

図1 THz-TDS イメージング装置実験系

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 $10 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}$ 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ので空気から Si に THz 波が入射する際の損失は大きい、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° の入射角でサンプルに入射することとなる。

反射測定系では Si の上面とサンプルとの界面からの反射光が検出されるが、本実験でのサンプルとなるメンブレン (詳細は次節にて述べる) の透過率が高いことから、検出するタンパク質が微量であることから、図 2 に示すようにサンプルの上面にミラーを配置し、往復分の光路長による吸収を期待した光学系で実験を行った。また、予備実験の結果から、実験に使用したメンブレンの屈折率は約 1.1 と低く、そこに生体高分子が附着、浸透することで屈折率が大きくなる事が期待される。このことは屈折率変化に伴う Si 界面での反射強度の減少とともに、往復時の実効的な光路長が長くなる事が予想される。そこでまず、これらの影響を確認するために厚みの異なるポリエチレン板をサンプルとし、反射測定系 (サンプルの裏にミラーを配置した系) による時間波形ならびに周波数スペクトルを比較した。

図 3 に板厚 $500 \mu\text{m}$ と $400 \mu\text{m}$ 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面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 4 に示すように、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

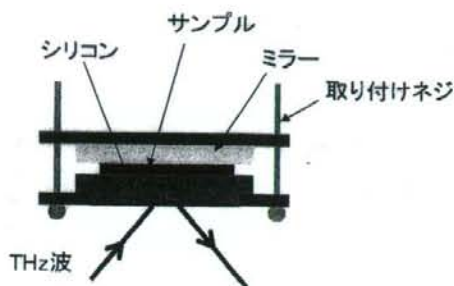


図2 反射測定系でのサンプル台模式図

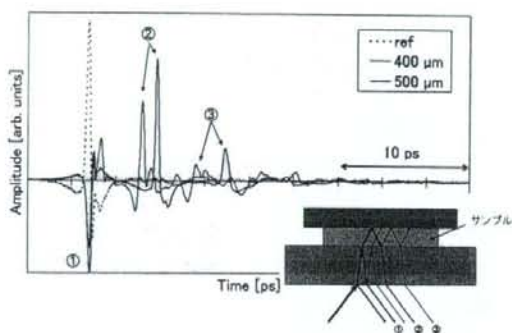
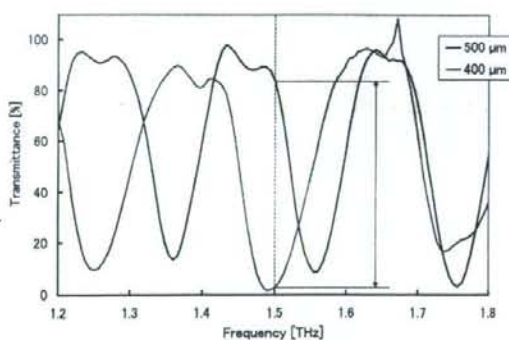


図3 サンプル上面にミラーを配置した際の THz-TDS による時間波形

図4 フーリエ変換後の透過率 (破線部は 1.5 THz を示す)

干渉がずれて観測された。この結果、厚みが $100 \mu\text{m}$ 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。

2.2 サンプル調製および実験方法

本実験では、電気泳動後のタンパク質やDNAの転写に用いられるメンブレンと呼ばれる高分子膜を小分子とタンパク質の結合検出のための基板に用いた。図5にBIO-RAD社製のポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンのSEM画像を示す。

このようにメンブレンは多孔質の膜であり、材質や空隙率が異なることで、生体高分子に対する結合能が異なる。BIO-RAD社製のタンパク質吸着能に優れたPDVFメンブレンとニトロセルロースメンブレンおよび、精密ろ過フィルターとして使用される、MILLIPORE社製5種の計7種を表1に示し、それらのTHz波帯における透過特性を調べた結果を図6に示す。なお、表や図中に使用した名称は実際の製品名称ではなく、著者が製品名称や材質を参考にして便宜上つけた名称である。また、表中の材質、タンパク質吸着能、孔径は各社のカタログを参考にしたものであり、厚さは筆者らが測定した実測値を示す。

さまざまな材質でTHz波帯に特徴的な吸収を示すことから、各種応用法に合わせて選択することが可能である。また、タンパク質やDNAなどの分析を行う際に、メンブレンの仕様として明記されている吸着能が必ずしも重要ではなく、メンブレン上に化学的な処理を行うことで選択的にホストとなる生体高分子を吸着できるようになる点も応

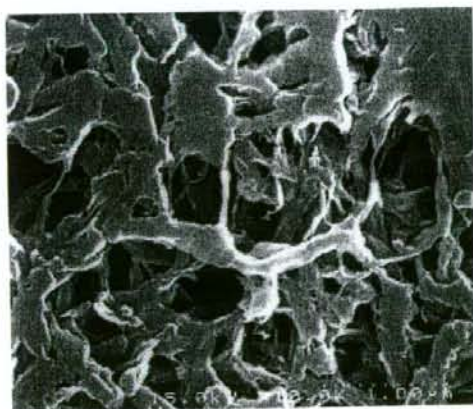


図5 PVDFメンブレンのSEM画像(×10,000)

用を考える上では注目すべき点である。また、DNAのような液体サンプルを基板上に滴下し、乾燥させてTHz-TDSなどで分光測定を行う際、乾燥ムラによりサンプルの状態が不均一になり測定結果に影響を与えることがあるが、メンブレンのように浸透性のある基板を採用することにより、その問題を解決できることもYoneyamaらによって報告されている¹⁴⁾。

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ふ。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^{15,16)}、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

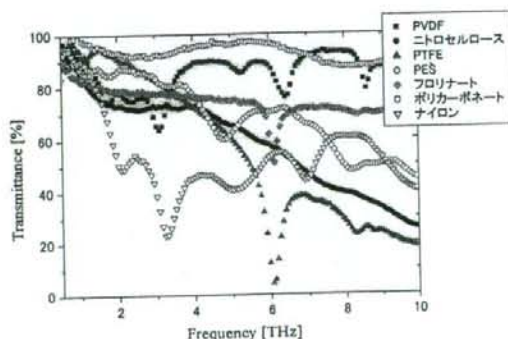


図6 各種メンブレンフィルターの透過特性

表1 各種メンブレンフィルターの仕様

名称	PVDF	ニトロセルロース	PTFE	PES	フロリナート	ポリカーボネート	ナイロン
材質	ポリビニリデンフロライド	ニトロセルロース	親水性ポリテトラフルオロエチレン	ポリエーテルスルホン	ポリテトラフルオロエチレン	ポリカーボネート	親水性ナイロン
タンパク質吸着率 (μg/cm)	150-160	80-100	NA	10	NA	3	—
孔径 (μm)	0.2	0.2	5	0.22	0.22	0.4	0.2
厚さ (μm)	115-120	125-130	125	160-180	175	7-22	165-170

NA: 測定不可

性相互作用により固定化した。固定化の際、ビオチンは $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ から $3.2 \times 10^{-6} \text{ M}$ 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 $0.2 \mu\text{l}$ 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。

2.3 実験結果

図7に先の方法で作成したメンブレンアレイの模式図と、蛍光標識による検出結果を示す。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、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。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。

先のTHz-TDSの反射測定系で得た 1.5 THz での画像結果を図8に示す。こちらの画像は標識無しストレプトアビジン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 ($1.6 \times 10^{-5} \text{ M}$) 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。

現在、他の生体高分子に対して本手法を用いた非標識検出も行っており、糖と糖蛋白(レクチン)の結合についても結合の有無を画像化することに成功している。図9にその例を示す。糖鎖は複数の糖が連なった化合物で、特に細胞表面上に存在する糖鎖はレクチンやウイルス、脂質などと結合し、細胞に情報を伝達することで、細胞の成長や感染、免疫機能などと密接に関連することから、生命活動においても重要な物質と言われている。しかし、結合力が抗原や抗体との結合のように高くないことから、相互作用

