

セルのような数十 nm 程度の構造が存在する<sup>28)</sup>。以上より、THz 分光の食品分析ツールとしての有効性を検討する材料としてチーズが適当であると考えた。しかし、乳製品の品質評価への試みは未だ報告されていない。そこで本研究では、THz 波によるチーズの分光測定と情報解析を目的とし、分光スペクトルと成分含量やタンパク質構造との関係について検討した。

まず、FT-IR による透過測定を数種類のチーズについて行った。これらの測定結果と文献値<sup>29)</sup>における水分、タンパク質および脂質含量との相関関係を調べた。さらに、製造メーカーの異なるカマンベールチーズ 8 種、ゴーダチーズ 4 種、マスカルポーネチーズ 4 種について、切片を作製して赤外分光器での透過測定に供した後、水分(常圧加熱乾燥法)、タンパク質(ケルダール法)および脂質量を定量<sup>30)</sup>し、透過スペクトルの解析結果と比較した。同時にタンパク質・脂質二重染色法を用いたチーズ試料の組織観察<sup>31)</sup>を行い、透過スペクトルとの比較をいった。図4にカマンベールチーズ、ゴーダチーズ、マスカルポーネチーズ3種類の吸光度スペクトルを示す。また、図5にタンパク質、脂質と 225 cm<sup>-1</sup> の吸光度との相関を調べた結果を記す。一連の実験結果から、タンパク質含量の増加に伴う吸光度の上昇、種類によるスペクトル形状の違いが確認された。種類を限定して行った透過測定からは、吸光度とタンパク質や脂質含量間にはっきりとした相関性が確認され、THz 分光を利用した定量分析技術の可能性が示唆された。

種類ごとに透過スペクトルの形状に特徴があることも確認されたことから、アセトンやエタノールで脱脂処理した前後でスペクトルの比較を行ったが、スペクトル形状に変化はなく、バターのスぺクトルとも一致しなかった。そのため、この形状はタンパク質に起因すると推察された。さらに、カゼインの吸収スペクトルとも一致しないため、この形状はタンパク質の形成する組織構造あるいは発酵過程で生じた微量成分由来であると考えられた。また、一部のカマンベールチーズには食塩の吸収と一致するピークも見られ、今回は考慮しなかった微量成分や熟成度の違いなどの要素も影響していると考えられる。以上より、チーズの成分・構造の評価系として、THz 帯の分光情報を利用した品質分析の可能性が示された。

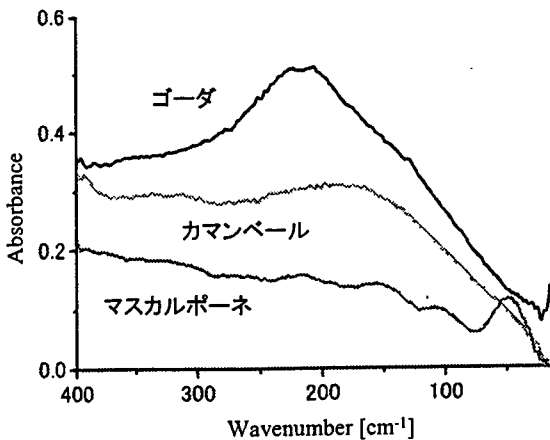


図4 種類の異なるチーズの吸光度スペクトル (サンプル厚 50 μm)

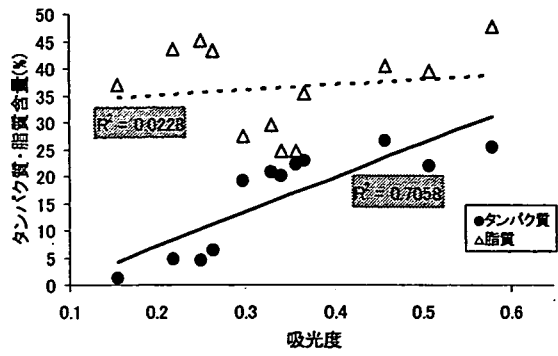


図5 タンパク質・脂質含量と吸光度の相関

### 3. 金属メッシュを用いた生体高分子のセンシング

現在、食品分析の分野において、食肉や鮮魚のタンパク質や DNA といった生体高分子は分析のターゲットであり、食の安全・安心を守る上で偽装表示のチェックや産地特定、病原菌・アレルギー検査など多くの場面で検査が行われるようになっている。我々は、このような検査での利用を目指した金属メッシュを用いた生体高分子の相互作用検知に関する研究を行っている。金属メッシュは、エレクトロフォーミング(電鍍)法によって様々なサイズのもの既に市販されており入手が容易であり、本研究では約 6 μm の厚みを持つ金属メッシュをセンサー部材として利用した。なお、今回実験で使用したメッシュの材質はニッケルである。このような金属性メッシュの透過特性は、赤外領域において古くから実験的な解析<sup>32), 33)</sup>が行われ、機構的なパラメータと透過特性の関係が報告されている。

図6に FT-IR で測定を行なった金属メッシュの透過スペクトルと、赤外領域での実験的解析結果から導き出された計算手法<sup>34), 35)</sup>を元に、金属メッシュの透過特性を計算した結果を示す。この金属メッシュは、グリッド間隔(g)が 63.5 μm、開口形状は四角形で、1 辺が 45 μm である。本測定を行った FT-IR は、サンプルに対して集光光学系となっており、また、金属メッシュ表面でのスポットの直径は約 5 mm である。金属メッシュの開口サイズと波長が同程度の場合、透過率は開口率を上回っている。このような異常透過現象は、表面プラズモンが金属表面に励起されるために起こる現象と考えられる。また、透過率が急激に減少するディップ(谷)がみられる。このようなディップは、THz 波が金属メッシュに対して斜入射の場合に観察され、斜入射の際に金属表面に励起された表面波のモードの分裂によって生じるものと考えられる<sup>36)</sup>。さらに、このような透過特性は、金属メッシュ上にサンプルを載せた場合、その量に応じて低周波側へシフトする現象が観測される<sup>37)</sup>。この結果、先述の急峻なディップを利用することで高感度なセンシングが可能となる。そこで本実験では、生体高分子を直接金属メッシュ上に塗布し、その量に応じたディップ部の周波数のシフトを観測することとした。

