

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02760

研究課題名（和文）高性能紙デバイスの開発とその応用展開

研究課題名（英文）Development of high performance paper devices and its application development

研究代表者

渡慶次 学（Tokeshi, Manabu）

北海道大学・工学研究院・教授

研究者番号：60311437

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、分析性能が悪いものという従来の紙デバイスの既成概念を覆す、高い分析性能（精度・感度）を持つ高性能紙デバイスを開発するとともに、紙デバイスの多方面への応用を実現するための基盤技術を構築し、分析化学分野へ大きく展開することを目的とする。具体的には、A：分析性能の高い紙デバイスの研究（画像解析技術を含む）、B：免疫分析デバイスの開発、C：細胞アッセイ及び細胞分離デバイスの開発、D：教育ツール用デバイスの開発、の研究項目を実施した。これにより、紙デバイスを分析化学・ライフサイエンス・化学教育などの分野に大きく展開することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発された各種紙デバイスは、食品分析、環境分析、リモートラーニング（科学実験）など幅広い分野へ応用されることが期待される。特に、スマートフォンと組み合わせて利用することで、さまざまなオンサイト分析の新しいツールとしての利用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The objectives of this research are to develop high-performance paper-based devices with high analytical performance (accuracy and sensitivity) that overturn the existing concept of conventional paper-based devices as having poor analytical performance, and to establish fundamental technologies to realise the application of paper-based devices in many fields and to expand them significantly into the field of analytical chemistry. Specifically, the following research items were carried out: A: research on paper-based devices with high analytical performance (including image analysis technology); B: development of paper-based immunoassay devices; C: development of paper-based cell assay and cell separation devices; D: development of paper-based devices for educational tools. As a result, we succeeded in expanding paper-based devices into fields such as analytical chemistry, life sciences, and chemical education.

研究分野：分析化学

キーワード：紙デバイス 免疫分析 細胞アッセイ 教育ツール 分析化学

1. 研究開始当初の背景

2007年にHarvard大学のWhitesidesらがフォトリソグラフィーを利用して作製した紙デバイスの最初の報告(*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007)して以来、紙デバイスに関する研究が大きな注目を集めている。安価・簡便・測定装置や専門技術が不要などの特徴を持つ紙デバイスは、従来のガラスやポリマー製のマイクロデバイスに比べると分析性能(精度・感度)は悪いが、高い分析性能を必要としないグローバルヘルス(開発途上国の医療)への応用が大きく期待されている。申請者は、2009年頃から紙デバイスに関する調査研究をスタートし(*機能紙研究会誌*, 2011)2012年に北海道大学にて研究室を主宰すると同時に本格的な研究に着手した。これまでにスクリーン印刷技術とポリマーを利用した新規紙デバイス作製法(*Analyst*, 2015) 広くバイオアッセイに用いられているHRPの高感度検出(検出下限値: 0.7 fM)(*Sens. Actuators B*, 2016) 紙のウィッキング能(毛細管現象で液体を吸い込む能力)を利用した紙デバイス洗浄法の開発(*Anal. Bioanal. Chem.*, 2016) デバイス作製法の検出感度に及ぼす影響(*Anal. Sci.*, 2018) マルチカラー画像解析法の提案(*Analyst*, 2016) 競合免疫分析法によるカビ毒産生毒素アフラトキシンB1の検出(*Analyst*, 2016)など、新規性・独創性の高い研究成果を挙げてきた。これらの成果は、いずれも開発競争の激しい紙デバイス分野で世界的にも高く評価されている。しかし、紙デバイスの研究者を含むほとんどの研究者は、紙デバイスの簡便さやユニークさを認識しているものの、分析性能は、従来のガラスやポリマー製のマイクロデバイスを超えるものではないと考えている。多くの研究者は、紙デバイスの分析性能の悪さは紙の本質的な性質によるものだと考えているが、申請者はこれまでの研究を踏まえ、本研究で提案している研究内容を実施することで、従来のマイクロデバイスと同等の高い分析性能(精度・感度)を持つ紙デバイスを開発することができる考えた。また、申請者は、紙という素材の可能性は、これまで報告されている紙デバイスにとどまるものではなく、様々な分野に大きく展開できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、分析性能が悪いものという従来の紙デバイスの既成概念を覆す、高い分析性能(精度・感度)を持つ高性能紙デバイスを開発するとともに、紙デバイスの多方面への応用を実現するための基盤技術を構築し、分析化学分野へ大きく展開することを目的とする。具体的には、A: 分析性能の高い紙デバイスの研究(画像解析技術を含む) B: 免疫分析デバイスの開発、C: 細胞アッセイ及び細胞分離デバイスの開発、D: 教育ツール用デバイスの開発、の研究項目を実施する。これにより、紙デバイスを分析化学・ライフサイエンス・化学教育などの分野に大きく展開する。