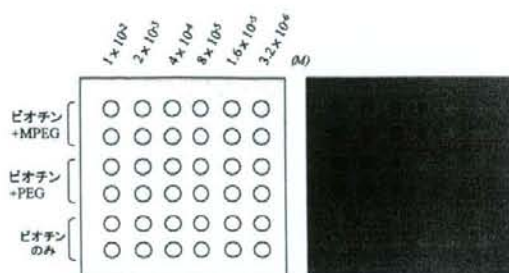


図7 ビオチンメンブレンアレイの模式図(左)と蛍光検出画像(右)



図8 ビオチンメンブレンアレイ上のストレプトアビジンの検出画像

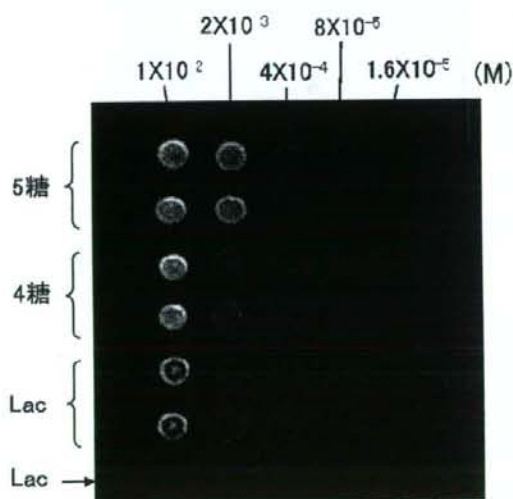


図9 糖鎖メンブレンアレイ上のレクチンの検出画像

の分析が難しいとされている。本実験では、糖鎖中のガラクトースに選択的な結合性を示すレクチン (Congerin I) との反応を先の実験と同じ方法でイメージングを行い、非標識検出を試みた。糖鎖は、5糖、4糖、ラクトースをそ

れぞれ上下2連ずつメンブレンに固定化し、一番下の段には固定化処理を行わないラクトースを用いた。先のビオチンのメンブレンアレイと同様に、固定化していない場合は洗浄などの処理によりメンブレンからはがれ落ち、レクチンと反応できていない様子が確認できた。また5糖や4糖の方がラクトースよりもレクチンと反応性が高い結果が得られたことは、各分子あたり5糖、4糖にはガラクトースが2個、ラクトースにはガラクトースが1個含まれることから妥当な結果と考えられる。

筆者らは、本手法を進展させた低分子化合物のメンブレンアレイによる非標識検査は、創薬分野において候補物質を迅速に探査するスクリーニング技術になりうると期待している。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。

3. 金属メッシュを用いたセンシング

前章で述べたイメージングによる分析手法は、複数の生体高分子と低分子化合物を一度に分析する際に有効であるが、食品中のアレルゲン（アレルギーの原因となる物質）の判別や、血液検査などでは検査対象が比較的少ないことから、個別もしくは数個程度のセンサチップによる簡便な検査法が望まれる場合もある。その際、分析装置やセンサチップ共に、簡便かつ安価なものが要求されることが考えられることから、出来るだけ簡単な構造で感度良く計測できる手法が必要となる。ここでは、金属メッシュと呼ばれる部材を利用し、感度良く生体高分子の相互作用を検出するセンシング方法について紹介する。

3.1 実験装置

食品分析や農学分野のような現場で利用することが望まれる分光装置は、取り扱いが簡便でメンテナンスの少ない機構が望まれる。また、測定対象物が農産物や食品などの複雑なものが多いことから、複素屈折率として実部と虚部を別々に算出するよりも、吸収スペクトルによる評価法が適している場合が多い。そのような点から、筆者らは市販のFT-IR（日本分光社製 FARIS-1）に改良を加えたTHz波分光光度計を開発し、それを用いた研究を展開している。以下にその分光器の概要を説明する。

本分光器の基本構成は中赤外などで用いられるFT-IRと同じである。マイケルソン型の干渉計で干渉波が生成され、その強度（インターフェログラム）をフーリエ変換することでスペクトル強度に変換されるシングルビームタイプの分光器である¹⁷⁾。一般の中赤外用FT-IRとの違いは、低波数側の光量が高輝度セラミックランプよりも勝っ

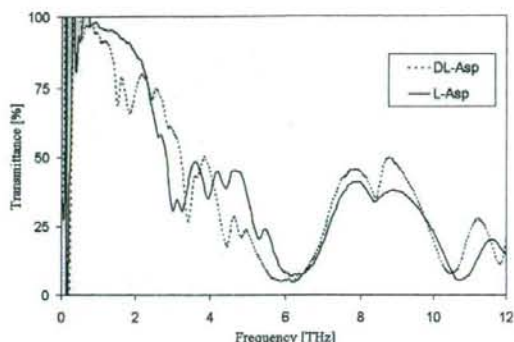


図10 FTIRによる2種類のアスパラギン酸の透過スペクトル

ている高圧水銀ランプを光源に用いている点と、干渉計内部のビームスプリッタにテラヘルツ帯で透過率の高い、シリコンが使われている点である。高圧水銀ランプはその高い発熱量から発せられる黒体放射がテラヘルツ帯で利用できる数少ない光源であるが、寿命が限られているため、高輝度かつ寿命の長い光源の誕生が望まれている。一方、シリコンは、遠赤外線用分光器のビームスプリッタに用いられているマイラーよりも屈折率が高いことから干渉効率を高めることが可能で、フォノンの吸収が見られる 620 cm^{-1} 以下であれば、テラヘルツ帯分光器用のビームスプリッタとして扱いやすい材料である¹⁸⁾。検出器には焦電検出器を用い、室温で測定可能な周波数領域は、0.6から12 THzである。本装置は簡便な測定を実現するために試料設置部の光路長7 mmを大気に開放しており、それ以外の光路は全て100 Pa以下に真空引きされた金属筐体に収められている。

図10にポリエチレン粉末（Shamrock S394-SD4；粒径7~9 μm ）で3%に希釈したL-アスパラギン酸とDL-アスパラギン酸（共に関東化学）の吸収スペクトルを示す。周波数分解能は60 GHz、積算回数は100回で測定した結果で、L体とD体の等量混合物（ラセミ体）であるDL-アスパラギン酸とL-アスパラギン酸でスペクトルの構造が異なる様子が確認できる。

3.2 金属メッシュの原理

金属面上に周期的に開口を形成した金属メッシュは、古くからマイクロ波帯での干渉用フィルタとして研究されており¹⁹⁾、これらの示すバンドパス特性を遠赤外用光学素子として利用する試みが、1960年代に報告されている。例えば、1962年 Renkらによって、100から800 μm の波長帯で分光スペクトルや干渉計を構成し、高いフィネスが得られることが報告されている²⁰⁾。1964年にはマイケルソン干渉計のビームスプリッタへの利用を想定した実験がVogelらによって報告され²¹⁾、1967年にはUlrichによって理論と実験による格子メッシュと逆格子メッシュの

特性に関する研究が報告されている²²⁾。国内でも同じ時期に三石らが金属メッシュの透過特性や反射特性を詳細に調べ²³⁾、1969年には阪井らが金属メッシュでファブリーペロー干渉計を構成し、遠赤外領域における水蒸気やCOガスの吸収スペクトルを報告している²⁴⁾。一方、光波の領域でもナノテクノロジーによる微細加工技術の向上により、波長に対して同程度もしくはそれよりも小さな周期構造の作成が可能となっている。Ebbesenらは、1998年に先の研究と同様の周期構造を持つ金属薄膜開口アレイが、可視光において異常透過特性を示すことを示した²⁵⁾。彼らが実験に使用した金属面上の開口径は、 $\lambda/2$ から $\lambda/10$ 程度と小さく、この条件に入射される電磁波の波長は金属開口のカットオフ波長よりも長くなるため、開口内での電磁波の振る舞いは減衰波となり、ほとんど透過できないことが予想されたが、開口を周期的に配列することにより、10%もの透過率を観測した。Ebbesenらは、この異常透過現象のメカニズムは、入射光が金属表面に励起された表面プラズモンと共鳴的に結合するためであると考えており、詳細については現在も活発な議論が交わされている。宮丸らは、光波帯での異常透過のメカニズムを踏まえてTHz波帯での金属開口アレイの透過特性を理解する研究を行っており、THz波帯においても、ある種の周期構造において金属表面に表面プラズモンポラリトン (SPP)²⁶⁾が励起され、それによる表面モードと導波モードにより、近似的に理解できるとの結果を報告している^{27,28)}。