このとき、サンプルの定量的な塗布は本実験を行う上で重要な点である。インクジェットプリンタはすでに DNA

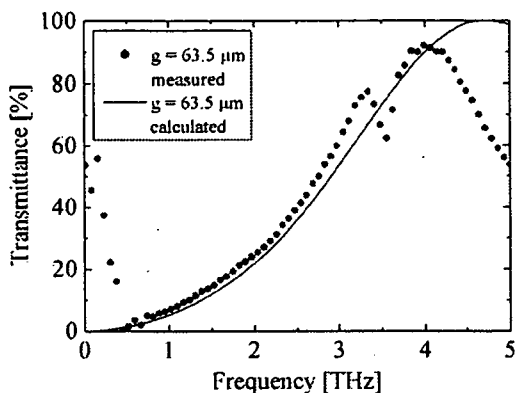


図6 金属メッシュの透過率測定結果と文献をもとにした計算値の比較

の固定などに使用されており、微量な液滴を均一に塗布する上で優れた性能を持つ。そこで本実験では、金属メッシュにプリンタで直接ペルオキシダーゼを塗布し、FT-IRにて透過スペクトルを測定した。

実験試料として、標識酵素として広く用いられているペルオキシダーゼ(ナカライテスク株式会社 免疫化学用 凍結乾燥粉末)を滅菌蒸留水に溶解させ 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml の濃度に調製したものを使用した。この試料を均一かつ定量的に塗布するため、市販のインクジェット方式のプリンタ(Canon Pixus 860i)を使用し、画像処理ソフトで画面上の描画濃度を調整することでプリンタのインク吐出量を調整し、金属メッシュ( $g: 76.3 \mu\text{m}$ , 開口サイズ:  $58 \mu\text{m}$ ,  $t: 6 \mu\text{m}$ )に塗布した。

図7にペルオキシダーゼの塗布量を変化させた場合の、金属メッシュのディップ周波数を示す。本図は、ディップ部分について Lorentz 関数を施し、近似曲線から求めたディップの周波数と塗布したペルオキシダーゼ量の関係を示している。300  $\text{pg}/\text{mm}^2$  のときは透過特性の変化は観察されなかったが、500  $\text{pg}/\text{mm}^2$  から 2100  $\text{pg}/\text{mm}^2$  の3段階の濃度で薄型金属メッシュ単体と比較して透過特性の低周波数側へのシフトが確認できた。1100  $\text{pg}/\text{mm}^2$  のときシフト量は最大になり、さらに濃度を上げてもシフト量が増加しないことが観察された。2100  $\text{pg}/\text{mm}^2$  のときにディップ周波数が高周波側に移動した理由としては、塗布したペルオキシダーゼが不均一となっ

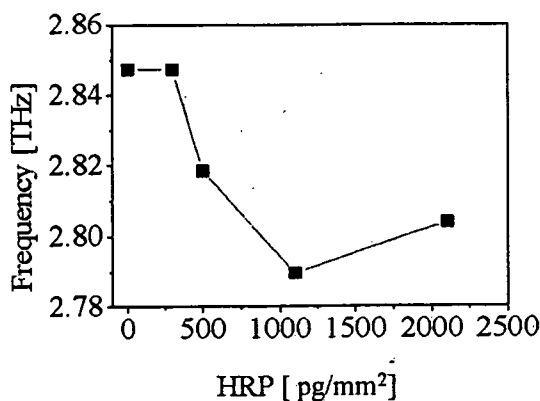


図7 ディップ周波数のシフトの様子

たためと予想される。一方で、500  $\text{pg}/\text{mm}^2$  のペルオキシダーゼが検出されたことから、金属メッシュによる検出は従来法に匹敵する十分な感度を備えていることが分かった。

#### 4. おわりに

食の安全・安心を確保することを目標とした研究には、品質を守る技術や偽装を見破る技術、危険な食品から身を守る検査技術など様々な切り口のものと考えられる。本報では特に、品質検査に関する THz 波の応用と、将来的にはアレルギー検査や BSE 検査などでの応用を目指した THz 波応用を提案した。これらは、まだ研究段階ではあるが、将来的にこの分野の産業に貢献できるかどうかは、THz 技術の向上や低コスト化にかかっていると断言しても過言ではない。安く簡便に分析できることが、食の安全・安心を守る技術に最も大切な要素であることを認知しておくことが重要である。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり、東北大学農学部の形態機能学分野の山口高弘教授ならびに動物資源化学分野の齋藤忠夫教授、機能分子解析学分野の宮澤陽夫教授、理化学研究所テラヘルツイメージング研究チームの大谷知行チームリーダー、名古屋大学エコピア科学研究所の川瀬晃道教授、信州大学理学部の宮丸文章助教、岩手大学工学部土岐規仁准教授に御協力いただきました。また、当研究室の林伸一郎助教、学生の皆様の日頃の研究活動に心より感謝申し上げます。また、本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金萌芽的先端医療技術推進研究事業よりサポートされました。

- [1] M. van Exter and D. Grischkowsky, *Physical Review B*, **41**, 12140, 1990.
- [2] M. Hangyo, T. Nagashima and S. Nashima, *Meas. Sci. Technol.*, **13**, 1727, 2002.
- [3] V. P. Wallace, P. F. Taday, A. J. Fitzgerald, R. M. Woodward, J. Cluff, R. J. Pye and D. D. Arnone, *The Royal Society of Chemistry*, **126**, 255, 2003.
- [4] M. Brucherseifer, M. Nagel, P. H. Bolivar, H. Kurz, A. Bosserhoff and R. Büttner, *Appl. Phys. Lett.*, **77**, 4049, 2000.
- [5] M. Nagel, P. H. Bolivar, M. Brucherseifer, H. Kurz, A. Bosserhoff and R. Büttner, *Appl. Phys. Lett.*, **80**, 154, 2002.
- [6] S. P. Mickan, A. Menikh, H. Liu, C. A. Mannella, R. MacColl, D. Abbott, J. Munch, and X.-C. Zhang, *Phys. Med. Biol.*, **47**, 3789, 2002.
- [7] B. Ferguson and X.-C. Zhang, *Nature materials*, **1**, 26, 2002.
- [8] M. R. Querry, D. M. Wieliczka, D. J. Segelstein, *Handbook of Optical Constants of Solid II*, Edited by Edward D. Palik, Academic Press, San Diego, 1059, 1998.
- [9] J. A. Troller, J. H. B. Christian, *Water Activity and Food*, Academic Press, Tokyo, 1978.
- [10] 藤田 哲, 食用油脂, 幸書房, 2000.