3. 研究の方法

本研究では、スクリーン印刷およびワックス印刷により紙上に流路構造を作製し、目的に応じた各種紙デバイスを開発した。定量は、デジタル画像の取得・画像解析により行った。画像解析には、RGBやCMYKあるいはグレースケールによる解析だけでなく、分析精度を向上させるために反応系によってはCIE L*a*b*による解析を行った。競合免疫分析を高性能化するために、紙を積層化した三次元流路構造を開発した。また、紙デバイスを利用した定量分析では、試料導入にピペットが必要であったが、ピペットを使わずに使い捨てスポイトあるいはデバイスサンプルに浸漬するだけで定量分析が可能な流路構造を開発した。

4. 研究成果

A: 分析性能の高い紙デバイスの研究

双極性障害の治療薬である炭酸リチウム(血中ではリチウムイオンとなる)は、有効な血中濃度域(0.4~1.2 mM)と中毒域(1.5 mM以上)が近接しており、血中薬物濃度モニタリング(TDM: Therapeutic Drug Monitoring)が必要である。そこで本研究では、炭酸リチウムのTDMをモデル系として、血中のリチウムイオンを定量できる高性能紙デバイスを開発した。図1に開発したデバイスの概略を示す。このデバイスは、全血から血漿を分離するための血球分離ユニット(長さ2.2 cm、幅4 mm)とリチウムイオンと選択的に反応・発色する反応試薬があらかじめ塗布されている検出ユニットから構成されている。血球分離ユニットに導入された血液は、キャピラリーフォースで流路下流に流れていくが、血球成分は流れながら紙にトラップされる。そのため流路の途中からは、血漿のみが流れていく。実際に20 µLの血液を導入した場合、上流から約1 cm以内に細胞成分はトラップされ、下流へは血漿のみが流れていくことを確認した。血液に炭酸リチウム

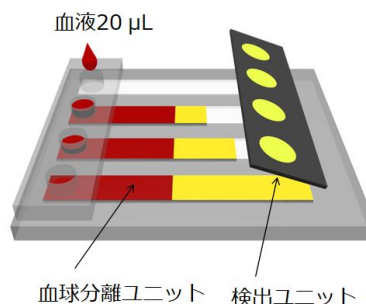


図1 TDM デバイス

をスパイクした試料を用いて、開発したデバイスの検出性能を評価したところ、遠心分離と吸光度計を用いた従来法と同等であった。わずか1滴の血液で、血中のリチウムイオン濃度を1分以内に定量することが可能な高性能紙デバイスの開発に成功した。本研究で開発した TDM デバイスは、簡便・迅速・安価という特徴を持っており、試薬保存安定性や操作性を向上させることで社会実装が期待できる。

さらに、エレクトロウェットング技術を利用したデジタルマイクロフレイクスと紙センサー（検出ユニットの試薬が塗布された円形の部分のみをパンチングで作製したもの）を組み合わせたハイブリッドデバイスを開発した。このデバイスは、デバイス内にリチウムイオン検出用の紙センサーが5つ配置されているため、5 μL の血液で、20分以内に5回測定することができる。リチウムイオン以外の対象を測定できる紙センサーを開発することで、複数の測定対象の同時測定が可能なデバイスに容易に拡張することができる。

また、硝酸態窒素、カリウム、リンの分析が可能な土壌分析用デバイスの開発を行った。まず、3種の測定対象をそれぞれ個別に分析できる紙デバイスを開発し、それらを融合した同時分析用デバイスを開発した。測定濃度範囲や感度については改良が必要であるが、3種同時分析が可能な紙デバイスの開発に成功した。