今回実験に使用した金属メッシュは、金属の薄板に正方形格子状に正方形開口を配列したもので、厚さ t 、金属ストリップの幅の半値 a 、開口の1辺と金属ストリップ幅を足し合わせた格子定数 g という3種類のパラメータで表すことができる。図11に金属メッシュの模式図と $g=76.3\ \mu\text{m}$ 、 $t=6\ \mu\text{m}$ 、 $a=9.15\ \mu\text{m}$ の構造を持つ金属メッシュの透過スペクトルを示す。この開口形状の場合、THz波帯の偏光子として幅広く利用されているワイヤグリッドを縦横に重ね合わせたものと考えられるため、偏光依存性は示さない。金属メッシュの透過スペクトルは、先の金属開口アレイのように、格子定数の大きさと同程度の波長において、透過率が金属の開口率よりも共鳴的に高くなる領域が現れることが知られており、本実験で用いた図11の金属メッシュに関しても、開口率は57.8%にもかかわらず、3.37 THzでは90%以上の透過率を示す。

平坦な金属表面におけるSPPの分散関係は、金属の誘電率 ϵ_1 、金属に接する物質の誘電率を ϵ_2 とすると、

$$k_{\text{SPP}} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \quad (1)$$

と表すことができる²⁶⁾。ここで k_{SPP} はSPPの波数ベクトル、 c は真空中の光速、 $\epsilon_1 < 0$ 、 $\epsilon_2 \geq 1$ である。金属の二次元周期構造においては表面波と結合する共鳴周波数が異常

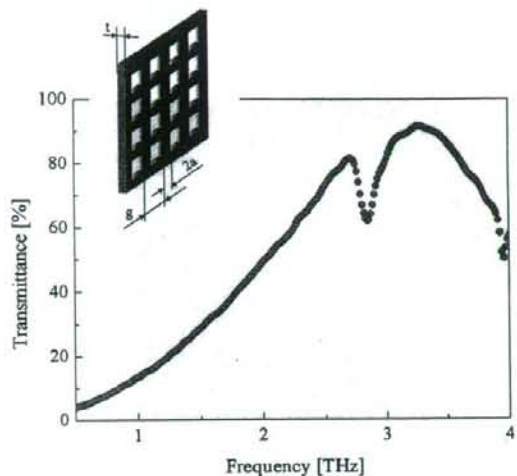


図11 金属メッシュの透過スペクトル

透過領域に相当し、 ϵ_2 の値に応じて、共鳴周波数は低周波側にシフトする。このことを利用し、サブテラヘルツ領域で三角格子配列の円形開口金属アレイを利用した微量センシングといった応用も報告されている²⁹⁾。また、図11に示す透過特性の2.8 THzに見られる共鳴的なディップ構造は、金属メッシュに対する斜入射成分によって生じるものである。その発生メカニズムの詳細は明らかになっていないものの、平行光束を金属メッシュに対して斜めから入射すると、このような共鳴的なディップが生じることは既に知られている³⁰⁾。今回、前節で説明した分光器はサンプルの前段に $f=101.6\ \text{mm}$ の放物面鏡を用いており、サンプルに対して集光光学系となっている。そのため、常に金属メッシュには斜入射する成分が存在し、それらの足し合わせとなって、このようなディップ構造が観測されることが考えられる。しかも、このディップは先の誘電率 ϵ_2 の変化によってバンドパス特性のシフトと共に低周波側にシフトするため、ディップ周波数を観測することでセンシングが可能となる。

金属メッシュはエレクトロフォーミング法による製造技術が確立されており、格子定数や開口幅をミクロン単位で設計できるため、あらゆるTHz波帯の周波数に対応した設計が可能である。次節では、エレクトロフォーミング法で作成したニッケル製の金属メッシュを使い、微量なタンパク質の検出実験を報告する。

3.3 生体高分子の非標識検出

3.3.1 サンプル調製および実験方法

金属メッシュの評価を行うには、金属メッシュに対して定量的なサンプル塗布技術が必要となる。そこで本実験では、一般に市販されているインクジェット方式のプリンタ(Canon PIXUS860i)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吐出量を調整した。

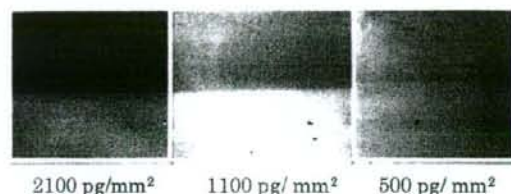


図12 発色実験の結果

サンプルには標識酵素として広く使われているペルオキシダーゼというタンパク質を用いた。今回使用したインクジェット方式のプリンタは、インクをプリンタヘッドから吐出する際に瞬間的に加熱し、その気泡によりインクを押し出す方式である。したがって、この方式のプリンタをサンプル塗布方法として導入する際、熱によるタンパク質の変性による失活が懸念される。そこでまず予備実験として、滅菌蒸留水にてペルオキシダーゼ（ナカライテック凍結乾燥粉末）を濃度2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/mlに調製後プリンタにて塗布を行い、染色法により熱影響を確認した。なお、各濃度は単位面積当たりに換算すると、濃い方から順に2100 pg/mm², 1100 pg/mm², 500 pg/mm²に相当する。以下、ここでは単位面積当たりの質量で表記することとする。ペルオキシダーゼは疎水中の溶媒中では125~150°Cで熱失活³¹⁾、またリン酸緩衝液中では70~95°Cで酵素活性が報告されているため、加熱の影響が大きければ失活し発色しないことが予想される。プリンタへのサンプルの供給には、通常使用するインクタンクを外して取り付けた、プラスチックチューブを介してペルオキシダーゼ水溶液をプリンタヘッドに供給した。印刷媒体には、タンパク質の転写に使用されるニトロセルロースメンブレン（BIO-RAD Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane (0.2 μm)）を用い、プリンタを使ってペルオキシダーゼの印刷を行った。さらにこれらを過酸化水素と1-クロロ-4-ナフトール溶液（BIO-RAD Immun-Blot Assay Kit）に浸し、発色を検出することで酵素活性への影響を確認した。

図12に発色実験の結果を示す。図中左から順に濃度が2100 pg/mm², 1100 pg/mm², 500 pg/mm²の印刷されたペルオキシダーゼの発色結果で、各写真の上段が印刷した部位、下段が印刷していない部位を示している。実験の結果、3段階の濃度いずれも発色反応を確認することができ、吐出時の熱はタンパク質の活性を失うほど大きな影響を与えないことが分かった。この結果を踏まえて、同様に2100 pg/mm², 1100 pg/mm², 500 pg/mm², 300 pg/mm²の濃度に調製したペルオキシダーゼ水溶液を金属メッシュ（ $g=76.3 \mu\text{m}$, $t=6 \mu\text{m}$, $a=9.15 \mu\text{m}$ ）に印刷し、分光器にて透過スペクトルの変化からペルオキシダーゼの検出を行った。