- [11] 小原哲二郎, 食用油脂とその加工, 建帛社, 1987.
- [12] 上平恒, 多田羅恒雄, 水の分子生理 第1版, p. 20, メディカルインターナショナル, 1998.
- [13] M. Ishimura, H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **63**, 1, 1990.
- [14] S. Okouchi, T. Moto, Y. Ishihara, H. Numajiri, H. Uedaira, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **72**, 1853, 1996.
- [15] Y. Nozaki, C. Tranford, *J. Biol. Chem.*, **246**, 2211, 1971.
- [16] H. G. Brittain, *Polymorphism in pharmaceutical solids*, Marcel Dekker, New York, 1999.
- [17] H. P. Stahl, *Towards Better Safety of Drugs and Pharmaceutical Products*, Edited by D. D. Braimar, p. 265, Elsevier, Amsterdam, 1980.
- [18] N. Khalafallah, S. A. Khalil, M. A. Moustafa, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 861, 1974.
- [19] A. A. Ali, A. Farouk, *Int. J. Pharm.*, **9**, 239, 1981.
- [20] A. J. Aguiar, J. E. Zelmer, *J. Pharm. Sci.*, **58**, 983, 1969.
- [21] A. K. Salameh, L. S. Taylor, *J. Pharm. Sci.*, **95**, 446, 2006.
- [22] M. Walther, P. Plochocka, B. Fischer, H. Helm, P. U. Jepsen, *Biopolymers*, **67**, 310, 2002.
- [23] M. Walther, B. Fischer, M. Schall, H. Helm, P. U. Jepsen, *Chem. Phys. Lett.*, **332**, 389, 2000.
- [24] P. C. Upadhyaya, Y. C. Shen, A. G. Davies, E. H. Linfield, *J. Biol. Phys.*, **29**, 117, 2003.
- [25] G. M. Brown, H. A. Levy, *Science*, **147**, 1038, 1965.
- [26] J. F. Frank, G. S. Birth, *Journal of Dairy Science*, **65**, 1110, 1982.
- [27] 中澤勇二, 細野明義, 新説チーズ科学, 食品資材研究所, 1989.
- [28] 伊藤敏敏, 渡邊乾二, 伊藤良, 動物資源利用学, 文永堂出版, 1998.
- [29] 五訂増補 日本食品標準成分表, 文部科学省 ([http://www.mext.go.jp/b\\_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031802.htm](http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031802.htm)), 2005.
- [30] 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針 理化学編 2005, 社団法人 日本食品衛生協会, 2005.
- [31] 長縄貴直, 渡邊康一, 神崎文次, 太田智章, 虻川久美子, 細野明義, 山口高弘, *ミルクサイエンス*, **51**, 33, 2002.
- [32] R. Ulrich, *Infrared Physics*, **7**, 37, 1967.
- [33] R. Ulrich, K. F. Renk and L. Genzel, *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, **11**, 363, 1963.
- [34] C. C. Chen, *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, **21**, 1973.
- [35] S. W. Lee, *IEEE Trans. Antennas Propagat.* **19**, 656, 1971.
- [36] H. F. Ghaemi, T. Thio, D. E. Grupp, T. W. Ebbesen, H. J. Lezec, *Physical Review B*, **58**, 6779, 1998.
- [37] F. Miyamaru, S. Hayashi, C. Otani, K. Kawase, Y. Ogawa, H. Yoshida and E. Kato, *Opt. Lett.*, **31**, 1118, 2006.

## テラヘルツ計測・イメージング応用

小川雄一・林伸一郎

東北大学大学院農学研究科・連絡先 E-mail: yogawa@bios.tohoku.ac.jp

### 1. はじめに

世界中でテラヘルツ (THz) 波の応用研究が盛んに行われ、光源開発など新しい技術開発以外にも、数多くの応用可能性が報告されている。その中でも THz 波ならではの利用法が見出されつつあり、その応用開拓の動向に注目が向けられている。例えば、THz 帯の分光スペクトルは多くの物質で既に見出されており、半導体や結晶多形の評価など赤外域とは異なる利用方法が期待されている。また、最近では生体高分子をターゲットとした研究も注目されており、蛍光標識を用いることなく DNA のハイブリダイゼーションや抗原抗体反応をセンシングできるため、生体高分子などのラベルフリーセンシングに関する研究が報告されている。そこで本報では、当研究室で進めている THz 波の計測およびイメージング応用研究として、食品分析、バイオセンシング、文化財修復への応用について紹介する。

### 2. 食品の品質評価への応用

#### 2.1 食用油中の水分計測

食品中の水は、食品の品質や味、貯蔵、酵素活性、微生物の成長などに影響を与えるため、食品中の水分を測定することは重要な意味を持つことから現在までに様々な水分計測法が確立されている。食用油中の水分は加水分解の原因となるため、日本農林規格 (JAS) により水分量は 0.3% 以下であることが定められており、その水分量の測定法として JAS はカールフィッシャー法を定めている。本手法は滴定フラスコ内で試料を脱水溶剤に溶解し、試料中の水分を抽出した後、ヨウ素、二酸化硫黄、塩基を主成分としたカールフィッシャー試薬 (滴定溶剤) で滴定することにより水分量を求める方法である。このため、分析には有機溶剤を用いた抜き取り検査が必要となる。一方、THz 帯において、油は水よりも高い透過性を示すことが知られている。そこで微量な水分を含む食用油について、遠赤外

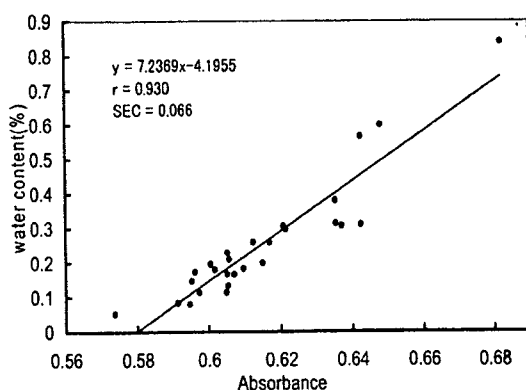


図1 カールフィッシャー法による分析結果と吸光度 (@ 50 cm<sup>-1</sup>) の相関

用のフーリエ変換式分光光度計 (以下、FT-FIR) を用いて透過測定を行い、既存のカールフィッシャー法と THz 帯の吸光度との相関を調べた。その実験結果を図1に示す。

本実験は光路長が 1 mm の石英セルを用いて透過測定を行っており、検量線の作成には、1.5 THz での吸光度を用いている。この結果、JAS により定められている 0.3% 以下の水分量においても相関が認められる。本技術は従来の有機溶剤や抜き取り検査を不要とし、容器越しの測定が可能であることから、今後品質管理のための食用油脂中の水分計測での応用が考えられる。

