

2008/2009A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

テラヘルツ波によるラベルフリーバイオチップシステムの

開発に関する研究

平成20年度 総括研究報告書

主任研究者 小川 雄一

平成21年(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

テラヘルツ波によるラベルフリーバイオチップシステムの開発に関する研究

平成20年度 総括研究報告書

主任研究者 小川 雄一

平成21(2009)年 3月

—目 次—

I. 総括研究報告 バイオチップセンサー技術の研究 小川 雄一	-----	1
II. 分担研究報告 1. 専用超小型テラヘルツ波光源の開発 林 伸一郎	-----	11
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	16

バイオチップセンサー技術の研究

主任研究者 小川 雄一 東北大学大学院農学研究科 准教授

研究要旨: 本研究ではテラーメイド医療やライフサイエンス研究現場での利用を目指した、簡便かつ安価なラベルフリーバイオチップシステムの開発を目的としている。本センサーチップは、DNAやタンパク質を定着する基材として金属を含むインクでメッシュ構造を印刷したものをを用いており、さらに申請者が持つテラヘルツ波光源に関する技術を導入することで、蛍光標識などの試薬を使うことなく安価で迅速な診断を可能とする。

分担研究者

林 伸一郎 独立行政法人理化学研究所 研究員

A. 研究目的

昨今の医療分析機器の高度化に伴い、個々に最適な医療や治療を行うことが可能になりつつある。しかしこのようなテラーメイド医療に代表される先端医療が現実のものとなりつつある中、その一方で高価で大掛かりな分析機器を必要とすることが多く、小規模な医療現場ではその恩恵を受けることが困難な場面や医療費負担の増加が大きな問題となっている。そこで本研究では、“テラヘルツ波”と呼ばれる 10^{12} Hz の未開拓電磁波を使った簡便かつ安価なラベルフリーバイオチップセンシングの開発を目指す。そこで我々は、金属(導体)で構成された任意のグリッド間隔を持つメッシュがテラヘルツ帯の透過特性にバンドパス特性を示し、さらにこの特性がメッシュ近傍の物質の複素屈折率に依存したシフトを生じることを利用した独自のセンシング手法によるバイオチップの開発を行っている。

本事業では2か年に渡り、金属メッシュの機構サイズとテラヘルツ波の透過特性の関係を明らかにし、特に集光光学系において急峻なディップが存在することを明らかにした。また、このディップを利用することで、透過特性のわずかなシフト量を感度良く計測できる可能性を示した。さらに、金属成分を含んだインクを用いた印刷による安価なセンサーチップの作成を目指し、一般的に生体高分子の分析に用いられているメンブレン上への印刷メッシュの試作、評価を実施した。このような要素技術の開発を受け、本年度ではより実際の利用法に近い状態のサンプルで抗原抗体反応などの非標識センシングの実験を行い、その定量性などについて評価を行うこととした。その際、抗原抗体反応の基板として一般に使用されているメンブレンフィルターに着目し、そのテラヘルツ帯での物性評価およびその上の抗原抗体反応の非標識検出の基礎データの取得を試みた。さらに同サンプルを金属メッシュと組み合わせ測定し、高感度化の評価を実施した。また、実際の応用可能性を検討するために、アレルギー検査への利用を検討した。一方、多点計測による画像化検査技術への利用を検討するために、実験系を構築しメンブレン上に固定化された小分子とタンパク質との相互作用

用を画像で検出する実験を行った。

B. 研究方法

本研究では、これまでの知見をさらに実際の利用に近い形で検証するために、3つの研究を行った。①メンブレン上での血清中からの自己抗体の検出を実現するための基礎研究として、「テラヘルツ帯でのメンブレンおよび抗体の物性評価」、「夾雑物下での非標識検出モデル実験」、「メンブレン+金属メッシュ測定法による高感度化の評価」を計画し、実験を遂行した。さらに応用検討として、②牛乳中アレルギーの検出実験ならびに③多点計測のための高感度画像化システムの基礎研究を実施し、「テラヘルツ干渉イメージング法の測定原理検証」、「小分子とタンパク質の非標識検出実験」を行った。

1. メンブレン上の抗原抗体反応非標識検出

1.1 THz 帯での抗体およびメンブレンの物性評価

分光器によるテラヘルツ帯の吸収スペクトルを取得するにあたり、テラヘルツ帯に特化したフーリエ変換型赤外分光器(FT-IR)を用いた。

これまでテラヘルツ帯において、3THz以下の周波数帯ではTHz-TDSと呼ばれる分光器システムが多く使われ、過去にタンパク質の分光スペクトルが報告されている。これらの報告によると、タンパク質間で大きな差が見られず、ブロードな透過特性を示すことが知られている。我々の先行研究においても、10THz以下の広い周波数帯においてもカゼインなどのタンパク質はブロードな吸収特性を示し、種類間で大きな違いが見られないことから、本実験では代表的な抗体サンプルとしてIgGを選び、吸収による検出限界の見積りのための基礎データを測定した。

IgGは、抗マウスIgGヤギIgG抗体(Lot#192)はROCKLAND社より購入した。従来の固体物質の分光測定的手法に倣い、ポリエチレンを希釈母材としたペレットを作成した。このとき、市販の抗体に含まれる緩衝液の影響を除去するために、脱塩カラムによって溶液を処理し、緩衝液成分を取り除いた後、凍結乾燥し抗体のみを取り出すことにした。次に、抗原抗体反応を生じさせる基板の候補として、ポリスチレン板材(Becton Dickinson社製のプラスチックシャーレ)、ニトロセルロースメンブレン(ポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$)、PVDF

メンブレンを選び、分光スペクトルを使って適した材料の検討を行った。

1.2 夾雑物下での非標識検出モデル実験

実際の医療における血液分析を想定した場合、血清中には様々な物質が夾雑物として含まれており、目的の抗体を検出するノイズ要因となりうる。そこで非標識検出の基礎実験として、自己抗体フリーのヒト血清に抗体を加えたモデルサンプルを作成し、メンブレン上の抗原との検出を非標識で検出することを試みた。

なお、メンブレンには PVDF メンブレンを、抗原には抗ヒト IgG マウス IgG 抗体、抗体には抗マウス IgG ヤギ IgG 抗体を用いた。自己抗体フリーヒト血清は THE BINDING SITE 社のものを用い、ブロッキング剤およびネガティブコントロールにはウシ血清アルブミンを用いた。

メンブレンを付属のプロトコールに従いメタノールを用いて親水化処理した後、抗原溶液 1ml と室温で振とうしながらインキュベートした。その後、抗原溶液を取り除いた後に TTBS 緩衝液を 1ml ずつ加え、5 分間振とうした後溶液を取り除いた。この操作を 3 回繰り返して、メンブレンを洗浄した。TTBS 緩衝液での洗浄後、1ml ずつの脱塩水を加え、5 分間振とう後溶液を取り除いた。この操作を 2 回繰り返して、メンブレンを水洗した。水洗したメンブレンは水分を取り除くためにデシケーター中で一晩乾燥させた。このサンプルを「メンブレン+抗原」サンプルとした。

同様にメンブレンを抗原溶液とインキュベートし溶液を取り除いた後、ブロッキング溶液 1ml を入れ、振とうさせながら室温で 1 時間インキュベートした。本来であれば、この段階で洗浄を行うが、この実験は夾雑物の存在の影響をみることを目的であるため、この段階での洗浄は行わなかった。ブロッキング処理したメンブレンに TTBS 緩衝液、血清溶液、抗体溶液、ネガティブコントロール溶液 1ml ずつを加え、室温で振とうさせながらインキュベートした。「メンブレン+抗原」サンプルと同様に TTBS 緩衝液で洗浄、水洗、乾燥を行った。これらのサンプルをそれぞれ、「メンブレン+抗原+ブロッキング」サンプル、「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清」サンプル、「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清+抗体」サンプル、「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清+ネガコン」サンプルとした。以上の処理により、「メンブレン+抗原」サンプルのメンブレン上には抗原のみが、「メンブレン+抗原+ブロッキング」サンプル、「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清」サンプルおよび「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清+ネガコン」サンプルのメンブレン上には抗原とブロッキングタンパク質が、「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清+抗体」サンプルのメンブレン上には抗原、ブロッキングタンパク質、抗体が吸着していると考えられる。各サンプルは 4 連で調製し、テラヘルツ帯の分光器にて吸収スペクトルを測定した。

1.3 メンブレン+金属メッシュ測定法による高感度化の評価

これまで、メンブレン上で目的の抗原抗体反応による吸収の変化がテラヘルツ帯で観測できることを確認したが、実際の自己抗体検査では吸収変化による測定法では感度が足りない。そこで本研究では、メンブレン上での微量な抗原抗体反応の検出をこれまで研究してきた金属メッシュと組み合わせて行うことを試み、感度向上の効果を確認することとした。そこで本実験では、後進波管 (BWO) を THz 波光源としたシステムを構築し、単純な透過測定と、金属メッシュを使った測定との比較を行った。

金属メッシュは、格子定数や金属ストリップの幅の半値、厚みによってスペクトルの形状が変化する。そこで実験に用いた BWO の測定範囲にスペクトルのピークが現れる格子定数が $254\mu\text{m}$ 、金属ストリップの幅の半値 $32\mu\text{m}$ 、厚さ $60\mu\text{m}$ の金属メッシュを用いることとした。また、金属メッシュを用いた測定では、メッシュ表面の屈折率変化が結果に反映される。そのため測定のためには、金属メッシュとメンブレンサンプルを密着させる必要がある。そこで、金属メッシュを貼り付けてあるホルダーのメッシュとは反対側に BWO 測定範囲で透過性の高い 2mm 厚のポリエチレン板をはり、ホルダー側部の穴からポンプで吸引することでメンブレンサンプルと金属メッシュが密着するようにした(以下、これをメッシュセルと記述する)。

