

Title	紙ベースの分析デバイスによる高感度イムノアッセイの開発
Author(s)	CHARERNCHAI, SUMAMAL
Citation	
Issue Date	2022-09
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/18145">http://hdl.handle.net/10119/18145</a>
Rights	
Description	Supervisor:高村 禪, 先端科学技術研究科, 博士

氏 名	CHARERNCHAI, Sumamal		
学 位 の 種 類	博士（マテリアルサイエンス）		
学 位 記 番 号	博材第 546 号		
学 位 授 与 年 月 日	令和 4 年 9 月 22 日		
論 文 題 目	Development of High-Sensitive Immunoassay on Paper-Based Analytical Devices		
論 文 審 査 委 員	主査 高村 禅	北陸先端科学技術大学院大学	教授
	塚原 俊文	同	教授
	松村 和明	同	教授
	都 英次郎	同	准教授
	鈴木 正康	富山大学	教授

## 論文の内容の要旨

Microfluidic paper-based analytical devices ( $\mu$ PADs) are promising biosensors that may be used in a variety of bioanalytical applications. Despite the benefits of being affordable, low-volume, and portable, there are restrictions, including issues with large-scale production, multi-step operation, and particularly detection sensitivity, that may pose difficulties for users.

To address those critical issues, a new  $\mu$ PAD for automating competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for small-sized target detection was developed. Simple, precise, and rapid device fabrication was achieved by laser-cutting technology. A Sucrose valve was utilized to automate the sequential delivery of reagents, providing simple user-operation. The device was demonstrated with Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) antigen, which is a hydrophobic toxin and cancer-causing agent. During an examination of various parameters, a new sample-loading method, or the so-called Direct Dropping of Sample on Antibody Location (DDoAb), was discovered to allow minimization of sample volume to 0.6  $\mu$ L, while eliminating the possible loss of a target molecule by adsorption on the membrane, thus improving detection sensitivity. Under the optimization conditions, the device achieved a limit of detection of 0.1 ng/mL or 60 fg, which is 2-4 orders of magnitude lower than other reports.

To further advance the sensitivity of  $\mu$ PAD to an ultimate level of single molecule detection, a new method for digital counting of molecules on  $\mu$ PAD was proposed. Streptavidin-conjugated alkaline phosphatase (SA-ALP) was used as an analyte model. Without the need for an expensive femtoliter-sized chambers, digital counting of SA-ALP was successfully conducted using enzymatic reaction, inexpensive materials, and general laboratory equipment. This simple and low-cost digital counting platform shows potential use in other bioanalytical applications and other target molecules.

**Keywords:**  $\mu$ PADs, Automated ELISA, Small-sized target, Aflatoxin B<sub>1</sub>, Digital counting

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、Lab on Paper の技術を用いて紙上に形成・配置した浸透パターンや試薬により、抗原抗体反応による生体分子の安価・簡易・高感度な検出法の確立を目指した研究である。特に途上国で大きな問題となっている穀物中の発がん性カビ毒、アフラトキシン B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)の測定が可能な、競合法の酵素増感型 ELISA を全自動で行う Lab on Paper の開発と、さらなる高感度・簡易測定デバイスの実現のため、サンプル中の分子の数を 1 つ 1 つ数えることのできる Digital Elisa を Lab on Paper のプラットフォームで実現するための

基礎研究を行ったものである。

第 1 章では、これまでの紙ベースの分析技術を総括してその問題点を抽出し、またデジタル計測を実現するこれまでの技術についてまとめ、紙上でデジタル計測を実現させるための方策を提案し、本論文の目的と範囲を明確にしている。

第 2 章では、 $\text{AFB}_1$  検出を題材に、競合法の酵素増幅型高感度抗原抗体検査に必要な複数の手順を、毛細管現象による液体の移動とスクロースの溶解を利用した遅延で自動的に実行できる新規 **Lab on Paper** の開発について述べている。さらに、抗原の基材への吸着ロスが、抗体との結合前後で大きく変わることがデバイスの特性を著しく悪化させていることを突き止め、サンプルの導入法を変えることで検出限界を約 3 桁向上させ、同時に必要サンプル量を 2 桁減らし、 $0.6\mu\text{L}$  のサンプル量で  $60\text{fg}$  の  $\text{AFB}_1$  検出に成功した。イムノクロマトに代表される従来の紙ベースの簡易検出法は  $100\mu\text{L}$  程度のサンプル量が必要で、尿などの分析には向いているが血液の自己分析は不可能であった。新規開発したこの方法は  $\text{AFB}_1$  の検出法として優れているだけでなく、サンプル量が十分得られない涙、唾、ランセットで自己採血した血液等の分析においても、非常に有効であると考えられる。

第 3 章では、従来高価で大型の装置でしか測定できなかった **Digital Elisa** を、紙ベースで簡易に実現する新規方法の提案とその基礎的な研究を行っている。従来の方法では、微細加工されたマイクロチャンバーや油中水微小液滴を使って酵素増幅信号を閉じ込め、1 分子レベルの感度を実現しているが、本研究では酵素反応により不溶化する色素のクラスターを数えることで、紙上での実現可能性を初めて示した。

第 4 章では、本研究の成果をまとめ、意義を統括している。

以上、本論文は、**Lab on Paper** 分野において抗体を用いた競合法による抗原検査を初めて自動化し、特に低溶解度分子の検出を向上させる優れた方法を開発し、さらに紙上での **Digital** 計測法の可能性を示したものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。