#### 2.2 チーズの分光測定

近年の生産規模の拡大と食の安全に対する意識向上を背景として、より迅速な検査への需要が高ま

っている。このことを受け、簡便で試薬を必要としない赤外・近赤外領域の電磁波を利用した分析手法が研究されてきた。この方法は分子内結合を観測するもので、生乳の成分分析では米国の公定法として認められているなど既に実用化がなされている。チーズは欧米では一般的な食材であり、品質評価に関しても幅広く研究が進められている。主成分である水分、タンパク質、脂質は THz 領域ではそれぞれ吸収の度合いが異なる。また、チーズには脂肪球やカゼインミセルなど数十  $\mu\text{m}$  から数十  $\text{nm}$  程度の構造が存在する。そこで本研究では、THz 波によるチーズの分光測定と情報解析を目的とし、分光スペクトルと成分含量や波長と同程度のタンパク質構造との関係について検討した。

まず、FT-FIR による透過測定を数種類のチーズについて行った。これらの測定結果と文献値における水分、タンパク質および脂質含量との相関関係を調べた。さらに、製造メーカーの異なるカマンベールチーズ 8 種、ゴーダチーズ 4 種、マスカルポーネチーズ 4 種について、切片を作製して赤外分光器での透過測定に供した後、水分（常圧加熱乾燥法）、タンパク質（ケルダール法）および脂質量を測定し、透過スペクトルと比較した。同時にタンパク質・脂質二重染色法を用いたチーズ試料の組織観察も行った。図 2 にカマンベールチーズ、ゴーダチーズ、マスカルポーネチーズ 3 種類の吸光度スペクトルを示す。一連の実験結果から、タンパク質含量の増加に伴う吸光度の上昇、種類によるスペクトル形状の違いが確認された。種類を限定して行った透過測定からは、吸光度とタンパク質や脂質量間にはっきりとした相関性が確認され、THz 分光を利用した定量分析技術の可能性が示唆された。

種類ごとに透過スペクトルの形状に特徴があることも確認されたことから、アセトンやエタノール

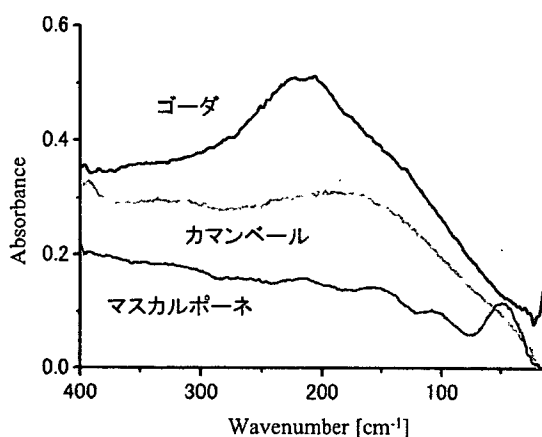


図 2 種類の異なるチーズの吸光度スペクトル  
(サンプル厚 50  $\mu\text{m}$ )

で脱脂処理した前後でスペクトルの比較を行ったが、スペクトル形状に変化はなく、タンパク質を含まないバターとのスペクトルとも一致しなかった。そのため、この形状はタンパク質に起因すると推察された。さらに、チーズの主たるタンパク質であるカゼインの吸収スペクトルとも一致しないため、この形状はタンパク質の形成する組織構造あるいは発酵過程で生じた微量成分由来であると考えられた。また、一部のカマンベールチーズには食塩の吸収と一致するピークも見られ、今回は考慮しなかった微量成分や熟成度の違いなどの要素も影響していると考えられる。以上より、チーズの成分・構造の評価系として、THz 帯の分光情報を利用した品質分析の可能性が示

された。

### 3. 非標識イムノアッセイ法

我々は、金属メッシュを用いた生体高分子の相互作用検知に関する研究を行っている。金属メッシュは、エレクトロフォーミング（電鑄）法によって様々なサイズのものが既に市販されており、本研究では約 6  $\mu\text{m}$  の厚みを持つ金属メッシュをセンサー部材として利用した。なお、今回実験で使用したメッシュの材質はニッケルである。このような金属性メッシュの透過特性は、赤外領域において古くから実験的な解析が行われ、機構的なパラメータと透過特性の関係が報告されている。

図 3 に FT-FIR で測定を行なった金属メッシュの透過スペクトルと、赤外領域での実験的解析結果から導き出された計算手法を元に、金属メッシュの透過特性を計算した結果を示す。この金属メッシュは、グリッド間隔 (g) が 63.5  $\mu\text{m}$ 、開口形状は四角形で、1 辺が 45  $\mu\text{m}$  である。本測定を行った FT-FIR は、サンプルに対して集光光学系となっており、また、金属メッシュ表面でのスポットの直径は約 5 mm

である。金属メッシュの開口サイズと波長が同程度の場合、透過率は開口率を上回っている。このような異常透過現象は、表面プラズモンが金属表面に励起されるために起こる現象と考えられる。また、透過率が急激に減少するディップ（谷）がみられる。このようなディップは、THz 波が金属メッシュに対して斜入射の場合に観察され、斜入射の際に金属表面に励起された表面波のモードの分裂によって生じるものと考えられるが、その詳細はまだ明確になっていない。さらに、このような透過特性は、金属メッシュ上にサンプルを載せた場合、その量に応じて低周波側へシフトする現象が観測され、先述の急峻なディップを指標とすることで、感度よくセンシングできる。そこで本実験では、生体高分子を直接金属メッシュ上に塗布し、その量に応じたディップ部の周波数のシフトを観測することとした。このとき、サンプルの定量的な塗布は本実験を行う上で重要な点である。インクジェットプリンタはすでに DNA の固定などに使用されており、微量な液滴を均一に塗布する上で優れた性能を持つ。そこで本実験では、金属メッシュにプリンタで直接ペルオキシダーゼを塗布し、FT-FIR にて透過スペクトルを測定した。

実験試料には、標識酵素として広く用いられているペルオキシダーゼ（ナカライテスク株式会社 免疫化学用 凍結乾燥粉末）を滅菌蒸留水に溶解させたものを使用した。この試料を均一かつ定量的に塗布するため、市販のインクジェット方式のプリンタ（Canon Pixus 860i）を使用し、画像処理ソフトで画面上の描画濃度を調整することでプリンタのインク吐出量を調整し、金属メッシュ（ $g: 76.3 \mu\text{m}$ , 開口サイズ： $58 \mu\text{m}$ ,  $t: 6 \mu\text{m}$ ）に塗布した。