本実験で使用したサンプルは、メンブレンには PVDF メンブレン、抗原には抗ヒト IgG マウス IgG 抗体および抗体にはマウス IgG ヤギ IgG 抗体、ブロッキング剤およびネガティブコントロールにウシ血清アルブミンを用いた。なお、測定に用いるメンブレンサンプルの大きさは、構築した実験系のビーム径より直径 14mm の円形とした。切り出したメンブレンを抗原、ブロッキング、抗体、ネガティブコントロールの溶液と順にインキュベートし調製したメンブレンサンプルを調製した。抗ヒト IgG マウス IgG 抗体を TBS 緩衝液に $350\mu\text{g/ml}$ になるよう溶解させ、抗原溶液を調製した。TBS 緩衝液にウシ血清アルブミンを 5% 濃度になるように溶解させ、ブロッキング溶液を調製した。TTBS 緩衝液に抗マウス IgG ヤギ IgG 抗体を $350\mu\text{g/ml}$ になるように溶解させて抗体溶液を調製し、TTBS 緩衝液にウシ血清アルブミンを $350\mu\text{g/ml}$ になるように溶解させてネガティブコントロール溶液を調製した。

切り出したメンブレンを付属のプロトコールに従いメタノールを用いて親水化処理した後、抗原溶液 3ml と室温で振とうしながらインキュベートした。その後、溶液を取りのぞいてブロッキング溶液 3ml を入れ、振とうさせながら室温で 1 時間インキュベートした。1 時間後、ブロッキング溶液を取り除き、TTBS 緩衝液を 3ml ずつ加え、5 分間振とう後溶液を取り除いた。この操作を 3 回繰り返して、メンブレンを洗浄した。洗浄したメンブレンに抗体溶液、ネガティブコントロール溶液 3ml ずつを加え、室温で振とうさせながらインキュベートした。TTBS 緩衝液を 3ml ずつ加え、5 分間振とうした後溶液を取り除いた。TTBS 緩衝液での洗浄後、

3ml ずつの脱塩水を加え、5 分間振とう後溶液を取り除いた。水洗したメンブレンは水分を取り除くためにデシケーター中で一晩乾燥させた。以上の手順により、「メンブレン+抗原+ブロッキング+ネガコン」サンプルのメンブレン上には抗原とブロッキングタンパク質が、「メンブレン+抗原+ブロッキング+抗体」サンプルのメンブレン上には抗原、ブロッキングタンパク質、抗体が吸着していると考えられる。各サンプルは 4 連で調製し、BWO 実験系にて測定を行った。

実験系は、以下のように構成した。BWO から出力されたテラヘルツ波は、オプティカルチョッパーで 200Hz にチョッピングした。複数の軸はずし放物面鏡によって 9.5mm の平行光としてサンプルに入射する構成とした。サンプルを通過後テラヘルツ波は放物面鏡で集光され、検出器に入る。検出器には、液体ヘリウムで冷却したシリコンボロメータを使用した。シリコンボロメータからの情報はロックインアンプで増幅され、 GPIB を介してパソコンに保存される。測定のためのソフトウェアは NI 社の LabView で作成した。

2. 牛乳中アレルギーの検出実験

本実験では、タンパク質反応のモデルとしてストレプトアビジン-ビオチン反応及び牛乳アレルギーの原因物質として知られている α -カゼインに対する抗 α -カゼイン抗体の検出を試みた。

ストレプトアビジン (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^{-13} ~ 10^{-15} M⁻¹) を形成する。ビオチン標識ウシ血清アルブミン (BSA) (13 mol Biotin/mol BSA) 5 mg/ml 溶液 200 μ l を直径 16 mm のニトロセルロースメンブレンに塗布し、ビオチン標識 BSA を塗布したニトロセルロースメンブレンを乾いたペーパータオルに載せ 25 $^{\circ}$ C で 2 時間以上乾燥させた後、1% BSA 溶液の入ったビニールバック中で 25 $^{\circ}$ C、2 時間振とうし、ブロッキング処理を行った。次に、ストレプトアビジンとウサギ IgG 抗体をブロッキング溶液に加えて 25 $^{\circ}$ C で 2 時間振とうし、反応を行った。ここで、ストレプトアビジンの濃度を 0, 330, 1000 ng/ml、ウサギ IgG 抗体の濃度を 1000 ng/ml となるように調製し加えた。反応後 TTBS 緩衝液で 10 分間 \times 3 回、蒸留水で 10 分間 \times 3 回ビニールバック中で振とうして洗浄を行い、乾いた紙にはさみ 30 $^{\circ}$ C で 1 時間乾燥させた。抗 α -カゼイン抗体を直径 16 mm のニトロセルロースメンブレン上に塗布し、25 $^{\circ}$ C で 2 時間乾燥させた後 1% BSA 水溶液を含むブロッキング溶液中に α -カゼインを加え、更に 25 $^{\circ}$ C で 2 時間振とうし、その後 TTBS 緩衝液で 10 分間 \times 3 回、蒸留水で 10 分間 \times 3 回ビニールバック中で振とうして洗浄を行い、乾いた紙にはさみ 30 $^{\circ}$ C で 1 時間乾燥させた。また、比較のため、抗 α -カゼイン抗体を反応させずに同様の処理を行ったメンブレンサンプルを用意した。これらの各サンプルを、それぞれ金属メッシュ上で吸引ポンプにより密着させ、分光器にて透過測定を行った。

3. 多点計測のための高感度画像化システムの基礎研究

3.1 テラヘルツ干渉イメージング法の測定原理検証

これまでメンブレンを基材とした分析法は、本研究で進めている非標識検出においても有効であることが示されている。また、金属メッシュと重ねることで高感度化が見込まれる本手法は、簡便で扱いやすく、実用性が高い手法と言える。しかし、画像化を進めるにあたり、広い面積での密着性が重要であることが明らかになってきたため、ハイスループットな診断技術には新たな手法が必要と考えられた。そこで、印刷技術によるメッシュとメンブレン一体型の検査チップの検討と平行に、テラヘルツ波の干渉を利用した新しい画像検査法を検討することとした。

本手法は、メンブレンが多孔質であることによる低い吸収性と屈折率を利用し、そこに微量な生体高分子などが付着すると屈折率が変化することを利用したものである。このメンブレンを干渉計内中に配置することで屈折率変化に伴う実効的な光路長変化による干渉波形のシフトが観測され、透過率の大きな変化から生体高分子の結合の有無を判別することができると期待される。そこで本研究では、この測定原理を明らかにするために厚みの異なるポリエチレン板を屈折率の異なるメンブレンのモデルサンプルとして利用し、干渉波形のシフトを観測することとした。

本手法の原理確認には、時間波形を利用すると反射波の切り分けが容易になることが期待できることから、THz-TDS の実験系による実験を行うこととした。図 1 に本実験で使用したシステムの概略図を示す。

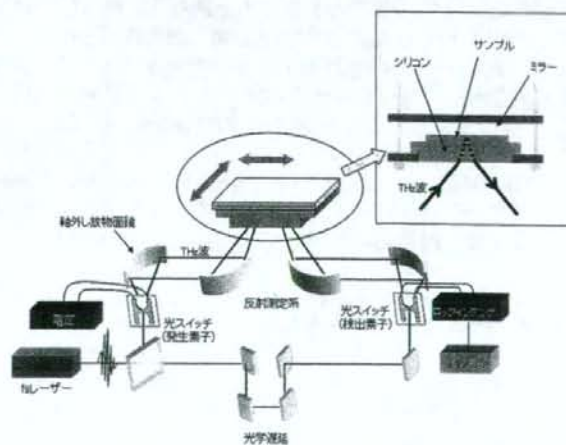


図 1. テラヘルツ干渉イメージングシステムの模式図

測定試料は XY ステージ上に配置され、各ポイントで分光測定を行いながら、順次ステージを動かしてイメージングを行う。反射測定系では、光スイッチから放射された THz 波は放物面鏡 (f=237.1 mm, N.A.=0.26) により集光され、サンプルに対して下から 20 $^{\circ}$ で斜め入射する。サンプルからの反射光を測定して面方向にスキャンする際、サンプル面が平滑で傾きを持たないことが望ましい。そこで本実験系では、高抵抗シリコン (Si) 単結晶 (抵抗値 10k Ω \cdot cm 以上) によるサン

プル台を設置した。Si は THz 波帯における屈折率が 3.415 と一定であり、ポリエチレンなどのプラスチック素材より屈折率が大きい空気から Si に THz 波が入射する際の反射損失は大きい、THz 波帯における Si の吸収係数は小さく、Si 内部での THz 波の損失がほぼ 0 と見なすことができる。この Si のサンプル台により、THz 波は集光しながら 5.8 度の入射角でサンプルに入射することとなる。

本実験ではサンプルに厚さ 400 μm と 500 μm のポリエチレン板を用いた。これらのサンプルと Si との界面での反射と、上面のミラーからの反射が干渉し、干渉スペクトルが観測されるかどうかを確認した。なお、透過測定による干渉波形の参照信号は、Si にミラーを密着させて配置させた場合とした。

3.2 小分子とタンパク質の非標識検出実験

3.1 の実験で原理確認を行った方式に対し、メンブレン上の屈折率変化を非標識で測定する実験を行った。このとき、小分子をメンブレン上に濃度依存的にプロットし、アレイ状に配置した小分子アレイとタンパク質の結合を画像化し、透過強度変化から各濃度の小分子に応じた結合の有無が判別できるかどうかを確認した。さらに、従来法との比較を行い、本計測手法の有効性についても検証することとした。

低分子化合物そのものは、メンブレンとまったく相互作用しないか、極めて弱い相互作用しかしないため、タンパク質との反応後に行う洗浄によって容易に流れ出してしまう。そこで本実験では、低分子化合物に疎水性を化学処理によって付加し、メンブレンと疎水結合によって、固定化する方法を試みた。疎水性の付加には、Oikawa らの低分子化合物に疎水性ポリエチレングリコール(PEG)を結合する手法で疎水性を与え、表面が疎水性の特性を持つ PVDF メンブレンに結合(固定化)させた。なお、本実験では PEG (Sigma-Aldrich Poly(ethylene glycol), 平均分子量 3400) と分子量の異なる MPEG (Sigma-Aldrich Poly(ethylene glycol) methyl ether, 平均分子量 5000) においても同様に低分子化合物を結合させ、固定化法の違いによる測定結果の比較を行った。