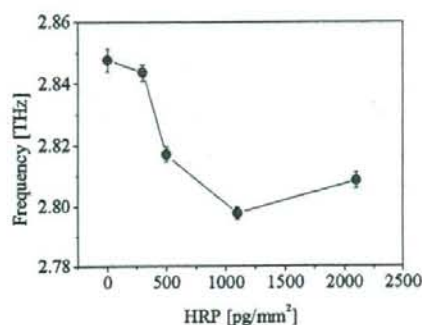
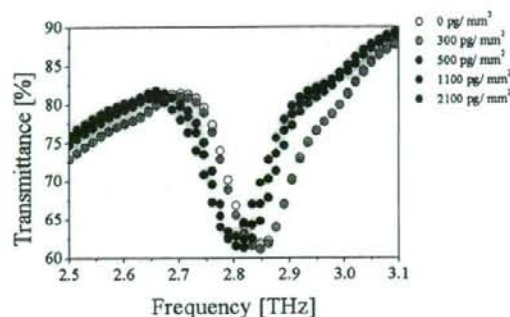


図13 ペルオキシダーゼ塗布による透過特性のシフト（上段：ディップ部拡大図，下段：塗布量に伴うディップ周波数のシフト）

3.3.2 実験結果³²⁾

図13にペルオキシダーゼを印刷した金属メッシュの透過スペクトルのディップ周波数部の拡大図を示す。3.2章で述べたように、金属メッシュ上にペルオキシダーゼを塗布すると、金属メッシュ近傍の誘電率の変化に伴い、金属メッシュのバンドパス特性は低周波側にシフトが観測された。本実験では、特にディップ周波数のシフトを観測することで、定量的な塗布によるシフトを観測した。また、図中下段の図はペルオキシダーゼの量とディップの周波数の関係を示しており、4段階のいずれの濃度においても、金属メッシュ単体（HRP 0.0 pg/mm²）と比較して透過特性の低周波側へのシフトが確認できた。ただし、サンプル濃度2100 pg/mm²においては、高周波側にシフトする傾向が確認された。この原因は、プリンタによる塗布量の多い量では印刷直後に近接の液滴が表面張力によって集まり、不均一な塗布になってしまったためと考えられた。しかし、500 pg/mm²から金属メッシュのシフトを観測することが出来ており、この濃度はペルオキシダーゼの分子量から換算すると11 fmolに相当する量の検出を行うことが出来た。

3.4 メンブレンを用いた非標識相互作用検出

3.4.1 サンプル調製および実験方法

次に、PVDFメンブレン上でビオチンとアビジンおよびストレプトアビジンと結合させ、そのメンブレンを金属メッシュに密着させて設置し、その透過特性のシフトから

低分子化合物とタンパク質の相互作用検出を試みた。汎用的にさまざまな低分子化合物をメンブレン上に固定化するには、前章で紹介した PEG などをリンカーとして利用することが望ましいが、本実験では相互作用検出のモデル実験としてビオチンとアビジン、ストレプトアビジンの結合を検出するため、メンブレンと BSA の結合性を利用した簡便な方法でビオチンをメンブレン上に固定化する方法を採用した。

サンプルの準備としてまず、PVDF メンブレンをビオチン標識化されたウシ血清アルブミン (BSA) (SIGMA 凍結乾燥粉末) の溶液に浸し、メンブレン上に BSA をリンカーとしてビオチンを固定化した。十分に乾燥させた後、0.1% BSA 溶液中でブロッキング処理を行った。その後緩衝液中で洗浄した後、アビジン及びストレプトアビジンとそれぞれ反応させた。反応後再び緩衝液で洗浄し、最後に純水で洗浄、乾燥後に FT-IR で分光測定を行った。測定は PVDF メンブレンのみとブロッキング処理後、アビジン及びストレプトアビジンとの反応後に行った。いずれも緩衝液成分の影響を除去するために、最後に純水で洗浄し、十分に乾燥させた後に測定した。今回用いた金属メッシュは $g=63.5\ \mu\text{m}$, $t=8\ \mu\text{m}$, $a=9.25\ \mu\text{m}$ で、3.67 THz にディップが観察されるものを使用した。

3.4.2 実験結果

図14にビオチン標識 BSA のアビジン及びストレプトアビジンとの反応による透過特性の変化を示した。縦軸には各反応段階のディップ周波数を示しており、段階的に低周波側にシフトする様子が分かる。これは PVDF メンブレンが金属メッシュに密着することで金属メッシュの開口近傍の屈折率が変化したためであり、その屈折率が各反応段階で大きくなっていることを示している。具体的にはまず、PVDF メンブレンと比較して、ビオチン標識 BSA の定着後のブロッキング処理によって低周波数側へシフトが観察された。これは主にビオチンよりも圧倒的に大きな分子である BSA の付着に起因すると考えられる。さらにアビジン及びストレプトアビジンとの反応によってさらに低周波

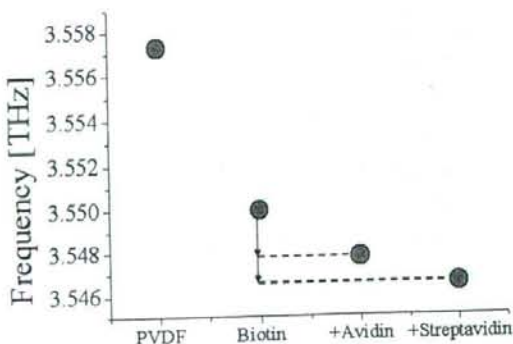


図14 各反応段階におけるディップ部の周波数

数側へのシフトが観察された。また、アビジンと比較してストレプトアビジンでのシフトの方が大きいことが観察された。このことはストレプトアビジンの方がアビジンよりも反応性が高いことを示しており、このような反応性の違いは古くから知られており、本実験系が正しく検出できていることを示唆する結果と言える。

今回メンブレンに結合させたビオチン量は $7.2\ \text{ng}/\text{mm}^2$ (29 pmol) であった。本実験結果から、メンブレン上でのビオチンとアビジンやストレプトアビジンの反応が金属メッシュで検出可能であることが明らかとなった。このことは金属メッシュによるセンシング法が、前章のメンブレンアレイに適用できることを示唆する結果であり、THz 波帯に感度を持つカメラ技術などと組み合わせることにより、簡便で迅速な分析装置になることが期待される。さらに今回シフトの解析に用いたディップの形状が、金属メッシュの開口形状や厚さ、THz 波の入射角度などを変えることで変化することから、より急峻なディップ構造を選択し、更なる高感度化が図れる。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。

4. おわりに

本稿では、テラヘルツ波の応用研究例として、筆者らが進めている研究を中心に紹介した。タンパク質の非標識検出に関する研究は、タンパク質の有無を判別するだけの極めてシンプルな分析手法であるが、生体高分子の特異的な結合能によってさまざまな応用可能性を秘めている。さらに我々は、非標識であることの最大のメリットは、夾雑物などを含む混合物の分析が可能になることと考えている。このことを積極的に利用することで、創薬分野や食品中アレルギー検査、ヒト血中の自己抗体量計測による病予診断、細胞まるごとの分析などへの応用が可能になると期待している。

最後に、本研究の推進にあたって貴重な助言、議論をいただいた名古屋大学の川瀬晃道教授、加藤英志氏、理化学研究所の大谷知行チームリーダー、信州大学の宮丸文章助手、本学生命科学研究科の及川雅人准教授、小川智久准教授ならびに筆者らの研究室に所属する吉田永さんに紙面を借りてお礼申し上げます。また、本研究の一部は厚生労働省科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業: ナノメディシン研究) の支援による。

参考文献

- 1) B. B. Hu and M. C. Nuss: *Opt. Lett.* **20**, 1716 (1995).
- 2) 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).