図 4 にペルオキシダーゼの塗布量を変化させた場合の、金属メッシュのディップ周波数の変化を示す。

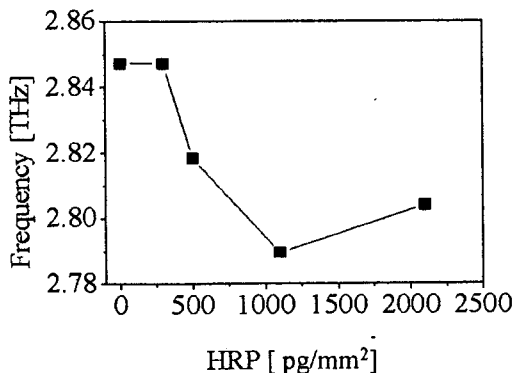


図 4 ディップ周波数のシフトの様子

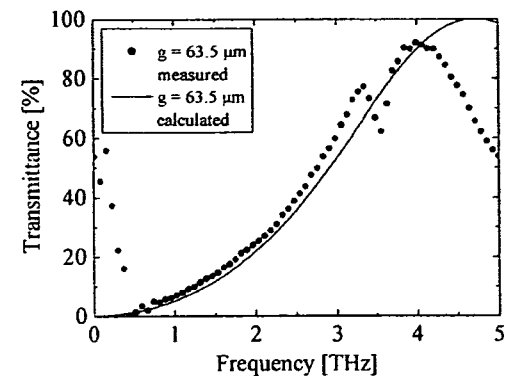


図 3 金属メッシュの透過率測定結果と文献をもとにした計算値の比較

す。本図は、ディップ部分について Lorentz 関数を施し、近似曲線から求めたディップの周波数と塗布したペルオキシダーゼ量の関係を示している。300  $\text{pg}/\text{mm}^2$  のときは透過特性の変化は観察されなかったが、500  $\text{pg}/\text{mm}^2$  から 2100  $\text{pg}/\text{mm}^2$  の 3 段階の濃度で薄型金属メッシュ単体と比較して透過特性の低周波数側へのシフトが確認できた。1100  $\text{pg}/\text{mm}^2$  のときシフト量は最大になり、さらに濃度を上げてシフト量が増加しないことが観察された。2100  $\text{pg}/\text{mm}^2$  のときにディップ周波数が高周波側に移動した理由としては、塗布したペルオキシダーゼが不均一となったためと予想される。

#### 4. 文化財修復への応用 — さまざまな絵画材料の分光スペクトル —

文化財の修復には、まず対象となる文化財の情報収集を行い、その結果を元に検討された最適な修復法が選択され行われている。また、学術的にも当時の顔料や展色材の分析が精力的に行われ、そこにはさまざまな化学分析的手法が導入されている。電磁波を用いた分析法としては、X 線や紫外、可視光、近赤から赤外まであらゆる手法が利用されている。しかしそれぞれには被曝による劣化や変質の問題やサンプリングによる破壊を要するなど、いくつかの問題を抱えている。そこで我々は、文化

財修復への THz 波の利用を目指し、100 種類以上のさまざまな顔料や展色材の分光スペクトルの測定を行った。

測定に用いた顔料は特殊な場合を除き Zecchi 社製で、テラヘルツ帯ではほとんど吸収のないプラスチック板にペトロールで溶いたものをサンプルピースとして作製した。その結果、例えば、白色顔料である Lead white と Titan white を比較すると、まったく異なる透過スペクトルが観察された (図 5)。白は 19 世紀に亜鉛化合物が作られるまでは鉛白が用いられ、最近になってチタン化合物が多く用いられるようになったことから、絵画が描かれた時代などを知る手がかりとなることが期待される。また、メーカーによっては体質材として用いられている炭酸カルシウムが混在していることも観測された。

実際の修復前調査では、赤外線や紫外線での写真撮影が行なわれる。そこで直接比較しやすいよう THz スペクトルを、3 周波数領域に分割し、各領域に RGB の値を与える疑似カラー表示を導入した。図 6 は、既知の顔料で描いた絵を可視光と THz 波で透過観測した例である。人物に用いられている赤色は有機物由来の顔料で、背景は無機顔料である。このような違いが THz 帯の分光スペクトルを利用することで容易に判別できることが示された。

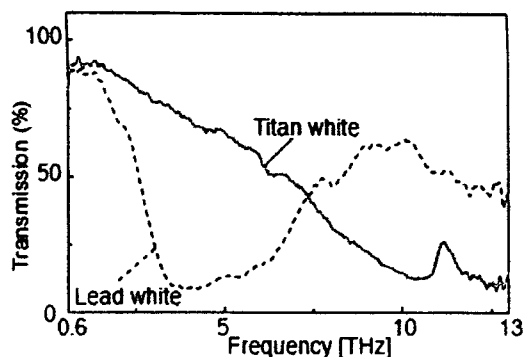


図 5 白色顔料の透過スペクトル



図 6 可視光画像と THz 波画像 (疑似カラー)

## 5. おわりに

本報で紹介した研究はいずれも可能性を示した段階で、今後更なる詳細な検討を必要とするものである。しかしこのような研究の中には、従来の電磁波では困難とされていた測定が THz 波を用いることで容易に行えるようになった例も存在する。これらは THz 波の発生、検出技術の向上と共に社会に広く役立つ技術になることが期待される。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、メンブレンアレイの作成には東北大学の及川雅人准教授、顔料、展色材サンプルの測定には情報通信研究機構の福永香主任研究員、THz-TDS イメージングシステムによる実験は、理化学研究所の大谷知行チームリーダーに御協力いただきました。名古屋大学エコトピア科学研究所の川瀬晃道教授、信州大学理学部の宮丸文章助教には金属メッシュのセンシングについて助言いただきました。深く感謝いたします。また、本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金萌芽的先端医療技術推進研究事業よりサポートされました。

## 金属メッシュを用いた生体高分子の相互作用検出

川井泰英<sup>(1)</sup>・吉田永<sup>(1)</sup>・林朱<sup>(2)</sup>・林伸一郎<sup>(1)(2)</sup>・宮丸文章<sup>(3)</sup>  
宮澤陽夫<sup>(1)</sup>・川瀬晃道<sup>(1)(2)(4)</sup>・小川雄一<sup>(1)</sup>

(1)東北大院農、(2)理化学研究所、(3)信州大理学部物理、(4)名大エコトピア科学研

【目的と背景】抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法（イムノアッセイ法）は、実験室だけでなく臨床検査の分野でも広く利用されている。メンブレン上のタンパク質の検出は主に標識抗体の特異的な結合により行われ、高感度な検出が行える反面、標識過程の操作が煩雑であり、長い検査時間を有するという問題点がある。本研究ではテラヘルツ(THz)波と、薄い金属製のメッシュシートを組み合わせることで、タンパク質検出の基本原理である抗原抗体反応を非標識（ラベルフリー）で行う技術確立し、その技術を利用した『生体高分子の相互作用検出』を実現することを目指している。