まず、低分子化合物とタンパク質には、非常に強固な結合をすることで知られており、原理確認実験に適している、ビオチンとストレプトアビジンを用いた。ビオチンを PEG と MPEG にそれぞれ結合させ、メンブレンとの疎水性相互作用により固定化した。固定化の際、ビオチンは 1×10^{-3} M から 3.2×10^{-6} M まで濃度を段階的に変化させ、再現性を確認するために各 2 連でドットプロットを行った。それぞれに滴下した量は 0.2 μl ずつで、メンブレン上では約 3 mm の円状に広がった。その後、未処理のメンブレン上にストレプトアビジンが結合することを防ぐために、スキムミルクでブロッキング処理を施したのち、ストレプトアビジンとの反応を行った。以後、このように作成された試料をメンブレンアレイと記す。一方、ストレプトアビジンの結合を確認するために、同様の処理を行って作成したメンブレンアレイに対し、蛍光標識 (Alexa₆₃₃) 付のスト

レプトアビジンを反応させて、別途蛍光検出にて結合の確認を行った。

(倫理面での配慮)

本研究は、センシング技術の開発を目指すものであり、倫理上問題の生じる恐れのある人や動物などを用いた実験は予定していない。また、本研究で使用するサンプルは一般に市販されているものを使用するため、人権擁護上についても問題は生じない。

C. 研究結果・考察

1. メンブレン上の抗原抗体反応非標識検出

1.1 THz 帯での抗体およびメンブレンの物性評価

THz 分光器を用いて抗体サンプルの吸光度スペクトルを求めた結果を図 2 に示す。今回測定した抗体サンプルは低波数側で吸収が小さく高波数になるほど、吸収が大きくなる傾向が見られた。特に $20\text{cm}^{-1} \sim 125\text{cm}^{-1}$ にかけて波数が大きくなるに従って吸収が顕著に大きくなった。 125cm^{-1} より高波数側ではあまり吸光度は変化しなかった。 340cm^{-1} にゆるやかな吸収ピークがみられたが、全体に急峻な吸収ピークはなくブロードな吸収スペクトルだった。 100cm^{-1} ($\approx 3\text{THz}$) 以下の周波数帯では、波数の増加とともに吸光度があがっており、これまでに報告されているタンパク質の吸収スペクトルと同じような特徴がみられた。

また、分光器の測定部のビーム径から今回の測定の抗体サンプル量実効分は 1.9mg と見積もれた。

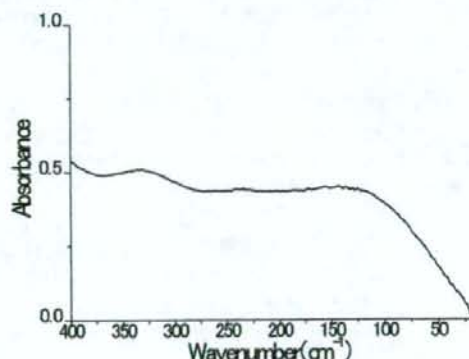


図 2. 抗体ペレットの吸収スペクトル

アミノ酸、糖類、ビタミンといった低分子化合物は、テラヘルツ帯で急峻な吸収ピークを持つスペクトルを示し、そのピーク位置などから物質を同定できることが報告されている。タンパク質は複数のアミノ酸から構成されるが、ペプチドを形成しアミノ酸残基数が増えるとアミノ酸単分子ではみられた急峻なピークはみられなくなることが知られている。今回測定した抗体のスペクトルも急峻な吸収ピークはみられず、ブロードな形状だったことから、多くの吸収ピークの足し合わせの結果、ブロードな形状となったと考えられる。さらに、今回測定した抗体はポリクローナル抗体であり、異なる抗原認識部位をもつ複数の抗体からなる混合物である。そのため単一の物質のスペクトルとはい

えず、様々なスペクトルの足し合わせとなっていることが考えられる。しかし、実際の自己抗体の測定でも測定するのはポリクローナル抗体であることから、各自己抗体の判別をテラヘルツ帯の吸収スペクトルで行うことは困難であることが改めて確認された。一方でこれら生体高分子が吸収を持つことが示されたことから、結合に伴う吸収量の増加が期待できる結果を得た。

次に、基材の評価を行った結果について述べる。各試料の厚みをマイクロメーターで測定した結果と、各試料のタンパク質吸着能のカタログ値を表1に示す。分光器で透過特性を測定したところ、図3の結果を得た。ポリスチレン板材はメンブレン試料に比べ透過性が低く、全体に渡り細かな吸収ピークが存在していた。ニトロセルロースメンブレンは吸収ピークのないブロードな吸光度スペクトルを示し、高波数になるほど透過性が下がっていた。PVDFメンブレンは急峻な吸収ピークがいくつか見られたものの、測定範囲全体で高い透過性を示した。

表1 各試料の厚みおよびタンパク質吸着能

サンプル名	厚み	タンパク質吸着能
ポリスチレン板材	726 μm	—
ニトロセルロースメンブレン	110 μm	1 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$
PVDFメンブレン	140 μm	4 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$

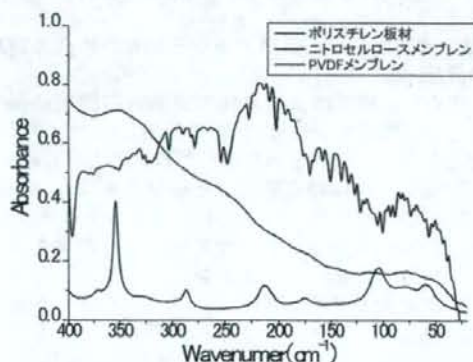


図3. 各基材サンプルの吸光度スペクトル

また、図4に今回測定したメンブレンを走査型電子顕微鏡で観察した結果を示した。この写真からメンブレンは間隙の多い多孔質な構造をしていることがわかる。この構造のため、テラヘルツ光で透過測定を行う際のメンブレンの実効分の厚みは、マイクロメーターでの測定結果よりも、さらに薄い物になっていると考えられた。

テラヘルツ波の透過測定により抗体の吸収測定することで抗体の非標識検出を行う場合、基板に用いる材質として①テラヘルツ帯で透過性が高く、急峻な吸収ピークが存在しない、②タンパク質の吸着能が高いものが適していると考えられる。①は測定のS/N比の向上に必要である。また、検出しようとする抗体は固相上の抗原に対し結合する。固相上の抗原量が測定する抗体量に対し少ないと、抗原が飽和してしまいそれ以上の抗体を捕らえられなくなってしまう。そのため、

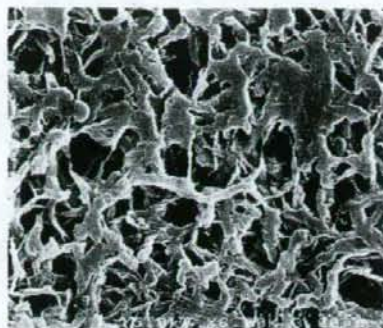


図4 SEM画像(上段:ニトロセルロース,下段:PVDF)

抗原をより多く保持することができるタンパク質の吸着能の高い材質を用いた方が、測定の上限值があがり、測定可能範囲が広がると考えられる。そのため、条件②が重要であると考えられる。また、多孔質のような材料は、微視的に見ると界面での屈折率変化が緩やかであり、基板界面での反射ロスの影響が小さいと考えられる。また、内部に浸み込んだタンパク質と入射する電磁波との相互作用時間が長くなり、吸収測定に向いていると考えられる。以上の結果、メンブレンはテラヘルツ波を用いたセンシングと相性の良い材質であると考えられる。

1.2 夾雑物下での非標識検出モデル実験

各反応過程のメンブレンサンプルの吸光度スペクトルを、図5に示す。さらに、PVDFメンブレンの透過特性と本実験で使用した分光器の感度特性、抗体の吸収スペクトルを考慮して265 cm^{-1} の吸光度で各サンプルの比較を行った結果を図6に示す。

「メンブレン+抗原+ブロッキング」サンプルと「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清」サンプルの吸光度を比較すると、「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清」サンプルの方が高い吸光度を得た。また、「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清」サンプルと「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清・ネガコン」サンプルは、ほぼ同じ吸光度であった。このことから、血清溶液とインキュベートしたメンブレン上に血清成分の非特異的吸着が起こっていることが考えられた。しかし、「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清・抗

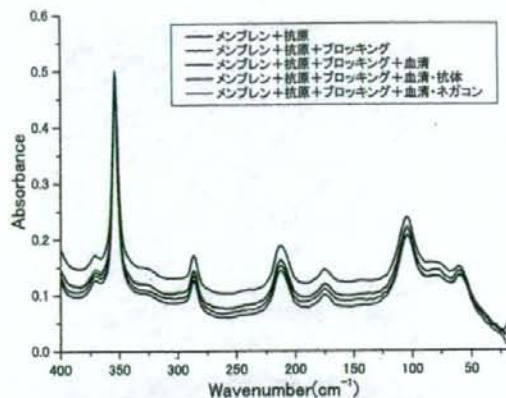


図5. 血清モデルサンプルを用いて調製したメンブレンサンプルの吸光度スペクトル

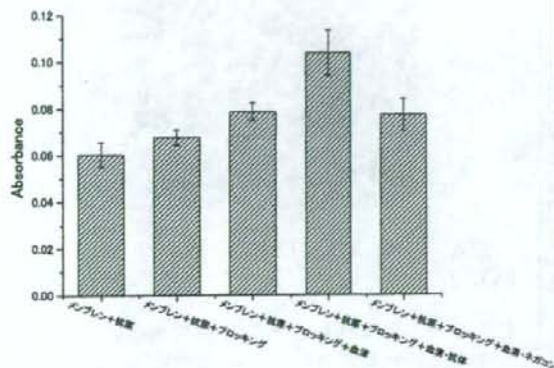


図6. 265cm⁻¹での吸光度および標準偏差

表2 各種吸光度スペクトルの吸光度 (@265cm⁻¹) および標準偏差

サンプル名	吸光度	標準偏差
メンブレン+抗原	0.06035	0.00537
メンブレン+抗原+ブロッキング	0.06777	0.00334
メンブレン+抗原+ブロッキング+血清	0.07865	0.00389
メンブレン+抗原+ブロッキング+血清+抗体	0.10375	0.00987
メンブレン+抗原+ブロッキング+血清+ネガコン	0.07726	0.00678