B：免疫分析デバイスの開発

本研究開始以前に、我々は世界に先駆けて競合免疫分析用の紙デバイスを開発した。しかし、このデバイスの分析性能は、従来法より劣っており、さらなる高性能化が望まれていた。以前のデバイスは、Y字型の流路構造を持った平面構造をしており、分岐した一方の流路の途中に抗体が固定化されていた。抗体が固定化されることで、一方の流路の疎水性が高くなり、試料が分岐部で等分岐しないことが分析精度を悪くする原因となっていた。そこで本研究では、試料を等分岐することができる3次元流路構造を持つ新しい紙デバイスを開発した（図2）。このデバイスは、紙を積層して3次元流路構造が構築されている。1層目の試料導入部に試料が導入されると、2層目を通して3層目に到達する。3層目で流路は分岐しており、捕捉ゾーンには抗体が固定化されている。抗体を固定化すると流路は疎水性が高くなるため、抗体が固定化されていない流路へ試料がより多く流れていく。そうすると以前のデバイスと同様に分析精度が悪くなってしまうが、開発したデバイスは、2層目に吸水パッドの役目をする親水性領域が設けられていることで、試料が等分岐するように設計されている。開発したデバイスの性能評価として、ピオチンアッセイを行ったところ、検出下限値は5.08 ng/mLとなり、以前のデバイスの検出下限値（0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）より大幅に検出感度が高いことを確認した。さらに、黄体ホルモンであるプロゲステロンのアッセイを行ったところ、検出下限値は84 pg/mLとなり（図3）開発したデバイスでプロゲステロンを高感度に測定できることを実証した。

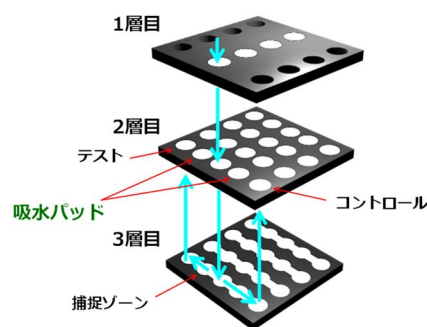


図2 競合免疫分析用デバイス

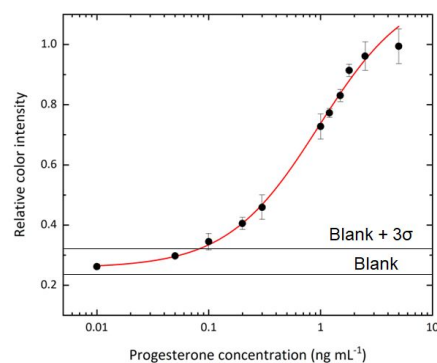


図3 プロゲステロンの検量線

C：細胞アッセイおよび細胞分離デバイスの開発

細胞アッセイのモデルとして、大腸菌を利用したレポーターアッセイを取り上げた。細菌の遺伝子発現を指標とするレポーターアッセイは、化学物質の毒性や結合親和性の評価などに応用されている。しかし、大腸菌を利用したレポーターアッセイは、煩雑で時間を要するため、簡便化・迅速化が望まれている。そこで本研究では、レポーターアッセイが可能な紙デバイスの開発に取り組んだ。ゲルを利用してルシフェラーゼ発現大腸菌を紙デバイスに固定化した。発現誘導物質（イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド：IPTG）の添加24時間後に、基質溶液と溶菌剤の混合溶液を添加して生物発光を測定すると発光強度は増大し、開発した紙デバイスでレポーターアッセイが可能であることを確認した。今後は、固定化菌体の保存安定性やデバイスデザインを検討することで、レポーターアッセイを利用した上記応用が実現すると期待される。

細胞分離のモデルとして、全血から血漿を分離する紙デバイスの開発を検討したが、市販の血漿分離メンブレンを利用することで、目的が達成できることが明らかとなった。

D：教育ツール用デバイスの開発

紙デバイスは、反応試薬があらかじめ流路やチャンバー内に塗布あるいは固定化されており、試料を滴下するだけで廃液もでないという安全性・廃棄性に優れた分析ツールである。測定対象と反応試薬による呈色をデジタル画像として取得し、画像解析することにより定量分析が可能である。そのためリモートラーニング用の教育ツール（理科実験や分析化学実験）としての応用が期待できる。そこで本研究では、自宅で身近な対象であるビタミンC（アスコルビン酸：AA）とpH値を同時分析できる紙デバイスを開発した。従来の紙デバイスは、試料の導入に高精度なピペットが必要であったが、高精度ピペットは高価であり、リモートラーニングに使用するのは現実的ではない。そこで高精度ピペットを使わずに使い捨てスポイトで導入した試料を定量できる流路デザインを考案した（図4）。このデバイスは、試料導入エリアに導入された試料は、流路の最初の分岐部で2分岐し、測定領域に一定量が導入されると、残りの試料は予備エリアに導入される仕組みになっている。実際に試料導入エリアに80～120 μLの試料を導入しても、AAとpH値は一定値を示すことを確認した。市販の飲料2種（AAを含むものと含まないもの）について、開発したデバイスでAA濃度とpH値を測定したところ、精密ピペットを用いて測定した結果と誤差範囲内で一致した。また、これらの結果は従来法（市販キット+プレートリーダーとpHメーター）を用いて測定した結果とも一致した。