現在、タンパク質検出の方法として、メンブレン上にタンパク質を吸着・固定した上で免疫学的測定を行うという手法が広く用いられている。メンブレンとはタンパク質を吸着する性質を持つ高分子膜で、PVDF製のものが一般的である。PVDFメンブレンは多孔質な形状をしており、テラヘルツ波帯において高い透過性を示す。

一方、古くから赤外領域で光学素子として利用されてきた金属メッシュは、開口近傍の複素屈折率の変化を透過特性の変化として高感度に検出する性質をもっている。メンブレンにタンパク質が吸着すると、メンブレンの間隙がタンパク質で埋まり、屈折率が大きくなる方向に変化する。本実験では、金属メッシュ（格子定数：76.3  $\mu\text{m}$ ，線幅：18.3  $\mu\text{m}$ ，厚み：6  $\mu\text{m}$ ）上にメンブレンを密着させ、そのメンブレンの複素屈折率の変化による透過特性の変化を観測することで、生体高分子の高感度な検出が可能であると考えた。

【方法と結果】生体高分子の相互作用検出を行うにあたり、そのモデルとして、ストレプトアビジン-ビオチン結合の検出を試みた。ストレプトアビジン-ビオチン結合は特異的で非共有結合でありながら、結合定数が  $K_a=10^{15} \text{ M}^{-1}$  と非常に強固であることから、モデルサンプルに適していると考え使用した。測定には測定帯域をテラヘルツ帯に特化したFTIRを用いた。実験の結果ビオチン 6.5  $\text{ng}/\text{mm}^2$  (25  $\text{pmol}$ ) についてストレプトアビジン-ビオチン相互作用のラベルフリー検出が可能であることが明らかとなり、メンブレン上での  $\text{pmol}$  オーダーのタンパク質反応の検出が可能であることが示唆された。（図1）これは、物質の吸収による単純な透過測定では検出できない量であった。

また、本報ではインクジェットプリンタを用いた定量実験や、印刷によって作成した金属メッシュの諸特性についても報告する。

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業のサポートにより行われました。

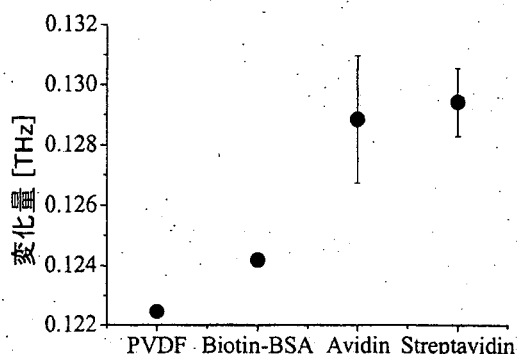


図1. 結合による透過特性の変化



## 金属メッシュによるタンパク質のラベルフリー検出

吉田 永\* 川井 泰英\* 林 伸一郎\*\* 小川 雄一\*

\*東北大学大学院農学研究科 〒981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

\*\*理化学研究所 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

E-mail: yoshida\_h@bios.tohoku.ac.jp

あらまし 我々は次世代の分析ツールとして、テラヘルツ波と金属メッシュを組み合わせた新しいセンシング法の開発を行っている。このセンシング法は金属メッシュの透過スペクトルが、金属メッシュ上の試料の屈折率によって低周波数側にシフトすることを利用しており、この方法により現在標識物質を使用して行われているタンパク質の検出を非標識（ラベルフリー）で行うことが可能になる。

本研究ではまず酵素の一種であるペルオキシダーゼを試料としてこのセンシング法による検出を試みた。その結果ペルオキシダーゼ 500 pg/mm<sup>2</sup>(11 fmol)の検出が可能であった。このとき試料の塗布には市販のインクジェットプリンタを使用した。さらにタンパク質の固定に広く用いられているPVDFメンブレンと金属メッシュを組み合わせて、メンブレン上のタンパク質反応の検出を試みた。その結果ビオチン 650 pg/mm<sup>2</sup>(2.5 pmol)のストレプトアビジン-ビオチン反応の検出が可能であった。

キーワード ラベルフリー、金属メッシュ、メンブレン

## Label-free detection of protein using a metallic mesh

Hisa YOSHIDA\* Yasuhide KAWAI\* Shin'ichiro HAYASHI\*\* and Yuichi OGAWA\*

\*Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

1-1 Tsutsumidori, Amemiya, Aoba, Sendai, 981-8555 Japan

\*\*Laser Technology laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, 351-0198 Japan

E-mail: yoshida\_h@bios.tohoku.ac.jp

**Abstract** We propose a new label-free sensor of protein using a metallic mesh in THz region. Our sensing method relies on a change in the transmittance of THz radiation passed through the metallic mesh on which a sample substance is contacted.

By using this technique, we demonstrated the highly sensitive detection the protein horseradish peroxidase, which is an oxidation/reduction enzyme that exists in many organisms. For quantitative investigation of the sensitivity of our sensor, the enzyme was printed on surface of the metallic mesh by a commercial printer. A distinct shift in the transmittance spectrum toward lower frequency was observed for 500 pg/mm<sup>2</sup>(11 fmol) enzyme printed on the metallic mesh. Next we demonstrated to detect a streptavidin-biotin interaction on a PVDF membrane which is generally used fixation of protein. The streptavidin-biotin interaction can be detected by using 650 pg/mm<sup>2</sup> (2.5 pmol) biotin. These results indicate that our sensing system has high sensitivity and we have successfully demonstrated a convenient sensing system by using a metallic mesh and a PVDF membrane.

**Keyword** label-free, metallic mesh, membrane

### 1. はじめに

テラヘルツ(THz)波帯には生体高分子の高次構造の変化に起因する吸収が存在するため、核酸やタンパク質などの生体高分子の検出に関する研究が進められている [1,2]。その中でも DNA は THz 波帯で 1 本鎖と 2 本鎖の屈折率と透過率が異なり、その違いを高感度で検出するという報告や、アビジン-ビオチン複合体の検出など、標識物質を用いないラベルフリー検出に関する研究が進められている [3,4]。現在、DNA やタンパク質の検出には標識物質が用いられており、高精度な測定が行える反面、高価な試薬や専門的な技術や知

識を必要とし、測定に時間がかかるという問題点がある。また、複雑な混合試料や弱い結合の場合には標識が行うことができない場面があり、ラベルフリー検出によりタンパク質検出の範囲が広がることが予想される。しかし、THz 波帯におけるラベルフリー検出の報告の多くは複雑な測定系を利用するために応用が難しいという問題点がある。このような背景において、我々は利便性が高くより実用的な方法として THz 波と金属メッシュを組み合わせた新しいセンシング法の開発を行っている。