体」サンプルと「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清・ネガコン」サンプルの間で吸光度に有意な差がみられ、夾雑物存在下でも抗体の吸収をテラヘルツ光で測定することで標識を用いることなく抗体の有無を検出することができた。

実際の血清サンプルは入手や取り扱いが困難であったことから、本実験には市販の自己抗体フリーヒト血清に精製された抗体を加えることで調製した血清モデルサンプルを用いた。これを用いて実験したところ、血清溶液とインキュベートしたサンプルで吸光度が大きくなっており、血清成分がメンブレンに非特異的に吸着していることが考えられた。つまり、今回ウシ血清アルブミンを用いてブロッキング処理を行っていたが、夾雑物の影響を受けた結果を得たこととなる。このようなブロッキングの不十分さは、バックグラウンドノイズの上昇として現状法でも問題となっている。

現状では万能なブロッキング剤は存在しておらず、各メーカーから様々な種類のブロッキング剤が販売されており、実験ごとに検討する必要がある。しかし今回、このような非特異的吸着によると考えられる吸光度の増加はみられたものの、「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清+抗体」サンプルと「メンブレン+抗原+ブロッキング+血清・ネガコン」サンプルの間で吸光度に有意な差がみられ抗体を検出できたことから、夾雑物存在下でも、テラヘルツ光を用いて標識を用いず抗体を検出できることが示された。テラヘルツ光で測定する場合、どのようなブロッキング剤が適しているかは今後検討する必要があると考えられる。

今回の結果を踏まえると、256cm⁻¹での抗体 ng あたりの吸光度は、ペレットの測定結果より 2.0×10^{-7} (ABS) 程度と見積もられた。しかし本分光器には、0.004 (ABS) 程度のシステムノイズがあることから、抗体の吸収を測定するだけでは検出感度に限界があることは明らかである。現状のテラヘルツ技術は発展途上であり、ほかの帯域にくらべ優れた光源や高感度な検出器が存在しているとは言い難い。また、本研究は安価、簡便に測定する方法を目指しているため、検出感度向上のために装置を高性能化、複雑化してしまうと測定装置自体が高価となり、目的と解離することが考えられる。以上の結果より、金属メッシュのような簡便で安価なセンサ技術が重要であることが示された。

1.3 メンブレン+金属メッシュ測定法による高感度化の評価

BWO 実験系による単純透過測定の測定結果を図7に示す。同グラフには4連で調製したサンプルで標準偏差を求めた結果も示した。この結果より、BWOの測定範囲では抗体の有無による吸収の差はみられないことが分かった。次に、この同じメンブレンサンプルをメッシュセルと組み合わせ測定した結果を図8に示す。メッシュ上にメンブレンがのったことで、ピークの位置が大きく低波数側にシフトする様子が確認された。さらに、抗体サンプルの方がネガコンサンプルに比べて、より低波数側にシフトすることが確認できた。メンブレン上のタンパク質が多いと考えられるサンプルほど、スペクトルが低波数側にシフトする変化は、タンパク質付着に伴ってメンブレンの屈折率が大きくなるという予測と一致していた。

一点でみたときの吸光度変化を比較するために、定在波によると考えられるピークを避けて、29.2cm⁻¹の吸光度を比較した。表3に29.2cm⁻¹におけるメンブレンサンプルのみを透過測定した場合とメッシュセルと組み合わせ測定した場合の吸光度および標準偏差を示した。これをグラフにしたものを図9に示す。金属メッシュと組み合わせ測定することで、透過測定では観られなかった吸光度の差をみることができた。

本実験で測定したメンブレンサンプルは、サンプルの単位面積あたりの抗体量は前節のサンプルと同じである。本実験ではBWOの周波数特性の制限により、抗体の吸収が小さい低波数領域で測定したが、抗体の吸収が大きな高波数領域でメッシュと組み合わせ測定

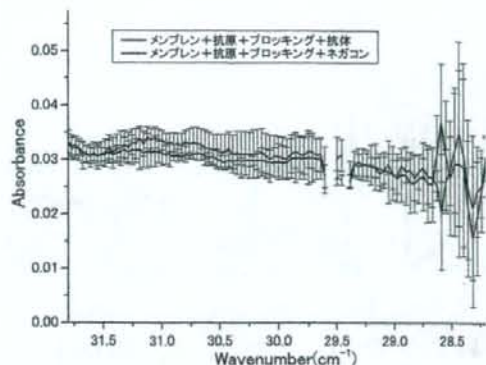


図7. メンブレンサンプルのBWO測定範囲での吸光度スペクトル

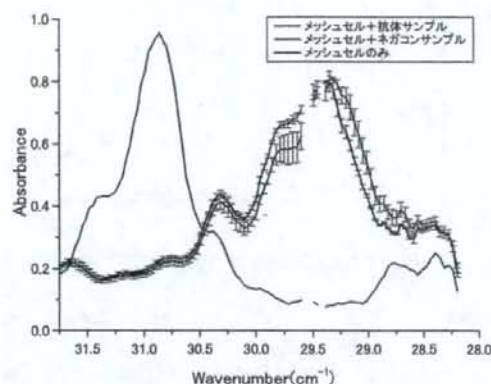


図8. メンブレンサンプルをメッシュセルと組み合わせて測定した吸光度スペクトル

表3. 29.2cm⁻¹における吸光度および標準偏差

サンプル	吸光度	標準偏差
メッシュセル+抗体サンプル	0.74874	0.0325
メッシュセル+ネガコンサンプル	0.64028	0.02047
抗体サンプル	0.02878	0.00178
ネガコンサンプル	0.02914	0.0037

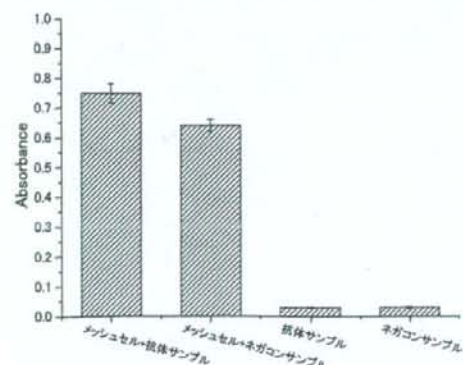


図9. 29.2cm⁻¹における吸光度および標準偏差

すると、吸収の効果による吸光度の変化に屈折率の効果による吸光度の変化が上乗せされるため、金属メッシュを用いることでさらに高感度化されると考えられる。今回はメンブレンに抗体が吸着することで屈折率が変化しており、それを金属メッシュで測定できることを示した定性的な実験であったため、実際にどこまで感度が上がるかを見積もることが出来なかったが、今後光源を変えるなどをし、定量的な実験で確認する必要がある。

サンプルの屈折率の効果を高める工夫として、メンブレンを薄く、小さくすることが考えられる。本研究では原理確認実験のため、メンブレン上の抗原に対し過剰量の抗体を用いて実験したが、微量なサンプルを測定する場合には、抗原に対し結合できる限界以下の量の抗体を測ることになると考えられる。この時、抗原に結合することで抗体はメンブレン上に濃縮されるため、同じ量の抗体であってもメンブレンが薄く、メンブレンの体積が小さい方が、より密に濃縮され、屈折率もより大きく変化すると考えられる。この考えを進めると、金属メッシュ上に直接抗原を固定し、検出することが最も高い感度を得られると考えられる。ただし、金属上に直接タンパク質を固定することについては、固定することによって抗原の立体構造が崩れ抗体が認識できなくなるなどの議論があることから固定化法については別途検討が必要と考えられる。

2. 牛乳中アレルゲンの検出実験

本研究の測定法は単位面積あたりのサンプル量に依存するため、図10中のストレプトアビジン量及びウサギIgG抗体量は、加えたストレプトアビジン及びウサギIgG抗体が全てメンブレン上に固定されたビオチンと結合したときの量を単位面積あたりで表記している。透過スペクトルは金属メッシュ単体の場合と同様に山型を示し、ニトロセルロースメンブレンのみの場合と比較してビオチン標識BSAの塗布および1%BSA溶液によるブロッキング処理により固定されたタンパク質等の吸収によって透過率が全体的に低下する様子が観測された。透過スペクトルのサンプル依存性を詳細に調べるために、図10に、透過スペクトルについて多項式による近似曲線から透過率のピークを求め、透過率のサンプル依存性を示す。ここで記す反応前とは、ビオチン標識BSAを塗布し、ブロッキング処理のみを行った試料のことである。反応前と比較して、ビオチンとは反応しないウサギのIgG抗体5.0ng/mm²およびストレプトアビジン0ng/mm²では透過率低下は見られないが、ストレプトアビジン1.6, 5.0ng/mm²についてはストレプトアビジン量が増加するにつれて透過率の単調な減少が観測された。また、これまでの実験において、反応するビオチン量を低下させると、本実験と同程度のストレプトアビジンを反応させても透過率の低下が観測されないことから、本実験におけるストレプトアビジンにおける透過率の低下は特異的な結合反応の結果であると考えられる。この検出感度は我々が目指す食品アレルゲンの検出に応用できる感度であり、本研究のセンシング法は標識を用いずとも高感度の検