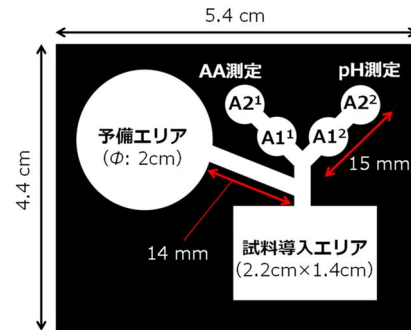


図4 AAとpH同時測定用デバイス

さらに、スポイトも使わずにデバイスの一部を試料に浸漬しただけでAA濃度とpH値が測定可能なデバイスを開発することに成功した（図5）。浸漬時間が3～30秒では浸漬時間に関係なく、AA濃度とpH値は一定の値を示すことを確認した。開発したデバイスの性能を評価するために、市販の飲料6種のAA濃度およびpH値の測定を行った。結果を図6に示す。比較のために従来法による結果も示す。AA濃度については、従来法とすべての試料において測定誤差範囲内で一致した。pH値については、試料Eを除く5種は一致したが、Eは従来法の結果と異なる値を示した。これは、試料Eが濃いオレンジ色をしていることが理由だと思われる。紙デバイスによる定量分析は、試料中の測定対象と反応試薬による呈色に基づいており、試料そのものに色がついている場合は、定量化が困難になる。そのような場合は、試料の希釈や他の検出法（発光法や電気化学検出法など）を検討する必要があると考えられる。このデバイスは、リモートラーニングだけでなく、測定対象を変えることで、オンサイト分析全般に利用することができ、さまざまな応用に展開されることが期待される。

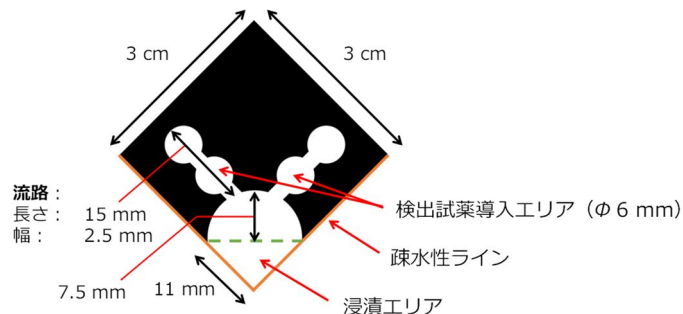


図5 浸漬デバイス

結果を図6に示す。比較のために従来法による結果も示す。AA濃度については、従来法とすべての試料において測定誤差範囲内で一致した。pH値については、試料Eを除く5種は一致したが、Eは従来法の結果と異なる値を示した。これは、試料Eが濃いオレンジ色をしていることが理由だと思われる。紙デバイスによる定量分析は、試料中の測定対象と反応試薬による呈色に基づいており、試料そのものに色がついている場合は、定量化が困難になる。そのような場合は、試料の希釈や他の検出法（発光法や電気化学検出法など）を検討する必要があると考えられる。このデバイスは、リモートラーニングだけでなく、測定対象を変えることで、オンサイト分析全般に利用することができ、さまざまな応用に展開されることが期待される。