1960 年代から格子状の開口を有する金属製のメッ

シユを遠赤外領域のバンドパスフィルタとして用いた研究が行われ、様々なメッシュの形状や開口サイズの周波数特性を明らかにされている [5, 6]。近年では金属加工技術の向上により微細な周期構造を安定的に作製することができるようになり、これらを用いた THz 帯の新しい光学素子や、センサの研究が行われている [7, 8, 9]。

本研究ではまず標識酵素として酵素抗体法などに広く用いられているペルオキシダーゼを使って金属メッシュによるタンパク質の検出を行った。金属メッシュによる検出は試料を均一に塗布することが重要であるため、試料の塗布には微量な液体を均一に印刷できる市販のインクジェットプリンターを使用した。さらに、タンパク質の固定に広く利用されている PVDF メンブレンと金属メッシュを組み合わせることでメンブレン上のストレプトアビジン-ビオチン相互作用のラベルフリー検出を試みた。

## 2. 金属メッシュの基礎特性

本研究では、厚さ 6  $\mu\text{m}$ 、グリット間隔(g)76.3  $\mu\text{m}$ 、金属のライン幅(2a)18.3  $\mu\text{m}$  の薄い金属メッシュをセンサ部材として利用している。このような薄型金属メッシュは、エレクトロフォーミング (電鋳) 法によって様々なサイズのもが既に市販されている。赤外領域において、薄型金属メッシュの透過特性については古くから実験的な解析 [6, 10] が行われ、構造的なパラメータと透過特性の関係が報告されている。また、開口の形状についても、正方形だけでなく円形や十字形などについても報告されている。

Fig. 1 に本研究で使用した薄型金属メッシュの透過スペクトルを示す。測定はフーリエ変換式赤外分光光度計 (日本分光社製 Faris-1S) で行った。薄型金属メッシュには、集光された THz 波が入射する構成となっており、金属メッシュ表面でのスポットの直径は約 7 mm で、偏光は無偏光である。透過率のピークは 3.37THz に観察され、透過率は金属メッシュの開口率(53%)を上回っている。この現象は表面プラズモンの共鳴励起によるものである。また、2.9THz 付近において透過率が急激に減少するディップ (谷) がみられる。このようなディップは、平行光を入射したときには見られず、斜入射のときのみ観察された。実験では、金属メッシュに集光された THz 波を入射した際の斜入射成分によって、透過スペクトルにディップが観測されたものと考えられる。

この金属メッシュにサンプルが付着すると、金属メッシュの開口近傍の屈折率が変化し、透過スペクトルが低周波側にシフトするという現象が起こる。

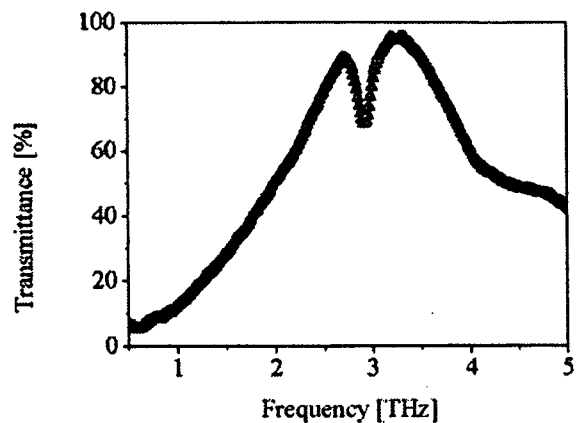


Fig.1 Measured transmission spectrum of a thin metallic mesh (grating period : 76.3  $\mu\text{m}$ , metallic line width:18.3  $\mu\text{m}$ )

金属メッシュのこのような性質をタンパク質を検出するセンサーとして利用し、特に本研究ではこの透過スペクトルのシフトをディップ位置を観察することで検出した。

## 3. 単一タンパク質の検出

標識酵素として広く用いられているペルオキシダーゼ (ナカライテスク株式会社 免疫化学用 凍結乾燥粉末) を滅菌蒸留水に溶解させ 1.0 mg/ml、0.5 mg/ml、0.25 mg/ml、0.125 mg/ml の濃度に調製し、薄型金属メッシュ (g : 76.3  $\mu\text{m}$ , t : 6  $\mu\text{m}$  材質 : ニッケル) に塗布した。試料のペルオキシダーゼを均一かつ定量的に塗布するため、市販のインクジェット方式のプリンタ (Canon Pixus 860i) を使用し、画像処理ソフトで画面上の描画濃度を調整することでプリンタのインク吐出量を調整した。インクジェットプリンタはすでに DNA の固定などに使用されており、微量な液滴を均一に塗布する上で優れた性能を持つ [11]。Fig. 2 にペルオキシダーゼの塗布量を変化させたときの、金属メッシュの透過スペクトルのシフトをディップ位置で示す。またさらに Fig. 3 にペルオキシダーゼ量と、Lorentz 関数による近似曲線から求めたディップの周波数との関係を示している。300  $\text{pg}/\text{mm}^2$  のときは透過特性の変化は観察されなかったが、500  $\text{pg}/\text{mm}^2$  から 2100  $\text{pg}/\text{mm}^2$  の 3 段階の濃度で薄型金属メッシュ単体と比較して透過特性の低周波数側へのシフトが確認できた。500  $\text{pg}/\text{mm}^2$  のペルオキシダーゼが検出されたことから、金属メッシュによるセンシング法は高い感度を備えていることが示された。

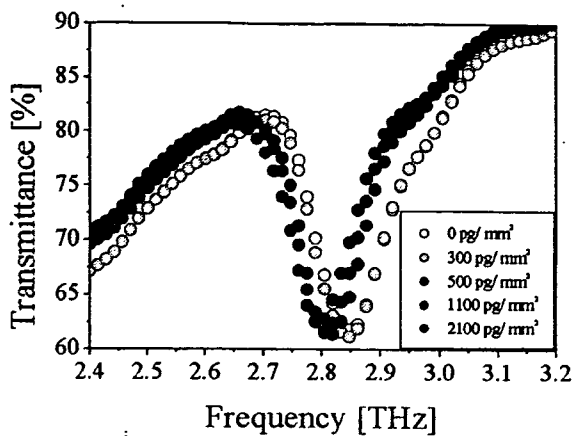


Fig. 2 Measured transmission spectra of metallic meshes with various concentrations of the horseradish peroxidase.

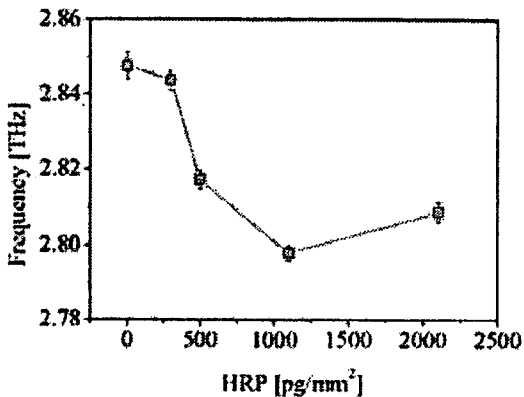


Fig. 3 The transmission dip frequency as a function of the horseradish peroxidase concentration.