- 3 D. M. Mittleman, R. H. Jacobsen, and M. C. Nuss: IEEE J. Quantum Electron, 2, 679 (1996).
- 4 M. Brucherseifer, M. Nagel, P. H. Bolivar, H. Kurz, A. Bosserhoff, and R. Buttner: Appl. Phys. Lett. 77, 4049 (2000).
- 5 K. Kawase, Y. Ogawa, Y. Watanabe, and H. Inoue: Opt. Express 11, 2549 (2003).
- 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 G. Walsh: タンパク質ハンドブック (Maruzen and Wiley, 東京, 2003).
- 9 C. K. O'Sullivan and G. G. Guilbault: Biosensors Bioelectron. 14, 663 (1999).
- 10 J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz: Sensors and Actuators B 54, 3 (1999).
- 11 S. Nakajima, H. Hoshina, M. Yamashita, C. Otani, and N. Miyoshi: Appl. Phys. Lett. 90, 041102 (2007).
- 12 D. Grischkowsky, S. Keiding, M. van Exter, and C. Fattinger: J. Opt. Soc. Am. B 7, 2006 (1990).
- 13 阪井清美: 分光研究 50, 261 (2001).
- 14 H. Yoneyama, M. Yamashita, S. Kasai, K. Kawase, H. Ito, and T. Ouchi: Opt. Comm. 281, 1909 (2008).
- 15 M. Oikawa, M. Ikoma, and M. Sasaki: Tetrahedron Lett. 45, 2371 (2004).
- 16 M. Oikawa, Y. Takeda, and M. Sasaki: Tetrahedron Lett. 46, 4667 (2005).
- 17 田隅三生編: FT-IRの基礎と実際 (東京化学同人, 東京, 1994).
- 18 C. C. Homes, G. L. Carr, R. P. S. M. Lobo, J. D. LaVeigne, and D. B. Tanner: Appl. Opt. 46, 7884 (2007).
- 19 W. CULSHAW: IEEE Trans. Microw. Theory Tech., MTT-7, 221 (1959).
- 20 K. F. Renk and L. Genzel: Appl. Opt. 1, 643 (1962).
- 21 P. VOGEL and L. GENZEL: Infrared Phys. 4, 257 (1964).
- 22 R. ULRICH: Infrared Phys. 7, 37 (1967).
- 23 A. Mitsuishi, Y. Otuka, S. Fujita, and H. Yoshinaga: J. J. Appl. Phys. 2, 574 (1963).
- 24 K. Sakai, T. Fukui, Y. Tsunawaki, and H. Yoshinaga: J. J. Appl. Phys. 8, 1046 (1969).
- 25 T. W. Ebbesen L. J. Lezec, H. F. Ghaemi, T. Thio, and P. A. Wolff: Nature 391, 667 (1998).
- 26 H. Reather: *Surface Plasmons on smooth and Rough Surface and on Gratings* (Springer-Verlag, Berlin, 1988).
- 27 宮九文章, 近藤孝志, 長島 健, 萩行正憲: 電学論 A, 123, 995 (2003).
- 28 F. Miyamaru and M. Hangyo: Appl. Phys. Lett. 84, 2742 (2004).
- 29 F. Miyamaru, S. Hayashi, C. Otani, K. Kawase, Y. Ogawa, H. Yoshida, and E. Kato: Opt. Lett. 31, 1118 (2006).
- 30 J. M. Lamarre, N. Coron, R. Courtin, G. Dambier, and M. Charra: Int. J. Infrared and Millimeter Waves, 2, 273 (1981).
- 31 J. Saraiva, J. C. Oliveira, S. Oliveira, and M. Hendrickx: International Journal of Food Science and Technology 31, 233 (1996).
- 32 H. Yoshida, Y. Ogawa, Y. Kawai, S. Hayashi, A. Hayashi, C. Otani, E. Kato, F. Miyamaru, and K. Kawase: Appl. Phys. Lett. 91, 253901 (2007).

PROFILE



小川雄一 東北大学大学院 農学研究科 准教授
博士 (農学)

更). [専門] 農業工学, 食品工学, テラヘルツ生体工学, 応用光学

[略歴] 1997年, 岡山大学院農学研究科地環境農学専攻修了, ヤンマー農機中央研究所, 理化学研究所基盤技術開発室研究協力員, 同所川瀬独立主幹研究ユニット研究員, 東北大学大学院農学研究科助手を経て, 2005年東北大学大学院農学研究科助教授, 2007年より現職 (職階制度の変更).



林 伸一郎 東北大学大学院 農学研究科 助教
理化学研究所 基幹研究所先端光科学研究領域
テラヘルツ光応用研究チーム 研究員 理学博士
[略歴] 2000年, 明治大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻物理系博士前期過程修了, 明治大学理工学部助手, 2004年明治大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻物理系博士後期過程修了, 理化学研究所川瀬独立主幹研究ユニット研究員, 同所緑川レーザー物理工学協力研究員を経て, 2008年5月より現職に至る.
2005年より東北大学大学院農学研究科助手を兼任. [専門] 分子分光, レーザー物理, 応用光学

Interference terahertz label-free imaging for protein detection on a membrane

Yuichi Ogawa,^{1,*} Shin'ichiro Hayashi,^{2,1}
Masato Oikawa,³ Chiko Otani,² and Kodo Kawase,^{4,2,1}

¹Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Tsutsumidori-Amamiya-machi, Aoba-ku, Sendai 981-8555, Japan

²RIKEN SENDAI, 519-1399 Aramaki-aoba, Aoba, Sendai 980-0845, Japan

³Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Tsutsumidori-Amamiya-machi, Aoba-ku, Sendai 981-8555, Japan

⁴EcoTopia Science Institute, Nagoya University, Furo-cho, Nagoya 464-8603, Japan

*Corresponding author: yogawa@bios.tohoku.ac.jp

Abstract: We demonstrate a highly sensitive imaging method combined a terahertz time-domain spectroscopy and an interference effect for label-free protein detection on a polyvinylidene difluoride membrane. The method is based on terahertz time-domain spectroscopy and uses an interference effect. Biotin is linked to the membrane using poly ethylene glycol or poly ethylene glycol methyl ether to prevent it from being washed off. Binding of the biotin with streptavidin is then observed by measuring the terahertz signal change due to the variation of the membrane refractive index. We demonstrate the detection of the binding streptavidin protein in gradually decreasing concentrations, down to 27 ng mm⁻², using the image recorded at 1.5 THz.

©2008 Optical Society of America

OCIS codes: (170.6795) Terahertz imaging; (170.3880) Medical and biological imaging; (110.6795) Terahertz imaging.

References and links

1. M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown, "Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray," *Science* **270**, 467-470 (1995).
2. H. Zhu and M. Snyder, "Protein chip technology," *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 55-63 (2003).
3. N. Kanoh, S. Kumashiro, S. Simizu, Y. Kondoh, S. Hatakeyama, H. Tashiro, and H. Osada, "Immobilization of Natural Products on Glass Slides by Using a Photoaffinity Reaction and the Detection of Protein-Small-Molecule Interactions," *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 5584-5587 (2003).
4. S. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson, and W. Chai, "Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions," *Nature Biotechnology* **20**, 1011-1017 (2002).
5. J. M. McDonnell, "Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition," *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 572-577 (2001).
6. G. A. J. Besselink, R. P. H. Kooyman, P. J. H. J. van Os, G. H. M. Engbers, and R. B. M. Schasfoort, "Signal amplification on planar and gel-type sensor surfaces in surface plasmon resonance-based detection of prostate-specific antigen," *Anal. Biochem.* **333**, 165-173 (2004).
7. Y. Hatanaka, M. Hashimoto, and Y. Kanaoka, "A Rapid and Efficient Method for Identifying Photoaffinity Biotinylated Sites within Proteins," *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 453-454 (1998).
8. K. Kawase, Y. Ogawa, Y. Watanabe, and H. Inoue, "Non-destructive terahertz imaging of illicit drugs using spectral fingerprints," *Opt. Express* **11**, 2549-2554 (2003).
9. Y. C. Shen, T. Lo, P. F. Taday, B. E. Cole, W. R. Tribe, and M. C. Kemp, "Detection and identification of explosives using terahertz pulsed spectroscopic imaging," *Appl. Phys. Lett.* **86**, 241116 (2005).
10. M. Nagel, P. Haring Bolivar, M. Brucherseifer, H. Kurz, A. Bossert-Hoff, and R. Büttner, "Integrated THz technology for label-free genetic diagnostics," *Appl. Phys. Lett.* **80**, 154 (2002).
11. M. Brucherseifer, M. Nagel, P. Haring Bolivar, H. Kurz, A. Bossert-Hoff, and R. Büttner, "Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing," *Appl. Phys. Lett.* **77**, 4049 (2000).
12. B. Ferguson and X.-C. Zhang, "Materials for terahertz science and technology," *Nature Materials* **1**, 26-33 (2002).