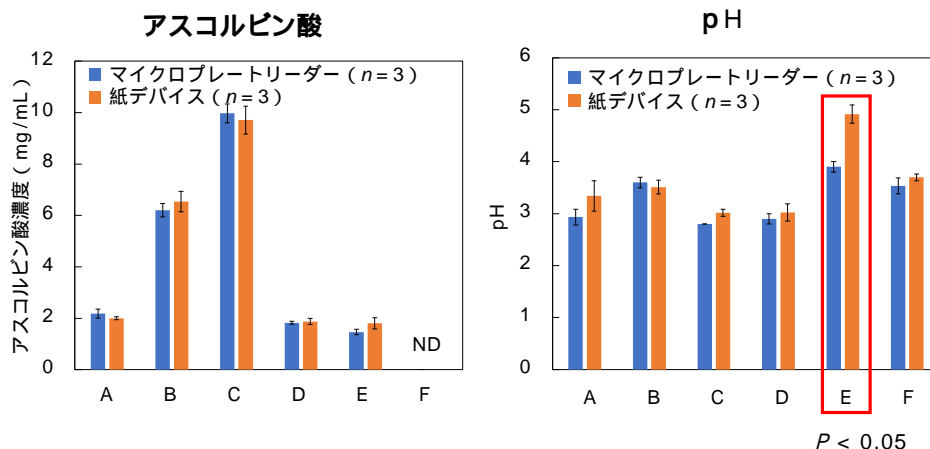


図6 市販飲料6種のAA濃度とpH値の測定結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeshi Komatsu, Yuki Sato, Masatoshi Maeki, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Paper-Based Device for the Facile Colorimetric Determination of Lithium Ions in Human Whole Blood	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 1287 ~ 1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.9b02218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Komatsu Takeshi, Sato Yuki, Maeki Masatoshi, Ishida Akihiko, Tani Hirofumi, Tokeshi Manabu	4. 巻 1144
2. 論文標題 Rapid, sensitive universal paper-based device enhances competitive immunoassays of small molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 85 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2020.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeshi Komatsu, Ryoga Maeda, Masatoshi Maeki, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Dip-Type Paper-Based Analytical Device for Straightforward Quantitative Detection without Precise Sample Introduction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Sensors	6. 最初と最後の頁 1094 ~ 1102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.0c02367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akinori Yamaguchi, Hajime Miyaguchi, Akihiko Ishida, Manabu Tokeshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Paper-Based Analytical Device for the On-Site Detection of Nerve Agents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 6512 ~ 6518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.1c00655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeshi Komatsu, Ryan Russel Gabatino, Harriena Hofilena, Masatoshi Maeki, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi	4. 巻 98
2. 論文標題 Using a Paper-Based Analytical Device Designed for Remote Learning Environments to Achieve Simple Quantitative Colorimetry without Micropipettes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Education	6. 最初と最後の頁 3050 ~ 3054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jchemed.1c00100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeshi Komatsu, Manabu Tokeshi, Shih-Kang Fan	4. 巻 195
2. 論文標題 Determination of Blood Lithium-Ion Concentration Using Digital Microfluidic Whole-Blood Separation and Preloaded Paper Sensors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 113631-1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2021.113631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ahmed A. Shalaby, Chia-Wen Tsao, Akihiko Ishida, Masatoshi Maeki, Manabu Tokeshi	4. 巻 379
2. 論文標題 Microfluidic Paper-Based Analytical Devices for Cancer Diagnosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B	6. 最初と最後の頁 133243-1 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.snb.2022.133243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 渡慶次学	4. 巻 85
2. 論文標題 マイクロ流体デバイスを用いたPOCT	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学工学	6. 最初と最後の頁 80 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 渡慶次学	4. 巻 81
2. 論文標題 オンサイト分析を可能とするペーパーデバイスの開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 10～13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Takeshi Komatsu, Masatoshi Maeki, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi
2. 発表標題 Novel Format of a Paper-Based Device for Competitive Immunoassays
3. 学会等名 The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡慶次学
2. 発表標題 ニューノーマルにおける化学教育への1つのアプローチ
3. 学会等名 第81回分析化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡慶次学
2. 発表標題 SDGsに貢献する分析化学
3. 学会等名 第33回環境工学連合講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manabu Tokeshi
2. 発表標題 Microfluidic Devices for Clinical Applications
3. 学会等名 34th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manabu Tokeshi
2. 発表標題 Paper-Based Devices for the Colorimetric Determination of Lithium Ions in Human Whole Blood
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Society (Pacifichem 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manabu Tokeshi
2. 発表標題 How Microfluidic Devices Can Contribute to Medicine?
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (47th JSID) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Manabu Tokeshi
2. 発表標題 Point of Care Testing Devices for Therapeutic Drug Monitoring
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry (ICPAC 2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 才木陸朗, 石田晃彦, 真栄城正寿, 谷博文, 渡慶次学
2. 発表標題 カリウムイオン定量のための距離ベース紙分析デバイスの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Manabu Tokeshi
2. 発表標題 Microfluidics-Based Therapeutic Drug Monitoring in Blood
3. 学会等名 Pittcon and Exposition (Pittcon 2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷 博文 (Tani Hirofumi) (10271644)	北海道大学・工学研究院・准教授 (10101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石田 晃彦 (Ishida Akihiko) (20312382)	北海道大学・工学研究院・助教 (10101)	
研究協力者	真栄城 正寿 (Maeki Masatoshi) (40744248)	北海道大学・工学研究院・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------