAD was confirmed in a direct comparison with the standard ELISA method using clinical human tear samples.</p> <p>Chapter 4 describes a urinary albumin detecting PAD, allowing direct semi-quantitative result interpretation in the form of “text”. User tests performed with albumin spiked urine samples demonstrated that the accuracy was comparable to the conventional well-established dipstick method. The elaborated text-displaying PAD provides an alternative for users with specific color recognition capacities or for those with impaired color vision.</p> <p>Chapter 5 summarizes the results of this thesis and a future outlook of <math>\mu</math>PADs.</p>			