また、1100 pg/mm<sup>2</sup>のときシフト量が最大になり、さらに濃度を上げてシフト量が増加しないことが観察されたが、これは今回使用したインクジェットプリンタはごく微量の試料を均一に塗布する性能に優れているが、試料が増加するに伴い不均一な塗布が起こることによるものと考えられる。今後更に広い濃度範囲で試料を均一に塗布する方法を検討する。

#### 4. メンブレン上のタンパク質反応の検出 (ストレプトアビジン-ビオチン反応の検出)

卵白中に含まれるタンパク質であるアビジン (60 kDa) は、ビオチン (M.W. 250) と強固で不可逆的な結合 (解離定数 =  $10^{-15}$ ) 形成する。アビジン-ビオチン反応は 25°C、pH5.0 の緩衝液中では速やかに反応し、その反応速度は  $7 \times 10^{-7} \text{ M sec}^{-1}$  と報告されている [12]。

ウシ血清アルブミン (BSA) (Albumin bovine serum,

powder; SIGMA) にビオチン標識を施し (EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit; Pierce Biotechnology, Inc.)、PVDFメンブレン (Immun-Blot™ PVDF Membrane; Bio-Rad) を浸してメンブレン上に固定した。十分に乾燥させた後、0.1% BSA 溶液 (0.1% BSA 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.5) 中でブロッキング処理を行った。その後緩衝液中 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.5) で洗浄した後、アビジンよりも安定的にビオチンと結合するストレプトアビジン (Streptavidin(rehydrated)240 kDa; Bio-Rad) と反応させた。反応後緩衝液で洗浄し、最後に純水で洗浄し、乾燥後にフーリエ変換式赤外分光光度計 (日本分光社製 Faris-1S) で測定を行った。

Fig.4 に Lorentz 関数による近似曲線から求めたディップの周波数と、ストレプトアビジン-ビオチン反応の関係を示している。金属メッシュのディップ周波数は PVDF メンブレンによって低周波数側にシフトする。さらに、ビオチン標識 BSA の定着後ブロッキング処理後の測定で低周波数側へのシフトが観察された。これはビオチンと主に BSA の付着に起因すると考えられる。さらにストレプトアビジンとの反応によって低周波数側へのシフトが観察された。

以上のことから、本研究のセンシング法によってビオチン 650 pg/mm<sup>2</sup> (2.5 pmol) におけるストレプトアビジン-ビオチン反応の検出が可能であることが分かった。これは従来の THz 波帯でのアビジン-ビオチン反応のラベルフリー検出報告と近いレベルの検出感度であり [4,13]、さらに金属メッシュの形状や厚さを変えることで高感度化が図れることから、今後実用化レベルへの感度の向上が期待できる。また、本研究の方法は、現在タンパク質の固定に広く使用されている PVDF メンブレンとの組み合わせが可能であることから、既存技術への応用が容易であり実用性の高い方法といえる。

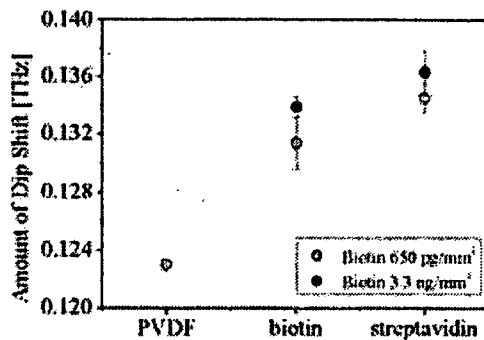


Fig. 4 The amount of dip shift frequency by the streptavidin-biotin interaction.

## 5.まとめ

本研究ではTHz波金属メッシュを組み合わせたセンシング法によって、タンパク質の検出を行った。その結果ペルオキシダーゼ 500 pg/mm<sup>2</sup> (11fmol) の検出が可能であり、本方法が高い感度を備えたセンシング法であることが示された。また、タンパク質の固定に広く使用されているPVDFメンブレンと組み合わせることにより、メンブレン上でビオチン 650 pg/mm<sup>2</sup> (2.5 pmol) についてストレプトアビジン-ビオチン反応が検出可能であり、これまでの報告よりもより汎用性の高い検出方法が示された。今後は本方法の高感度化を図ると共に、定量的な評価や抗原抗体反応の検出を行う予定である。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり貴重な御指導と御助言をいただきました名古屋大学エコトピア科学研究所教授川瀬晃道先生及び信州大学理学部助教宮丸文章先生に深く感謝致します。

本研究は厚生労働省科学研究補助金による萌芽的先端医療技術推進研究事業の支援によって行われました。

## 文 献

- [1] A. Markelz, S. Whitmire, J. Hillebrecht, and R. Birge, *Phys. Med. Biol.* **49** 3798 (2002).
- [2] B. M. Ficher, M. Walther, and P. U. Jepsen, *Phys. Med. Biol.* **47** 3807 (2002).
- [3] M. Nagle, P. Haring Bolivar, M. Brucherseifer, and H. Kruz, *Appl. Phys. Lett.* **80** 154 (2002).
- [4] S. P. Mickan, A. Menikh, H. Liu, C. A. Mannella, R. MacColl, D. Abbott, A. Munch, and X-C Zhang, *Phys. Med. Biol.* **47** 3789 (2002).
- [5] R. Ulrich : *Infrared Physics* **7** (1967) 37
- [6] K. Sakai, T. Fukui, Y. Tsunawaki and H. Yoshigawa : *Jpn. J. Appl. Phys.* **8** (1969) 1046.
- [7] F. Miyamaru, T. Kondo, T. Nagashima, and M. Hangyo : *Appl. Phys. Lett.* **82** (2003) 2568.
- [8] F. Miyamaru and M. Hangyo : *Appl. Phys. Lett.* **84** (2004) 2742.
- [9] H. Cao and A. Nahata : *Opt. Express* **12** (2004) 1004.
- [10] R. Ulrich, K. F. Renk and L. Genzel : *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.* **11** (1963) 363.
- [11] 小倉真哉, 山本伸子, *BIO INDUSTRY* **23** 23-28 (2006)
- [12] N. M. Green, *Biochem. J.* **89** 585 (1963)
- [13] A. Menikh, S. P. Mickan, H. Liu, R. MacColl and X-C. Zhang, *Biosensors and Bioelectronics* **20** 658 (2004)