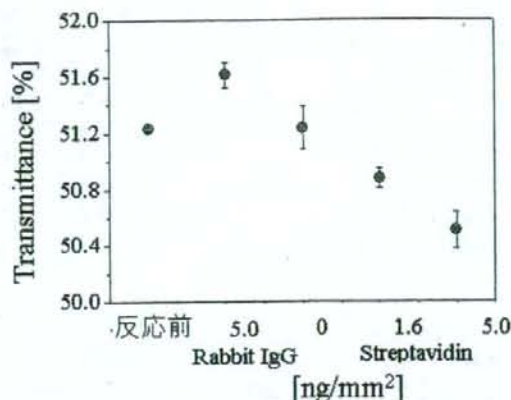


図 10. ストレプトアビジン-ビオチンの選択的な結合による透過率変化

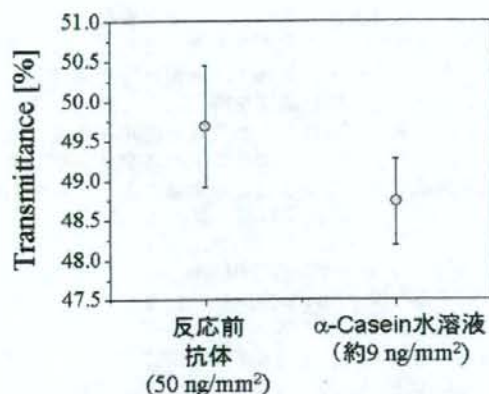


図 11. α-カゼイン抗体の検出実験結果

出が可能であることが示された。

図 11 に、図 10 と同様に抗 α-カゼイン抗体と α-カゼインによる抗原抗体反応における透過率変化を示す。ここで記す反応前とは、抗 α-カゼイン抗体を塗布し、ブロッキング処理を行った試料のことである。ニトロセルロースメンブレンに塗布した抗 α-カゼイン抗体量は 50 ng/mm²、反応した α-カゼイン量は抗体量から見積もって約 9 ng/mm² である。反応前と比較して、α-カゼインとの反応後に透過率の低下が観察された。ストレプトアビジン-ビオチン反応と同様に、抗原抗体反応においても ng/mm² オーダーのタンパク質の検出の可能性が示された。

3. 多点計測のための高感度画像化システムの基礎研究

3.1 テラヘルツ干渉イメージング法の測定原理検証

図 12 に板厚 500 μm と 400 μm のポリエチレンをサンプルとした時間波形を示す。透過性の高いサンプル上にミラーを配置すると、図中右下に示すように①シリコンとサンプル界面での反射、②サンプル上面のミラーからの反射、③2 往復目のミラーからの反射からの信号が時間波形に観測された。この結果をフーリエ変換し周波数軸のグラフで表すと、図 13 に示すように、

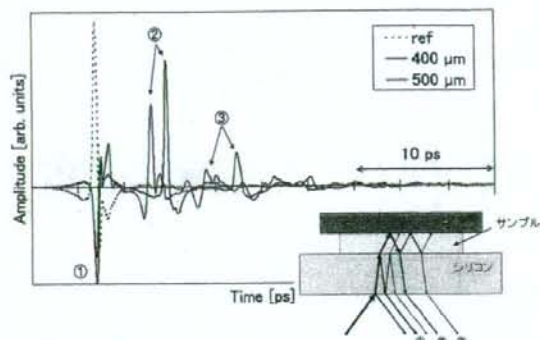


図 12. 時間波形で見た各界面からの反射波の様子

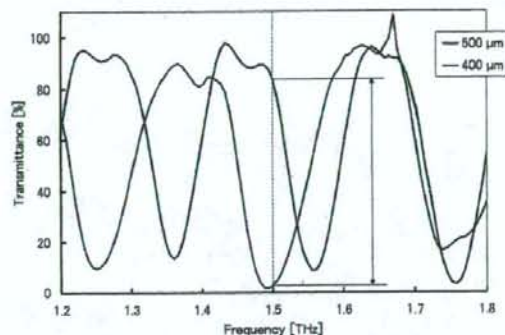


図 13. サンプルの上下面からの反射波による干渉波形

透過率スペクトルが干渉波となった。これは、先述の①や②による干渉である。また、厚み変化に伴うサンプル内を伝播する光路長に応じて干渉がずれて観測された。この結果、厚みが 100 μm しか変わらないポリエチレンの板でも、図中破線で示す周波数 (1.5 THz) において、透過率が 80 % も変化して観測された。このような測定系では、異なる周波数同士の透過率や透過強度を比較することはできないが、サンプルステージを XY 方向にスキャンし、任意の周波数で切り出した画像内であれば、透過率や透過強度の分布として比較することが可能となる。

以上の実験より、メンブレンのような生体高分子と結合することで屈折率が大きくなる場合、その部分で実効的な光路長が変化し、干渉がシフトすることが期待できることが明らかとなった。さらに、本手法は、面内方向にステージをスキャンすることで画像を得ることが可能となるため、部分的な光路長の変化が、透過強度の変化として画像化できることが予想された。

2.2 小分子とタンパク質の非標識検出実験

図 14 に本実験用に作成したメンブレン上のビオチンアレイの模式図と、蛍光標識によるストレプトアビジンの検出結果を示す。右図の蛍光画像において濃い色に見える部分が、標識されたストレプトアビジンが検出されている箇所である。メンブレンに固定化せず、ビオチン溶液を滴下しただけの下段 2 列は、当初の予想通り洗浄過程でメンブレンからビオチンが洗い流されたため、ストレプトアビジンと結合できていなかった。

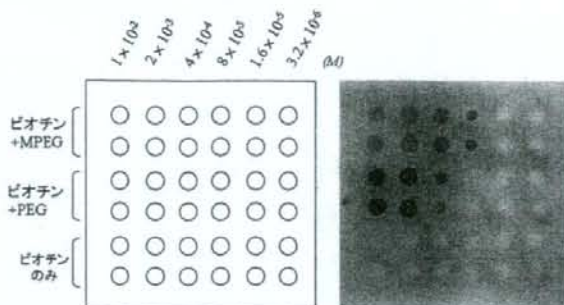


図 14. ビオチンアレイの模式図 (左) と標識つきストレプトアビジンとの結合後の蛍光画像 (右)

た。このことから、PEG によるビオチンの固定化が正しく出来ており、そのビオチンがストレプトアビジンとの結合能を有していることが確認できた。

次に、本実験システムで得た 1.5 THz での画像結果を図 15 に示す。こちらの画像は標識無しのアレイを反応させた非標識検出の結果で、明るいほど吸収が大きいことを示す。先の蛍光画像と同様に、下段 2 列のビオチン溶液のみを滴下した場所ではストレプトアビジンの存在が確認できなかった。さらに MPEG を使ってメンブレン上にビオチンを固定化した方の反応性が高く、この結果は蛍光法による傾向と同じであった。PEG と MPEG の差異については、まだ詳細な解析が出来ていないが、このようなリンカーとなる物質はさまざまなものが報告されており、小分子やメンブレンの種類に合わせた最適な手法があると考えられる。またわずかではあるが、蛍光画像では確認できていない低濃度 (1.6×10^{-5} M) でも吸収が見られ、Alexa₆₃₃ を用いた蛍光検出よりも少ない量まで検出できている。

本手法は、金属メッシュが苦手とする画像化を容易に行えると共に、従来法以上の微量検出が非標識で実現できている。今後様々な物質による結合検出実験や競合試験などを通じて、有効利用が期待できる研究成果と言える。ただし、本手法は現段階では大掛かりな THz-TDS を必要としている。このことは本装置を実用化する際のボトルネックになりうる。しかし今回の実験では、時間波形による反射波の確認が必要であったことと、新しい測定法の可能性を検証することを目標

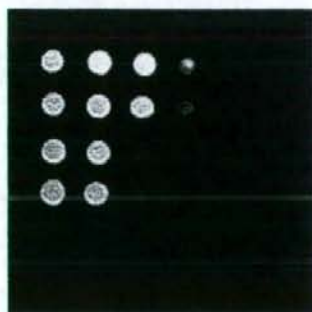


図 15. ビオチンアレイに結合したストレプトアビジンの非標識検出画像

としていたことから、必要十分な装置による実験であったと言える。今回の研究を通じて、メンブレンも透過測定用に製造されているわけではないことから、密度ムラのあるロットも確認されている。本手法に合わせこんだメンブレンの開発が可能となると、システムは単色光でも実現でき、さらに小型で簡便なシステムが考えられると期待できる。さらに、現在 THz カメラの開発が進み、実用化レベルまで到達しているとの研究報告もあることから、短時間での画像取得が可能となり、ハイスループットなバイオチップ技術になりうる可能性を秘めている。本手法を発展させると、創薬のリガンド探索に応用できると考えている。スクリーニングとして本手法を導入し、既知の候補物質アレイと未知のタンパク質群 (混合物) とを反応、画像化する。その結果、結合が見つかったその部分を切り出し、質量分析などを利用して結合したタンパク質の構造を詳細に調べることが可能となる。こういった利用法は、従来の標識化が困難な物質や、生体から抽出した混合物の状態のタンパク質群の分析に適していると考えられる。

D. 結論

本研究課題の目的は、THz 波の技術を使ったタンパク質のラベルフリー診断の可能性を実現化するための要素技術の開発である。前年度までの要素研究をふまえ、今年度はより実際に近い形での利用を検討した。具体的には、夾雑物下での非標識検出の検討や、自己抗体やアレルゲンを対象とした研究を進め、本手法の有効性や問題点を明らかにした。さらに、新しい非標識検査手法として干渉波を利用した手法を提案し、原理検証実験ならびに小分子アレイによる特定タンパク質の非標識検出を画像で行うことに成功した。

テラヘルツ帯の電磁波を利用することで実現できる金属メッシュセンサと干渉イメージング法は、ラポベルでの機器を使うことで研究を行ってきたが、本研究分担者が進めている専用の小型テラヘルツ波光源は、これらの検査手法とのマッチングが極めて高い光源として開発されつつある。特に高感度な金属メッシュセンサの急峻な透過特性を利用するのに適した 10GHz 以下の線幅を有していることや、干渉イメージングに必要な干渉性を兼ね備えている点、また波長可変性を有しており、基材にあわせた波長を選択できる小型でシステム化が容易な光源であり、本課題で進めている非標識検査装置のコアになる光源として最適なものと言える。また、本実験で使用した THz-TDS では原理的に必要以上の画像を多くの時間をかけて測定することになるが、本光源を用いることで、所望の周波数での画像のみを得ることができるため、測定時間の短縮が実現できるシステムとなる。今後、本事業終了後も引き続き、現在開発が進んでいる THz カメラなどの技術と組み合わせ、本課題で開発したセンシング技術と光源をベースとしたシステム化をすすめる予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 小川雄一, 林伸一郎, テラヘルツ波によるタンパク質の非標識検出, 分光研究, 57(5), 228-237(2008).
- Ogawa Y., S. Hayashi, M. Oikawa, C. Otani, and K. Kawase, Interference terahertz label-free imaging for protein detection on a membrane, Optics Express, 16(26), 22083-22089 (2008).
- 吉田永, 小川雄一, 林伸一郎, 大谷知行, 川瀬晃道, 金属メッシュセンサによる牛乳中アレルギーのラベルフリー検出, 照明学会, 8月号掲載予定