13. M. Walther, P. Plochocka, B. Fischer, H. Helm, and P. U. Jepsen, "Collective vibrational modes in biological molecules investigated by terahertz time-domain spectroscopy," *Biopolymers* **67**, 310-313 (2002).
14. B. Fischer, M. Hoffmann, H. Helm, R. Wilk, F. Rutz, T. K.-Ostmann, M. Koch, and P. U. Jepsen, "Terahertz time-domain spectroscopy and imaging of artificial RNA," *Opt. Express* **13**, 5205-5215 (2005).
15. P. Matsudaira, "Sequence from Picomole Quantities of Proteins Electroblooded onto Polyvinylidene Difluoride Membranes," *J. Biochem.* **262**, 10035-10038 (1987).
16. M. Oikawa, M. Ikoma, and M. Sasaki, "Alkoxyacetyl (AAc) group as a useful linker for organic synthesis on poly (ethylene glycol) support," *Tetrahedron Lett.* **45**, 2371-2375 (2004).
17. S. P. Mickan, A. Menikh, H. Liu, C. A. Mannella, R. MacColl, D. Abbott, J. Munch, and X.-C. Zhang, "Label-free bioaffinity detection using terahertz technology," *Phys. Med. Biol.* **47**, 3789-3795 (2002).

1. Introduction

Many researchers have been investigating various microarray technologies for their potential to enable a comprehensive analysis of the interaction of various biomaterials. DNA microarrays [1] or protein biochips [2] are prominent examples of such technology. Imaging technologies allow fast, easy, and parallel detection of thousands of addressable elements in a single experiment. They can be expected to become a crucial tool for high-throughput drug discovery and life science. In these methods, label substrates, which might involve fluorescence, an enzyme reaction, or a radioisotope, are used for the detection of DNA and proteins. However, these procedures are complex and time consuming.

Molecular recognition due to the differential activity of proteins is important in many biological processes. In recent years, small molecules have also received much attention from drug discovery scientists. Small molecules, from natural resources, are an important source of bioprobes, which are useful in the study of protein function or pharmacological effect. To screen those combinations of small molecules and proteins which have a biologically important function, microarrays and SPR (surface plasmon resonance) sensors are studied or already commercialized. Since microarrays, with their ability of multiplexing series of individual samples, are suitable for high-throughput screening processes. Therefore, printing small molecules or carbohydrates on glass slides or on other solid surfaces have recently been researched [3, 4]. However, this method involves time-consuming labeling procedures or sophisticated experimental techniques. SPR is a major method for characterizing macromolecular interactions. It is an optical and label-free method that uses the evanescent wave phenomenon to measure changes in the refractive index very close to a sensor surface [5]. However, disadvantages of SPR for bioanalytical applications are its inherent low sensitivity for detection of small molecules [6] and the difficulty of applying to parallel analysis such as by imaging. Additionally, both methods need an expensive arrayer system to prepare a sensor chip. In order to solve those problems, an analytical method using a general membrane as a substrate was proposed, but since small molecules flow by the washing process, the method is still being studied [7].

In recent years, applied research has started in the electromagnetic frequency range between infrared and microwaves region: the terahertz (THz) waves; it is the last unexplored region of the electromagnetic waves. Recent remarkable developments in THz technology have made it clear that many substances have rich electromagnetic characteristics that can be considered fingerprint spectra in the THz range. Intermolecular modes, internal motion, or lattice vibrations in the case of crystalline materials may contribute to the THz spectrum. Because of the collective low vibration modes in the THz range, their position and strength is highly sensitive to the conformation and structure of the molecule. For this reason, various studies for THz applications are underway, such as the detection of illicit drugs and explosives in envelopes and other packages, and the label-free detection of DNA hybridization and protein interactions [8-14]. Here, we report on an interference terahertz label-free imaging technique to detect the interaction of protein and small molecules on a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a terahertz imaging system based on THz-TDS (time-domain spectroscopy).

2. Materials and sample preparation

In this experiment we acquired the images of the affinity binding between biotin fixed on (PVDF) membrane and the related bacterial protein streptavidin. The highly specific and strong binding of the biotin-streptavidin system has led to its wide usage in a variety of biotechnological applications. The PVDF membrane has been used as a support for sequence analysis of biopolymers [15]. Such a filter membrane has a porous structure and the percentage of voids is over 80 %. Therefore, far infrared light such as terahertz waves can easily penetrate the membrane filter and its refractive index is small ($k \sim 0.05$, $n \sim 1.1$). Some methods for immobilization of small-molecular substances such as biotin or natural products on glass slides have recently been developed [3]. Such small molecule arrays are not only useful for a comprehensive analysis of biological processes, but have also a potential for a high-throughput processes for creating and identifying synthetic ligands for any protein. Because the small molecular compound does not interact directly with the membrane, they flow off by washing after the reaction with the protein. To prevent flowing off of the biotin molecules from the membrane, we use a linking method, which consists in conjugating the biotin molecules with PEG (Sigma-Aldrich Poly (ethylene glycol), average molecular weight = 3400) or MPEG (Sigma-Aldrich Poly (ethylene glycol) methyl ether, average molecular weight = 5000) to the PVDF membrane. First, we prepared the biotin on the PEG or MPEG support using a chemical synthetic procedure [16]. A series of solutions (0.2 μ L) of small molecules conjugated with PEG or MPEG support (1×10^{-2} , 2×10^{-3} , 4×10^{-4} , 8×10^{-5} , 1.6×10^{-5} , 3.2×10^{-6} M (= mol/L)) was dot-blotted on the PVDF membrane in doublet. Each spot size was approximately 3 mm in diameter on the PVDF membrane. The membrane was immersed in the fixation solution (10 mL) for 10 min, followed by washing with water (10 mL, 2 \times 1 min, then 2 \times 5 min). The membrane was then immersed and agitated in a skim milk solution (10 mL) for blocking for 60 min and then in the skim milk solution containing streptavidin (2.0 mg/mL in water, 3.3×10^{-3} mL) at room temperature for 6 hr, washed with the DBB (Dot-Blot Buffer, 10 mL, 6 \times 5 min) and water (10 mL, 1 hr), and dried between Whatman papers for 120 min.

In this paper, to confirm the interaction with streptavidin, we prepared a membrane which was interacted with Alexa633-labeled streptavidin. This membrane was probed by a fluorescence image analyzer (FUJIFILM, FLA-2000).

3. Experimental methods

We used a multispectral reflection imaging system based on a THz-TDS to obtain an unlabeled image of biotin-streptavidin binding. The spectra were measured from 0.025 to 2 THz with 25 GHz resolution, resulting in 80 images. During the measurement, the spectrometer was purged with nitrogen gas to avoid absorption of the water vapor in the air. To yield high reflectivity of membrane surface, we constructed a high resistivity silicon plate (> 10 k Ω ·cm, 9.2 mm thickness) as a sample stage. A membrane sample was sandwiched between the silicon plate and a mirror (Fig. 1). We could observe the interference wave in the time waveform, which consists of a reflected wave from the surface of the membrane and the reflections from a mirror on the back side of the membrane. This indicates that we can use an interference effect such as in a Fabry-Perot etalon to achieve a highly sensitive measurement. When streptavidin is bound with biotin on the membrane, we expect that the refractive index becomes higher than in the parts without streptavidin. This change of the refractive index causes a change of the effective path length through the membrane. Consequently, the interference wave pattern after the Fourier transform (FT) shifts to the lower frequencies. Figure. 2 shows a comparison of the time waveform and its FT spectrum for different thicknesses of the polyethylene sheets (400 μ m and 500 μ m) instead of a refractive index change. A 100 μ m difference of thickness was detected as a transmissivity change of as much

as 80 % at 1.5 THz (as shown in Fig. 2 (b)). We chose this frequency for our measurements to achieve a contrast as high as possible.

