

Title	In Situ Substrate Controlled Electrochemiluminescence Imaging Platform for Bioanalysis
Author(s)	井上, 裕毅
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61728
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 (井上 裕毅)

論文題名

In Situ Substrate Controlled Electrochemiluminescence Imaging Platform for Bioanalysis
 (*In Situ*電気化学発光イメージングを用いたバイオ分析プラットフォーム技術に関する研究)

論文内容の要旨

Electrogenerated chemiluminescence (ECL) is a versatile technique with excellent sensitivity, no background signal, and flexible temporal control. Additionally, installation with optical device extends the spatial resolution to micro meter range. ECL reaction occurring through coreactant pathway require activation by coreactant species which can be electro-generated at the surface of the electrode. The combination of the two phenomena, ECL and substrate generation, realizes synergistic approach to sensitive reagent-less detection platform. By giving micro reaction chamber structure on the electrode surface and collecting enzyme labeled magnetic nanoparticles to the chambers, additional improvement in sensitivity can be achieved. This doctoral thesis demonstrated the use of *in situ* generated substrate for subsequent enzyme reaction immobilized on solid support and imaging of its resultant light emission for detection of few particles.

Chapter one covered the basic theory and fundamentals of electrochemistry as well as ECL. Here, the theory behind the electro-generation of enzyme substrate by oxygen reduction reaction (ORR) at electrode surface was described. Additional topics covered single molecule detection and nano-sized structures for achieving the detection at such scale and briefly covered the emerging field of digital biology.

In chapter two, careful consideration was given to the parameters required for substrate generation and imaging in an effort to construct the reliable substrate generating ECL imaging platform. The ECL profile of ORR to potential dependence and time dependence were revealed. The ECL imaging in multi-chambered and non-chambered electrode were also discussed.

To show the potential of highly sensitive ECL detection, the aforementioned technique was combined with the use of micro size chamber and enzyme modified magnetic nanoparticles for a construction of sensitive reagent-less sensing system. The constructed system achieved detection limit of 90 fM catalase with measurement time of 60 seconds in ambient temperature. Observations were interpreted in view of enzyme kinetics and chemical dynamics within the micro reaction chamber. The two fundamentals worked in concert for the quenching of ECL signal near the bottom of the chamber where the electrode was located.

The fourth chapter showcased examples of the *in situ* substrate generated ECL application in biosensing. The featured examples include measurement of antioxidant capacity using *in situ* generated ROS as target for the antioxidants in food beverages and quenching of ECL image by ascorbic acid in bi-potential mode.

Fifth chapter summarized the topics covered and ends with conclusions and future remarks on the *in situ* ECL imaging technique for bioanalysis.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (井上 裕毅)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	民谷 栄一
	副 査	教授	関谷 毅
	副 査	教授	井上 康志
	副 査	教授	桑畑 進
論文審査の結果の要旨			
<p>本論文では、電気化学発光に着目し、発光基質の生成を時空間的に制御することにより、酵素反応や抗酸化分子と連動したバイオ分析を行うプラットフォームについて検討したもので、以下にそれらの結果をまとめる。</p> <p>(1) ルミノールを用いた電気化学発光に着目し、電極電位により発光基質の生成を制御できることを明らかにした。すなわち、負電位では酸素活性種が、正電位ではルミノール活性種の生成を制御でき、両方の電位を走査することにより、発光反応を制御できることが示された。また、空間的に発光制御するために電極上にマイクロチャンバーを多数形成させ、発光イメージング解析を検討した。その結果、マルチチャンバー構造を用いることで、生成された活性酸素種のマイクロチャンバー内における局在化と濃縮効果をイメージング解析により明らかにした。</p> <p>(2) 次に、構築した発光イメージング系を用いて活性酸素の一種である過酸化水素を分解する酵素カタラーゼの計測を行った。カタラーゼが電気化学的に生成した活性酸素種を基質として反応し、これによりルミノール発光が消光する変化量を計測解析した。遊離状態のカタラーゼでは 190 nm の検出が可能だったが、磁性粒子に固定化することで 90 fm の検出が可能で、10^6 倍以上の高感度化を実現した。この高感度化には、磁性粒子を利用した電極表面での濃縮とマイクロチャンバーでの微小反応量による効果と考えられた。</p> <p>(3) さらに、以上に示した発光基質の反応制御する電気化学発光系を用いて、負電位走査から発生した活性酸素種と抗酸化能力を有する物質との反応により生ずる消光反応を指標に抗酸化能の計測を行った。その結果、抗酸化物質と発光量には逆相関が認められ、抗酸化能の指標物質であるトロロックス分子に対して検量線を作成できることが示された。また、複数の市販の飲料製品の抗酸化能測定を行い、従来法との相関を示すことができた。また、本法により迅速な抗酸化能測定を実現できた。</p> <p>(4) 次に、血清中の糖化アルブミンの測定にこの電気化学発光システムを用いた。ここでは、タンパク分解酵素により糖化アルブミンを分解し、生成する糖化アミノ酸を酸化酵素を用いて過酸化水素を生成させ、電気化学発光により計測した。その結果、血清中の糖化アルブミンを検出下限 $0.1 \mu\text{M}$ で検出できた。これは、従来法と比較して 70 倍の感度向上を達成できた。また、高感度であることから唾液中の糖化アルブミンの測定も可能であることも示された。</p> <p>以上のように、本論文は電極を用いた発光基質反応制御により、電気化学発光型バイオセンサーへの展開を行い、カタラーゼ活性、糖化アルブミンなどの高感度化などを実現したもので、関連する応用物理学研究に貢献するものである。よって本論文は、博士学位論文として価値あるものとして認める。</p>			