2. 学会発表

- Ogawa, Y, S. Hayashi, C. Otani and K. Kawase, Terahertz sensing for ensuring the safety and security, Progress in Electromagnetics Research Symposium (PIERS2008-Hangzhou), Invited, March 24-28, Hangzhou, China (2008)
- 吉田永, 川井泰英, 林伸一郎, 大谷知行, 川瀬晃道, 小川雄一, “金属メッシュによる牛乳中アレルギーのラベルフリー検出,” 第60回日本生物工学会大会, 東北学院大学土樋キャンパス, 仙台, Aug. 27-29 (2008)
- 小川雄一, 林伸一郎, “農学応用に向けたテラヘルツ波研究(招待講演),” 応用物理学会 量子エレクトロニクス研究会・テラヘルツ電磁波技術研究会合同研究会「テラヘルツ分光・イメージングとテラヘルツデバイスの物理」, 上智大学セミナーハウス(軽井沢), Jan. 10-12, 2008.
- 小川雄一, 林伸一郎, 吉田永, 程麗, テラヘルツ波による農学研究—食品分析から創薬まで—(招待講演), 電子情報通信学会2008年総合大会「ミリ波・テラヘルツ波デバイス・システムの進展」, 北九州市立大学, Mar. 19, 2008.
- 小川雄一, “テラヘルツ分光計測の適用の現状と展望(招待講演),” 第4回食物安全への赤外放射応用研究調査委員会, 東北文化学園大学, 仙台 (May 24, 2008).
- 小川雄一, 食・生物産業創成のためのテラヘルツ波研究(招待講演), 第74回テレコム技術情報セミナー「テラヘルツ実時間イメージング技術とその応用可能性」, コクヨホール, Jun. 27, 2008.
- 小川雄一, 林伸一郎 “テラヘルツ波の食品検査応用(招待講演),” 2008年JAIMA分析展コンファレンス「安心・安全な社会に貢献するテラヘルツ技術」, 幕張メッセ, Sep. 3 (2008).
- 小川雄一, 林伸一郎 “食の安全を守るためのテラヘルツ波技術(招待講演),” 東京コンファレンス2008 Plenary シンポジウム「未来の安全・安心社会をサポートする分析技術」, 幕張メッセ, Sep. 3 (2008).
- 小川雄一, “食の安全・安心のためのテラヘルツ分光利用(招待講演),” THz電磁波産業利用研究会, 大阪府商工会館7階第1講堂, Jan 15th 2009
- 小川雄一, “非標識イムノアッセイのためのテラヘルツ分光法(招待講演),” 日本化学会第89春季年会(2009)特別企画「テラヘルツ周波数領域から得ら

れる分子ネットワーク情報」, 日本大学船橋キャンパスS6会場, Mar. 30th (2009).

H. 知的財産権の出願状況

1. 特許取得
 - 特になし
 - 実用新案取得
 - 特になし
3. その他
 - 特になし

専用超小型テラヘルツ波光源の開発

分担研究者 林伸一郎 独立行政法人理化学研究所 研究員

研究要旨： ニオブ酸リチウム結晶をレーザー光によって数百 MW/cm² 以上で高強度励起すると、光子と格子振動が作るポラリトンを経た誘導ラマン散乱による広帯域テラヘルツ波発生が起こり、その発振線幅は数百 GHz ~ 数 THz の広帯域に及ぶ。このテラヘルツ波パラメトリック発生を礎にする従来のテラヘルツ波パラメトリック光源は、励起光のパルス幅の制約から大型となるため、励起光源を含むテラヘルツ光源全体としては卓上程度となってしまうばかりでなく、その長パルス励起による非線形光学結晶の熱的損傷閾値がテラヘルツ波出力を制限していた。本研究では、半導体レーザー励起の単一縦モード発振可能な短パルス小型励起光源を用いて光源全体の小型化を図ると共に、熱損傷閾値を緩和し、発生テラヘルツ波の波長可変範囲拡大を達成した。15 × 24 cm² 程度の小型テラヘルツ波パラメトリック光源から、アイドラー光に対して光注入を行うことによって、周波数可変範囲 0.9 - 3 THz、発生線幅 10 GHz 以下、尖頭値出力 100 mW 以上のテラヘルツ波を観測した。

A. 研究目的

パラメトリック波長変換によるテラヘルツ波光源は、非線形光学結晶と励起光源だけでテラヘルツ波を発生させるため、小型簡便かつ室温動作可能であり、ニオブ酸リチウム (LiNbO₃) 結晶のパラメトリック利得の広帯域性から、周波数領域も 1 THz 以下から 3 THz 以上と広い。従来、テラヘルツ波パラメトリック光源の小型化を制限していた要因のひとつに、励起光源が挙げられる。テラヘルツ波の波長制御のため、共振器によってアイドラー光を制御する際にパルス幅の長い励起光が必要であり、励起光源のサイズが大きくなってしまふ。共振器を用いないパラメトリック発生の場合、パルス幅の制約なくコンパクトな短パルス幅の励起光源を用いることができる。このとき、金属メッシュのような急峻なバンドパス特性を有効に利用するには、高出力かつ狭い線幅の波長可変光源が望ましい。発生するテラヘルツ波は励起光源の性質に依存するため、高出力化、広帯域化を目指す場合にはトップハット型の強度分布を持つマルチモード励起光源を、種光注入による線幅の狭化および波長可変化を目指す場合には線幅の狭い単一縦モード発振の励起光源を用いればよいこととなる。前年度まで前者の方式を検討し、有効な知見を得ることに成功した。そこで今年度は、後者の励起光源を用い、種光注入した場合に発生するテラヘルツ波の特徴について研究を行った。

B. 研究方法

Q スイッチ動作パルスレーザーから発生したレーザー光のような強電場を持つ電磁波が横光学フォノンモードをもつ非線形光学結晶を通過すると、光子と格子振動が結合してポラリトンと呼ばれる素励起状態を形成する。光強度が ~ 100 MW/cm² 程度以上のナノ秒パルスレーザーを用いてシングルパスで LiNbO₃ 結晶を

励起すると、帯域が 1 THz を超えるアイドラー光およびテラヘルツ波の発生が観測される。このシングルパス励起の広帯域なテラヘルツ波の発生をテラヘルツ波パラメトリック発生と呼ぶ。本実験で使用した実験装置の概略図を Fig. 1 に示す。励起光源には、マイクロチップ Nd:YAG レーザーを利用した。マイクロチップレーザーは、半導体レーザーによる後方励起のマイクロチップ Nd:YAG レーザーであり、Cr:YAG 過飽和吸収体によって受動 Q スイッチ動作し、単一縦モードのパルス光を発振する。結晶媒質は 5 mm 厚の 1.1 at% の Nd:YAG と 1 mm 厚のノンドープ Nd:YAG 結晶を拡散接合法に接合させ無反射膜を施したコンポジット YAG を利用し、共振器として高反射平面ミラー (M1, M2) を媒質に寄せるようにして配置している。このときの共振器長は 40 mm である。励起光アレイ状 LD の出力 (808 nm) をファイバーで導波させ 2 つのレンズ (f = 120 mm, 50 mm) により結晶中で焦点を結んでいる。このようにして手のひら半分程度の大きさ (105 × 30 × 32 mm) のサブナノ秒の単一縦モードパルス受動 Q スイッチ型 Nd:YAG マイクロチップレーザーを実現している。典型的なビーム特性は、最大パルスエネルギー 750 μJ、パルス幅 420 ps、ビーム径 0.28 mm (FWHM)、拡がり角 0.07°, 繰り返し 100 Hz、M² = 1.05、出力 2.3 MW である。注入光源は、単一縦モード発振の外部共振器型半導体レーザー (1065 - 1075 nm) であり、1 本目の結晶入り口において、角度位相整合条件を満たすように波長と入射角度を選択し、注入する。

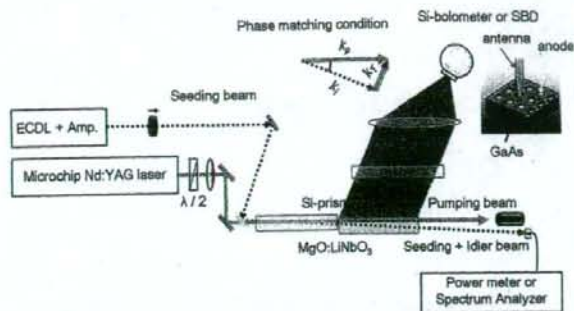


Fig. 1 実験装置概略

両端面に励起光 (1064 nm) に対する無反射膜を施した 2 本の MgO:LiNbO₃ 結晶 (各 4 x 5 x 65 mm³) を間隔 100 μm 以下になるように縦列配置し、レンズによって平行光となった励起光 (φ 0.3 mm) を入射した。励起光は結晶中を、ノンコリニア位相整合条件を満たす方向にアイドラー光およびテラヘルツ波を発生させながら通過する。このとき、注入光 (連続波, 出力: 100 mW, 波長: 1065 - 1080 nm) を、1 本目の結晶入り口において、ノンコリニア位相整合条件を満たすように波長と入射角度を選択し、注入する。

MgO:LiNbO₃ 結晶は数 THz 帯に大きな吸収係数 (10 ~ 100 cm⁻¹ @ 1 ~ 3 THz) を持つため、効率よくテラヘルツ波を取り出すためには、励起光を結晶の取り出し面近くを励起しなければならない。本研究では、出力テラヘルツ波が最大になるように調整した。発生したテラヘルツ波は、2 つ目の結晶の y 面に圧着したシリコン製プリズムアレイによって結晶外に取り出され、レンズ系で集光後、4 K シリコンボロメーターによって検出される。検出器が飽和する場合は薄膜減衰器を使用した。なお、テラヘルツ波の時間波形を取得する場合は、4 K シリコンボロメーターの代わりにショットキーバリアダイオード (SBD) を使用した。アイドラー光の強度、スペクトルはそれぞれ、パワーメーター、光スペクトラムアナライザーによって検出した。

