



Title	Microwell assist biosensor for neutrophils response cells using localized surface plasmon resonance and luminol - based electrochemiluminescence sensing application
Author(s)	Mohamed Ali, Riyaz Ahmad Bin
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72374
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (RIYAZ AHMAD BIN MOHAMED ALI)	
Title	Microwell assist biosensor for neutrophils response cells using localized surface plasmon resonance and luminol - based electrochemiluminescence sensing application (局在表面プラズモン共鳴とルミノール電気化学発光センシングを用いた好中球細胞の応答解析のためのマイクロウェルバイオセンサー)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Neutrophil has been considered as primary soldier in innate immune system for eliminating invading pathogens. Neutrophil being abundant immune host cell in human blood vessel, several differentiation mechanisms is known to take place engulfing microbes pathogens such as phagocytosis, degranulation, cytokine production and neutrophil extracellular trap (NETs) production. An imbalance in NETs formation (NETosis) and its reactive oxygen species (ROS) produce are associated with autoimmune, inflammatory, metabolic, vasculitis and other diseases. Since every cell possess unique differentiation character, it is very important to monitor individual neutrophils' NETosis and ROS production release. Single cell analysis technique provides remarkable capacity for understanding sole cell characteristic rather than commonly used average measurement from bulk population cells. Therefore, by manipulating neutrophil into singular manner, it is possible to further understand cell biology mechanism for the improvement of early disease diagnosis and regular healthcare activities.</p> <p>In this work, single cell analysis of neutrophils cell activity of formation of NETs and the release of ROS was quantified using localized surface plasmon resonance (LSPR) and luminol – based electrochemiluminescence (ECL) observation technique was performed, respectively. Neutrophil cells were extracted from healthy blood donor and suspended in D-PBS(-) media. For NETosis analysis, simple microengraving platform was realized with microwell array (MWA) sheet on plasmonic sensing substrate for LSPR observation. Introduction of microwell structure provide good segregation phenomena without perturb surrounding cells. Activated neutrophil cell undergoes single cell isolation before quantified using hyperspectral imaging system for absorbance spectrum observation. Real time monitoring of NETs release and its absorbance spectrum change are reported in this study. On the other hand, the ROS release was realized by using microwell enhanced luminol based ECL biosensor. Here, neutrophil cells were introduced between dual electrode (working and counter electrode) before trapping using microwell structure. The quenching of ECL imaging localized inside microwell electrode was examine as successful reaction between produced ROS and luminophore electrochemical reaction. As extension of this study could monitor the degradation of the NETs release and ROS production which can be proven useful for autoimmune disease detection and pathogenesis elucidation.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Riyaz Ahmad Bin Mohamed Ali)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	民谷 栄一
	副 査	教授	藤田 克昌
	副 査	教授	関谷 毅
	副 査	教授	竹内 俊文 (神戸大学大学院工学研究科)

論文審査の結果の要旨

本論文では、免疫システムにおいて病原体を排除する好中球細胞の防御機構に着目し、1細胞を配置できるマイクロ構造デバイスとその場で局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) と電気化学発光 (ECL) の測定を可能とする細胞計測システムを開発するもので、以下にそれらの結果についてまとめる。

- (1) 好中球細胞が有する防御機構であるネットシスでは、細胞外へ放出されるクロマチン (タンパク-DNA 複合体) や活性酸素分子による病原体排除が重要とされている。そこで、細胞外へ放出される分子群をモニタリングするために LSPR デバイスと細胞を捕捉するマイクロチャンバー構造とをハイブリッドした計測システムを創成した。LSPR は、酸化アルミニウムの電解より作製したナノホールアレイを鋳型として、これをサイクリックオレフィンポリマーにインプリントし、ナノピラー構造を作製した。これに金をスパッタすることにより LSPR デバイスとした。また、1細胞を捕捉するマイクロチャンバーアレイ構造は、リソグラフィーにより作製した鋳型を用いてポリジメチルシロキサン樹脂に薄膜状に作製し、これを LSPR デバイスに接着することによりナノ構造とマイクロ構造を有するハイブリッドデバイスを創成した。
- (2) 作製したハイブリッドデバイスを用いて好中球細胞のネットシスの計測評価を行なった。細胞濃度 6.0×10^5 cells/mL を用いて細胞をマイクロチャンバーアレイ上に配置したところ、36.3% のチャンバーに1細胞が配置された。次にネットシスを誘導するホルボールエステルを用いて経時的に LSPR による吸収ピーク波長の変化量を測定したところ、2-4 時間誘導後に 1.5nm 程度低波長側にシフトした。また、観測した細胞の 36.7%においてこうした低波長シフトが示された。
- (3) 次に、好中球細胞が生成する活性酸素を計測するためにルミノール電気化学発光デバイスと1細胞捕捉マイクロ構造デバイスとのハイブリッドデバイスを作製した。電気化学発光計測には、ガラス基板にスパッタした金電極とインジウム-酸化スズの透明電極の2極系で行なった。マイクロチャンバーアレイは、金電極-ガラス基板上に作製した。1.4V 電圧印加条件で 10nM の過酸化水素の高感度検出が可能であった。実際のヒト好中球細胞を用いて計測したところ、活性化 10 分後に電気化学発光の増大が観測され、活性酸素応答の1細胞レベルでの計測の可能性が示された。

以上のように、本論文は、1細胞を配置できるマイクロ構造デバイスとその場で局在表面プラズモン共鳴と電気化学発光の測定を可能とする細胞計測システムを創成し、これを好中球細胞のネットシス生体防御活性の計測へと応用したもので、生体分析研究の基盤を構築するとして評価でき、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認める。