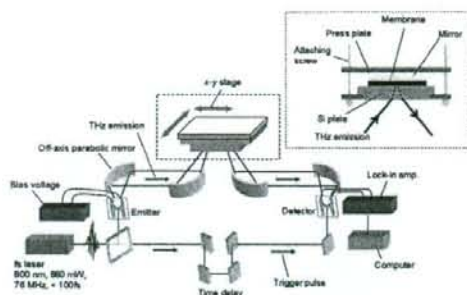


Fig. 1. Schematic diagram of the terahertz imaging system based on a THz-TDS. The inset shows a cross-section of the sample stage.

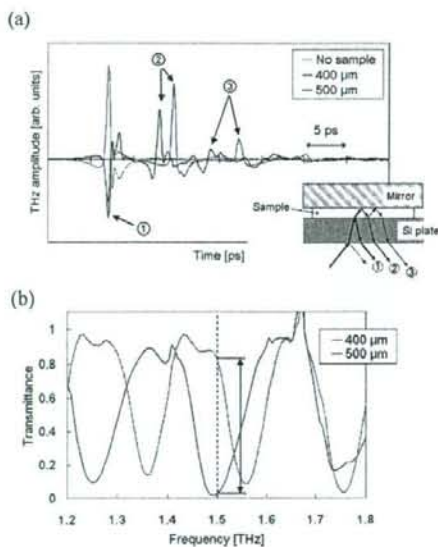


Fig. 2. Time-domain THz pulses obtained by measuring the difference signal between (a) no sample, 400 μm and 500 μm thickness of polyethylene; (b) frequency spectrum of the THz power. The inset on the upper figure (a) shows the schematic diagram of the reflected THz pulses.

4. Result and discussion

Figure. 3 shows a schematic of the membrane and a detection result of fluorescently-labeled streptavidin.

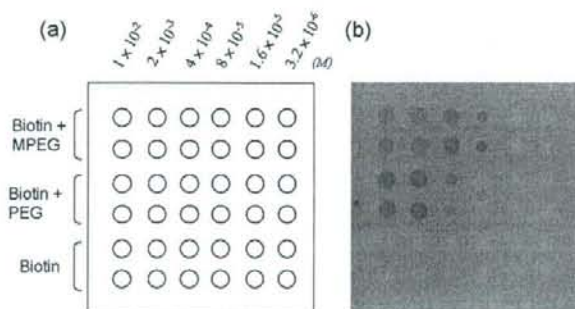


Fig. 3. (a) Schematic of the membrane with the array of samples and (b) scanner image (35×35 mm) of fluorescently-labeled streptavidin on membrane.

In Fig. 3 (b) we show the detected image of fluorescently-labeled streptavidin (gray dots) using Fluorometric Imaging Scanner. At the two bottom lines, where biotin was not immobilized on the membrane, we could not confirm the presence of the bonding with streptavidin. That reason is that biotin molecules had been washed out from the membrane during the washing process. This indicates that PEG and MPEG were effective for the immobilization of biotin molecules on the PVDF membrane. Furthermore, we could confirm that such immobilized biotin preserves the binding capacity with streptavidin.

The THz image of the membrane was acquired with the imaging system based on THz-TDS, as shown in Fig. 4.

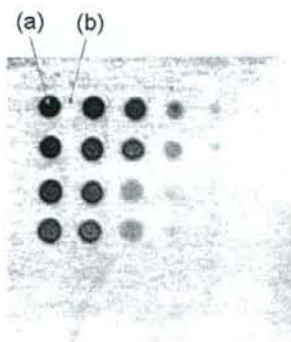


Fig. 4. THz image of the membrane at 1.5 THz. The image size is 171×171 pixel and the spatial resolution is $200 \mu\text{m}/\text{pixel}$. The dark spots show the binding of biotin with the non-labeled streptavidin.

The image of the binding between biotin immobilized on the membrane using PEG or MPEG and the non-labeled streptavidin was obtained. Lower brightness shows a high bonding amount of streptavidin. As in the case of the fluorescent labeling image, the binding of streptavidin at the two bottom lines was not observed in the THz image. In this experiment, we could not confirm less than 8×10^{-5} M streptavidin from fluorescent labeling image (Fig. 3),

however, using the label-free THz imaging we succeed in detection of 1.6×10^{-5} M (27 ng mm^{-2}) streptavidin at the two top lines (Fig. 4). The highest concentration spots (1.0×10^{-2} M) of streptavidin content correspond to approximately $17 \mu\text{g mm}^{-2}$. By comparison, in binding with and without streptavidin, even at the highest concentration biotin, the transmittance change was below 1% using a normal THz-TDS transmission system and we could not detect lower concentration binding.

Figure 5 shows a transmittance spectrum of the points (a) and (b) in Fig. 4. An interference spectrum caused by the optical path difference due to the varying refractive index of the membrane is observed. The spectrum form shifts only slightly with the binding of streptavidin. This indicates that the binding between biotin and streptavidin leads to a change of the refractive index of the membrane. We can see the drastic change of the signal at 1.5 THz, which in this case is approximately 20%, corresponding to a concentration of streptavidin content of approximately $17 \mu\text{g mm}^{-2}$.

In both results, by fluorescent labeling and by THz non-labeled imaging, we can see that the binding affinity of biotin immobilized in MPEG is higher than in PEG. The difference of reactivity of PEG and MPEG does not become clear at this time. However, we can choose the most suitable method to immobilize the small molecules on the membrane, as many kinds of linker material and base materials have been reported.

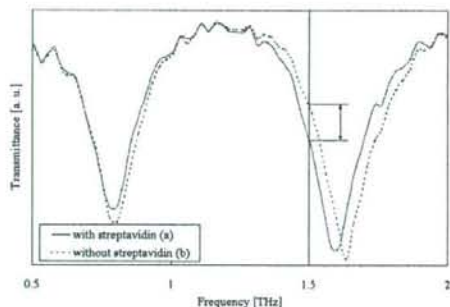


Fig. 5. Measured spectra of a membrane are without streptavidin (dashed curve) and with streptavidin (solid curve). The measurement points correspond to areas marked (a) and (b) in Fig. 4.

5. Conclusions

We have demonstrated a highly sensitive imaging method for label-free protein detection on a membrane. To prevent biotin from flowing off the PVDF membrane, PEG and MPEG were found to be effective immobilizers, without affecting the binding capacity of streptavidin. In our experiment, a detection limit of 27 ng mm^{-2} streptavidin from an interference THz image at 1.5 THz has been achieved. This sensitivity is not better than Michan's method [17]. This time we used a commercial membrane designed for protein analysis. However, if we can develop a more suitable substrate instead of the membrane for this method, higher sensitive can be expected. Additionally, since this interferometric method does not need an optical delay in principle, an inexpensive system, whose THz source is a QCL, a BWO or a parametric tunable THz source, can be constructed.

The binding specificity of the membrane, that is, the amount of biotin that adheres to it, depends on the membrane material and linkers. THz imaging is used only to detect the existence of the binding. As linkers, PEG and MPEG have proved to be useful not only for the biotin molecule but also for other low-molecular compounds. This property is suitable to a

high throughput detection for drug discovery. We expect that our method can be used in a variety of applications such as medical diagnosis and allergy testing based on an antigen-antibody reaction, and as a sensor for industrial use.