C. 研究結果

Fig. 2 に、出力テラヘルツ波時間波形を示す。注入光を行う場合と行わない場合を重ねて示してある。励起光エネルギーはいずれの場合も 550 μJ/pulse である。注入光がない場合 (下方)、出力約 1 mW (尖頭値)、周波数 1.5 - 2.7 THz の広帯域なテラヘルツ波が観測された。光注入 (200 mW) を行った場合、出力約 20 mW (尖頭値)、周波数 1.6 THz のテラヘルツ波が観測された。これは、光注入を行わない場合と比較して 20 倍程度の出力増強である。

Fig. 3 に、光注入を行った場合の、メタルメッシュエタロンによる出力テラヘルツ波の波長および発生線幅計測の結果を示す。メタルメッシュエタロンの透過テラヘルツ波強度変化より、波長約 140 μm (周波数約 2.14 THz)、発生線幅 10 GHz 以下と見積もることができ。これは、光注入がない場合と比較して、100 倍以上の発生テラヘルツ波線幅の狭帯化 (1 THz 以上 → 10 GHz

以下) である。

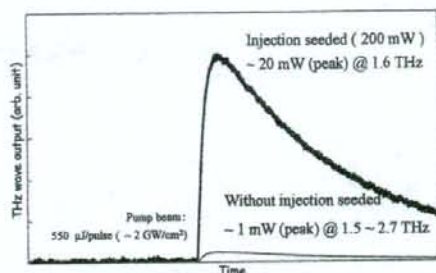


Fig. 2 テラヘルツ波出力時間波形。

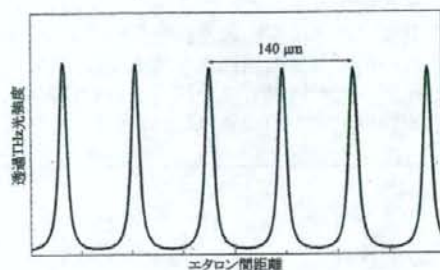


Fig. 3 波長および線幅計測例。

Fig. 4 に、テラヘルツ波出力の周波数依存性を示す。注入光の波長と励起光とのなす角を、ノンコリニア位相整合条件を満たすように変化させることによって、0.9 - 3 THz の範囲でテラヘルツ波の波長が変化する様子を観測した。最大のテラヘルツ波出力は、励起光エネルギーが 550 μJ/pulse、注入光が 100 mW のとき、約 100 mW (尖頭値)、1.85 THz 付近であった。1073 nm 付近に見られるテラヘルツ波出力の落ち込みは、損傷閾値向上のためにドーピングした MgO に起因している。MgO は LiNbO₃ の結晶に格子欠陥として作用するため、利得曲線に特定周波数における利得の落ち込みが現れる。

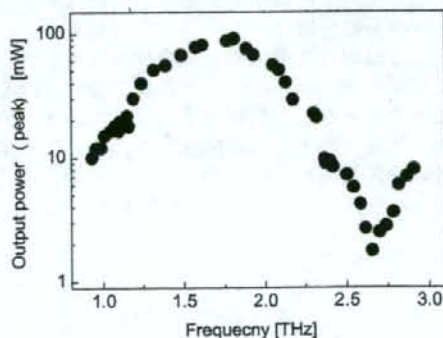


Fig. 4 テラヘルツ波出力の周波数依存性。

D. 考察

光注入を行った場合の発生テラヘルツ波線幅は、励起光および注入光の発生線幅、励起光強度に依存している。単一縦モード発振可能な励起光源を用いたことにより、フーリエ限界に迫る発生線幅を達成した。

E. 結論

小型短パルス、単一縦モード発振な励起光源を用いて光源全体の小型化を図ると共に、熱損傷閾値を緩和し、高強度励起による広帯域波長可変、高尖頭値テラヘルツ光源を実現した。15 × 25 cm²程度の小型テラヘルツ波パラメトリック光源から、波長可変範囲 0.9 ~ 3.0 THz、発振線幅 10 GHz 以下、最高出力 100 mW (尖頭値) のテラヘルツ波を発生・観測した。この小型励起光源、非線形光学結晶をベースとするコンパクトなテラヘルツ波光源は、常温動作で操作も簡便であり、テラヘルツ領域における応用研究において有力なツールとなることが期待される。以上の研究により、概ね 1 から 2.5 THz において異常透過やディップ構造を持つ金属メッシュセンサと組み合わせることで、小型かつ高感度な生体高分子非標識検査システムの構築が可能になることが期待される光源開発に成功した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 林伸一郎, 渋谷孝幸, 酒井博, 安井孝成, 平等拓範, 小川雄一, 大谷知行, 川瀬晃道, 「マイクロチップレーザー励起によるポータブル波長可変テラヘルツ光源」, レーザー研究, 印刷中。
- Shin'ichiro Hayashi, Hiroaki Minamide, Tomofumi Ikari, Hiromasa Ito, Yuichi Ogawa, Chiko Otani, and Kodo Kawase, "Tunability Enhancement of the Injection-seeded Terahertz-wave Parametric Generator pumped by a Microchip Nd:YAG Laser", submitted to *Appl. Opt.*
- Shin'ichiro Hayashi, Takayuki Shibuya, Hiroshi Sakai, Takanari Yasui, Takunori Taira, Chiko Otani and Kodo Kawase, "Stability of Terahertz-Wave Parametric Generator Pumped by a Microchip Nd:YAG Laser", in preparation.

2. 学会発表

- Shin'ichiro HAYASHI, Yuichi OGAWA, and Kodo KAWASE, "Terahertz wave parametric sources and applied researches (invited)," Yonsei Global Engineering Symposium "Humantronic Engineering", Yonsei Univ., Korea, 15 Feb. 2008.
- Shin'ichiro HAYASHI, "Injection-seeded THz wave parametric generator using microchip Nd:YAG laser (invited)," The 21st Annual Meeting of The IEEE Lasers & Electro-Optics Society (LEOS2008), Newport Beach, USA, 9 -

13 November, 2008.

- 林伸一郎, 「テラヘルツ光でみる世界」(依頼講演), 物理学の最前線, 明治大学, 川崎, 2008年7月。
- 林伸一郎, 小川雄一, 福永香, 川瀬晃道, 「テラヘルツ光の発生と分光イメージング応用」, 赤外ラマンシンポジウム, 東京大学, 東京, 2008年12月。
- Shin'ichiro Hayashi, Takayuki Shibuya, Hiroshi Sakai, Hirofumi Kan, Takunori Taira, Yuichi Ogawa, Chiko Otani, and Kodo Kawase, "Tunable Terahertz-Wave Parametric Generation Pumped by Microchip Nd:YAG Laser," MC-30, Nara, Jan 2008.
- S. Hayashi, T. Shibuya, H. Sakai, T. Taira, C. Otani, Y. Ogawa, and K. Kawase, "Palmtop Terahertz-wave Parametric Generator with Wide Tunability," Conference on Lasers and Electro-Optics and Quantum Electronics and Laser Science Conference 2008 (CLEO/QELS 08), San Jose McEnery Convention Center, San Jose, California, USA, May 4-9 2008.
- 林伸一郎, 渋谷孝幸, 酒井博, 安井孝成, 平等拓範, 小川雄一, 大谷知行, 川瀬晃道, 「マイクロチップ Nd:YAG レーザー励起による波長可変テラヘルツ光パラメトリック光源」, 第 69 回応用物理学学会学術講演会, 3p-ZE-2, 中部大学, 春日井市, 2008年9月3日。
- 林伸一郎, 渋谷孝幸, 酒井博, 菅博文, 平等拓範, 小川雄一, 大谷知行, 川瀬晃道, 「マイクロチップ Nd:YAG レーザー励起による波長可変テラヘルツ光パラメトリック光源」, 第 7 回理研・分子研合同シンポジウム エクストリームフォトニクス研究, P52, 理化学研究所, 和光 (May. 15 - 16, 2008).

H. 知的財産権の出願状況

1. 特許取得
 - 特になし
 - 実用新案取得
 - 特になし
 - その他
 - 特になし

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
小川 雄一, 林伸一郎	テラヘルツ波による生体高分子の非標識検出	分光研究	vol. 57, no.5	228-237	2008
Y. Ogawa, S. Hayashi, M. Oikawa, C. Otani, and K. Kawase	Interference terahertz label-free imaging for protein detection on a membrane	Optics Express	vol. 16, no.26	22083-22089	2008
林伸一郎, 渋谷孝幸, 酒井博, 安井孝成, 平等拓範, 小川雄一, 大谷知行, 川瀬晃道	マイクロチップレーザー一励起によるポータブル波長可変テラヘルツ光源	レーザー研究	vol. 37, no.4	278-289	2009
吉田永, 小川雄一, 林伸一郎, 大谷知行, 川瀬晃道	金属メッシュセンサによる牛乳中アレルギーンのラベルフリー検出	照明学会誌	vol. 93, no. 8	掲載可	2009

国際学会proceedings

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S. Hayashi, T. Shibuya, H. Sakai, H. Kan, T. Taira, Y. Ogawa, C. Otani, and K. Kawase	Tunable Terahertz-wave Parametric Generation pumped by Microchip Nd:YAG laser	Technical digest of Advanst Solid State Photonics 2008 (ASSP2008)		MC-30	2008
S. Hayashi	Injection-seeded THz wave parametric generator using microchip Nd:YAG laser	Proc. of The 21st Annual Meeting of The IEEE Lasers & Electro-Optics Society (LEOS2008)		790-791	2008
Y. Ogawa, S. Hayashi, C. Otani and K. Kawase	Terahertz Sensing for Ensuring the safety and Security	Proc. of PIERS 2008 in Hangzhou		408-412	2008
S. Hayashi, T. Shibuya, H. Sakai, T. Taira, C. Otani, Y. Ogawa, and K. Kawase	Palmtop Terahertz-wave Parametric Generator with Wide Tunability	Technical digest of Conference on Lasers and Electro-Optics and Quantum Electronics and Laser Science Conference 2008 (CLEO/QELS 08)		CTuHH7	2008

国内学会予稿集

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
小川雄一, 林伸一郎, 吉田永, 程麗	テラヘルツ波による農学研究-食品分析から創薬まで-	電子情報通信学会2008年総合大会プログラム エレクトロニクス講演論文集2と進歩〜講演要旨集		SS43-SS44	2008
吉田永, 川井泰英, 林伸一郎, 大谷知行, 川瀬晃道, 小川雄一	金属メッシュによる牛乳中アレルギーンのラベルフリー検出	第60回日本生物工学会大会講演予稿集		100	2008

小川雄一, 林伸一郎	食の安全を守るための テラヘルツ波技術	東京コンファレンス 2008 Plenary シン ポジウム「未来の安 全・安心社会をサポ ートする分析技術」講演 要旨集	19-20	2008
小川雄一, 林伸一郎	テラヘルツ波の食品検 査応用	2008年JAIMA分析 展コンファレンス 「安心・安全な社会に 貢献するテラヘルツ 技術」講演要旨集	ページな し	2008
小川雄一	非標識イムノアッセイ のためのテラヘルツ分 光法	日本化学会第89春季 年会(2009)特別企画 「テラヘルツ周波数 領域から得られる分 子ネットワーク情報」 講演予稿集	DVDファ イル	2009

テラヘルツ波による生体高分子の非標識検出

小川 雄^a・林 伸一郎^{a,b}^a東北大学大学院農学研究科 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1 (〒981-8555)^b理化学研究所 埼玉県和光市広沢 2-1 (〒351-0198)

(2008年5月16日受領, 2008年9月1日受理)

Label-Free Detection of Biopolymer Using Terahertz Waves

Yuichi OGASA^a and Shin'ichiro HAYASHI^{a,b}^aGraduate School of Agricultural Science, TOHOKU UNIVERSITY

1-1 Tsutsumidori Amamiya-machi Aoba-ku, Sendai, 981-8555

^bRIKEN 2-1 Hirosawa, Wako, 351-0198

(Received May 16, 2008; Accepted September 1, 2008)

In this paper, we demonstrated two label-free detecting methods of biopolymers. We found that the membrane array which immobilized small molecules was effective for the detection of the protein using THz-TDS imaging system. And a label-free protein sensor, which is based on the resonant transmission phenomenon of a metallic mesh, was proposed in the terahertz wave region. By using this sensor, we demonstrated the highly sensitive detection of small amount of protein and the label-free detecting of biotin-streptavidin or biotin-avidin interactions on a PVDF membrane.

Key Words: terahertz wave, imaging, membrane, metal mesh, label free sensing

1. はじめに

近年のレーザー技術や光計測技術の向上に伴い、未開拓の電磁周波数帯として取り残されていたテラヘルツ (THz) 波帯の応用開拓が可能となり、さまざまな分野で研究が進められている¹⁻⁷⁾。特に周波数が0.3から10 THzの領域、波長に換算すると1,000から30 μmの領域には、赤外吸収よりも弱いエネルギーに相当する吸収スペクトルが観測され、分子内および分子間の振動と緩和が共存している電磁波領域に相当する。また、タンパク質などの生体高分子は、水素結合や疎水性相互作用など弱い相互作用によってその機能の発現に必要な構造変化が生じている。これらタンパク質の機能発現に要するエネルギーは、室温の熱揺らぎと同程度であり、室温300 Kを周波数に換算すると、約6 THzに相当する。そのため、THz波帯の周波数を持つ生体高分子の大振幅振動モードが構造変化や機能発現に大きく寄与していることが推定され、THz波帯の分光スペクトルには生体高分子の高次構造に関連する情報が含まれていると考えられる。

一方、ライフサイエンス分野では、古くからさまざまな

手法を用いて生体高分子を分析してきた。中でも任意の生体高分子に着目する研究は、生体組織や細胞中の無数の生体高分子から分離する作業が不可欠である。この作業にはさまざまな手法⁸⁾があるが、例えば、電気泳動と呼ばれるタンパク質の電気的な大きさで分離する場合、電圧を加えながらタンパク質混合物を担体中に流して分離する。目的のタンパク質か否かは、メンブレンフィルター (以後メンブレンと記す) と呼ばれる高分子膜に転写後、目的タンパク質と選択的に結合する性質を持つ抗体との反応および標識化処理を経て任意のタンパク質の有無を検出する。つまり、この抗体 (一次抗体) がメンブレンの上に転写された複数のタンパク質の中から目的のタンパク質かどうかを選択していることとなる。これはタンパク質が選択的にある構造を持った生体高分子と結合することを利用した検出法であり、さらにこの一次抗体の上に反応させる二次抗体につけられた標識化合物で化学発光や蛍光の過程を経てようやく判別することが可能となる。こういった標識による検査法は、市販の分析ツールが揃っていることからライフサイエンス研究の現場だけでなく、BSE (牛海綿状脳症) などの食品検査や臨床検査でも特定のタンパク質を探し出

すために広く普及している。

特定のタンパク質を見つけ出すだけでなくタンパク質-タンパク質間や小分子-タンパク質間の結合性を数値で評価することで、タンパク質の機能評価やそれらから見出された知見を創薬に役立てる研究がある。こういった値を計測する手法として、分子間相互作用を測定する装置が市販されている。水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法は、水晶発振子基板上に吸着した物質の質量に比例して共振振動数が減少することを利用した分析ツールである。また、表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象を利用した装置も、広く普及している生体高分子間相互作用解析ツールのひとつである。これらの装置の詳細な解説は、既に多くの論文や書籍で紹介されていることから、ここでは参考文献を記すに留めることとする^{9,10}。QCM, SPR は共に、非標識で生体高分子間の結合状態をモニタリングする事が大きな特徴で、その結合と解離の様子から結合 (解離) 定数を算出するものである。これらの定数は、結合し易さの指標となることから創薬における候補物質のスクリーニングや評価指標として利用される。このような非標識による生体高分子の相互作用検出技術は、作業を簡便にするだけでなく、多検体の同時スクリーニングや、標識できないタンパク質なども分析が可能となることから、さまざまな分野で注目されている。

このような技術背景において、THz 波帯のエネルギーは、先述のとおり水素結合などの分子間の相互作用や、生体高分子などの巨大な分子のねじれ振動や低振動モードに相当するため、生体高分子の分析や検出に適していると期待できる。Brucherseifer らは結合状態の事なる DNA の吸収係数や屈折率がテラヘルツ帯で異なることを示し⁴、Mickan らはアビジンとビオチンの結合の有無を判別することに成功している^{6,7}。これらは THz 波技術が、生体高分子の相互作用を非標識で分析できることを示している。そこで我々は、THz 波帯における生体高分子の吸収や屈折率を利用した非標識相互作用検出法を開発し、創薬や診断、食品検査などの分野で THz 技術を役立てることを目指した研究を進めている。本報では、THz 波イメージングとメンブレンアレイを組み合わせた相互作用のスクリーニング手法と、金属メッシュセンサーを利用したセンシング法について紹介する。

2. 低分子化合物-タンパク質の非標識イメージング検出

あるタンパク質と特異的に結合することが出来る低分子化合物は、薬としての候補物質となりうる。そのため、多くの低分子化合物とタンパク質を一度に分析できるスクリーニング技術は、国際競争の激しい創薬分野において重要な技術になる。ここでは、低分子化合物のアレイを作成し、タンパク質との反応を THz 波画像で非標識に検出

る研究について述べる。

2.1 実験装置

本実験で使用したイメージングシステムは、テラヘルツ時間領域分光法 (THz-TDS) の光路中にサンプル稼動用のステージを配置し、サンプルのラスタスキャンにより画像を取得できるように構成されており、各周波数での透過率画像や、吸光度画像を得ることができる¹¹。THz-TDS の詳細については多くの解説^{12,13}があるため、ここでは簡単な説明に留める。THz 波の発生原理は、バイアス電圧を印加した光スイッチにフェムト秒パルスレーザーを当てた際に生じるキャリアによって瞬時電流を生じさせ、この時間微分に比例した THz パルス波が発生する。一方検出側はこの反対の構成をとっており、電圧を印加する代わりに電流計を取り付けている。THz 波発生時と同様にフェムト秒レーザーをアンテナのギャップに照射して光キャリアを生成させると、ギャップ領域の電気伝導度が増加して一時的にアンテナ回路が閉じた状態になる。この時、THz 波が検出素子に到着していると、検出素子に THz 波の電場による電界が加わることによってアンテナ回路に THz 波の振幅に比例した電流が流れ、その電流値が検出される。また、プローブ光と THz 波の間に光学遅延を与えることにより、その光学遅延に応じた時刻の THz 波の電場強度を検出することができる。サブピコ秒もの時間波形を取り込み再現できるほど高速に動作する検出器は存在しないことから、THz-TDS ではこの光学遅延により生じた僅かに異なる時間の電場強度を測定し、ひとつの時間波形とするサンプリング法が導入されている。このようにして得られた時間波形をフーリエ変換することによって位相と強度両方の周波数スペクトルに変換することが THz-TDS の大きな特長である。

本システムでは、波長 840 nm、出力 650 mW、パルス幅 100 fs 以下、繰り返し周波数 80 MHz のフェムト秒レーザー (Spectra-Physics, Mai Tai) を使用し、光スイッチには低温成長型 GaAs 膜 (Low-temperature grown GaAs, LT-GaAs) を用いた。また、光路の切り替えにより透過測定系と反射測定系による 2 種類の測定が可能で、共に試料室および光路は水蒸気の影響を取り除くために、測定前に一旦真空引きし (真空度 100 Pa 以下)、窒素パージを行って真空から大気圧に戻して測定を行う。図 1 に本イメージングシステムの光学系概略図を示す。光スイッチから放射された THz 波は 2 対の放物面鏡 ($f=152.4$ mm, $N.A.=0.244$) を用いた集光位置に試料を挿入する。測定試料は XY ステージ上に配置され、二次元に移動して各ポイント毎に分光測定を行いながら、順次ステージを動かしてイメージングを行う。反射測定系では、光スイッチから放射された THz 波は放物面鏡 ($f=237.1$ mm, $N.A.=0.26$) により集光され、サンプルに対して下から 20° で斜め入射する。サンプルからの反射光を測定して面方向にス