Acknowledgments

The authors are grateful to Adrian Dobroiu for the valuable discussion and encouragement. We would like to acknowledge the support of a Grant-in-Aid for Young Scientists (18070501) from The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

金属メッシュセンサによる牛乳中アレルゲンのラベルフリー検出

非会員 吉田永 (東北大学)・非会員 小川雄一 (東北大学)・非会員 林伸一郎 (理化学研究所, 東北大学)
非会員 大谷知行 (理化学研究所)・非会員 川瀬晃道 (名古屋大学, 理化学研究所, 東北大学)

Label-free detection of allergen in milk using a metallic mesh sensor

Non Member Hisa YOSHIDA (Tohoku University), Non Member Yuichi OGAWA (Tohoku University),
Non Member Shin'ichiro HAYASHI (RIKEN, Tohoku University),
Non Member Chiko OTANI (RIKEN) and Non Member Kodo KAWASE (Nagoya University, RIKEN, Tohoku University)

ABSTRACT

We propose a new label-free allergen sensing technique using a metallic mesh and nitrocellulose membrane which is generally used for fixation of protein. Our sensing method relies on a change in the transmittance of terahertz (THz) radiation passed through the metallic mesh on which a sample substance is contacted. Label-free detection using THz radiation is a new technique in biomedicine, which enable us to take easier and faster food allergen inspections.

By using this technique, we demonstrated detecting interaction between a streptavidin - biotin, and α -casein - anti α -casein antibody on each membrane. The streptavidin - biotin interaction can be detected by 1.6 ~ 5.0 ng/mm² streptavidin. The possibility of detection that the α -casein - anti α -casein antibody interaction is shown in case of 9.0 ng/mm² α -casein. These results indicate that our sensing system has enough sensitivity to detect allergen in food.

KEYWORDS : label-free, metallic mesh, membrane, terahertz wave, allergy test

1. 緒言

子供の食物アレルギーは年々増加の傾向にあり、小学生以上の有病者数は約 32 万人にのぼり、全児童数の 1 ~ 3 % と報告されている¹⁾。このような食物アレルギー反応の中で、免疫グロブリン E (IgE) 抗体が介在して起こる反応がよく知られている。この抗体は、皮膚や腸粘膜、気管支粘膜、鼻粘膜、結膜等でマスト細胞と呼ばれる細胞と結合した状態で食物抗原 (アレルゲン) と出会うことにより化学伝達物質の放出を誘導し、アレルギー反応となって現れる。この過程は、アレルゲンを含む食物の摂取から約 2 時間以内に発症するのがほとんどである²⁾。食物アレルギーを引き起こす物質は、乳幼児期は鶏卵が 40% 程度と多く、次いで牛乳など乳製品が 30% 程度を占めている³⁾。このような状況において、学校給食では除去食の対応が最も多く、使用食材の情報開示等も進められている。一方で、調理員の不足や施設の不備、またアレルゲンの種類が多いことなどから対応が十分に行えない学校もある⁴⁾。現在食品中のアレルゲンの検出原理には 2 つあり、一つはアレルギー食品をそれぞれに対応する抗体で検知する方法、もう一つはアレルギー食品由来の DNA を検知する方法がある。抗体を検知する方法では、標識抗体を利用した ELISA 法やウエスタンブロッティング法が広く用いられている。食品中のアレルゲン検査は、検査に時間と熟練を要するという点や、発色に際し有害な廃液が生じるなどの理由から、検査

の必要性は高いものの身近な検査として定着するには至っておらず、現在は大規模な食品製造現場などに限られている。そこで筆者らは、これらの問題を解決するために、食品アレルゲンの簡便かつ迅速なラベルフリー検出法を目指して研究を行っている。ラベルフリー検出法には、標識・発色過程が省略でき検査自体が簡便になるという利点がある。さらに検出に標識を用いないことから、検査対象ごとに標識を変える必要がなく、一度に複数のアレルゲンを検出できる可能性があるが、一般に食品中のアレルゲンの検査には、数 ng ~ 数 μ g の精度が必要とされており、高感度な検査手法が必要となる。分子間相互作用を解析する方法として、水晶振動子マイクロバランズ (QCM) 法と表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象を利用した方法がある。QCM, SPR は共にラベルフリーで生体高分子間の結合状態をモニタリングすることが大きな特徴で、分子間の結合 (解離) 定数を時間変化に応じて算出するものである。これらは創薬における候補となる物質のスクリーニングや評価指標として利用されている優れたツールであるが集積化が難しく、また本研究が目指すアレルゲン検査のようにアレルゲンとなるタンパク質の有無を簡便に検出する技術とは性格が異なり、食品製造現場でのアレルゲン検査には新たなラベルフリー検出技術が求められている。

近年、周波数 0.1~10 THz の遠赤外領域のテラヘルツ (THz)

波に見られるDNAやタンパク質などの巨大分子の低振動モードによる吸収や屈折率変化を利用したラベルフリー診断の可能性が報告されている⁴⁾⁶⁾。一方、1960年代から格子状の開口を有する金属製のメッシュ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、様々なメッシュ形状や開口サイズを持った金属メッシュの周波数特性を明らかにすると共に、メタルメッシュエタロンとして利用した分光方法なども提案されている⁴⁾⁷⁾。このようなバンドパス特性は、金属メッシュの周期構造が入射する波長と同程度であるときに観測される現象であることから、この領域で利用するには数十から数百マイクロメートルであれば良く、簡便で安価な手法で金属メッシュを作ることが可能となる。そのため、これらを用いたこの領域の新しい光学素子やセンサの研究が行われている⁴⁾¹⁰⁾。金属メッシュのバンドパス特性は金属面近傍の複素屈折率の影響を受けて、透過スペクトルが低周波数側にシフトし、それによって透過率変化が金属メッシュを用いないときと比較して大きくなり、このことを利用した金属開口アレイによる高感度表面センサが提案されている。我々はこれまで金属メッシュによるメンブレン上のインクの検出¹¹⁾及び金属メッシュによるペルオキシダーゼの検出¹²⁾について報告してきた。メンブレンは、タンパク質などの生体高分子を定着させる基材としてライフサイエンス分野では広く用いられているが、THz波帯では高い透過性と低い屈折率を示す。そこで本研究ではラベルフリー検出を行うためにTHz波を利用し、高感度化のために金属メッシュによる電場増強効果を使ったセンシング法を試みる。このセンシング法によって、特に牛乳などに含まれる食品アレルギーである α -カゼイン抗体の検出を目指し、メンブレンを抗原抗体反応の基材として利用した金属メッシュによる非標識検出について報告する。

2. 金属メッシュの基礎特性

本研究では、金属製メッシュをセンサ部材として利用している。このような金属メッシュは、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いる。赤外光領域において、これらの透過特性については古くから実験的な解析が行われ、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¹³⁾。本実験で用いた金属メッシュを図1に示す。金属メッシュのバンドパス特性は主に、メッシュの厚さ(t)、金属ストリップの幅($2a$)、グリット間隔(g)に依存する。使用した金属メッシュは材料がニッケルで、厚さ $t=18\mu\text{m}$ 、グリット間隔 $g=101.6\mu\text{m}$ 、開口幅 $70\mu\text{m}$ である。偏光依存性に関しては、入射波が直線偏光の場合、1次元のワイヤストリップグレーティング（ワイヤグリッド）ではグリッドに対して電場の振動方向が垂直の時は透過率が高く、逆にグリッドに対して平行の場合は透過率が低くなる。一方、正方形の開口を持つ金属メッシュはこれらのワイヤグリッドを重ね合わせたものであるため、偏光に依存しないと考えることができる。

図2に本研究で使用した金属メッシュの透過スペクトルを示す。透過率は、メッシュの金属部分と開口部分の面積比率（開口率47.5%）を上回っており、このような異常透過現象の詳細なメカニズムはまだまだ明らかになっていないが、光波帯の研究によると入射光と表面プラズモンとが共鳴的に結合するためだと考えられている¹⁴⁾。また、そのときの電界強度分布についても報告されているが、金属メッシュ開口のエッジ部分で電界の極性が互い違いとなって局部的に強くなっていることが示されている

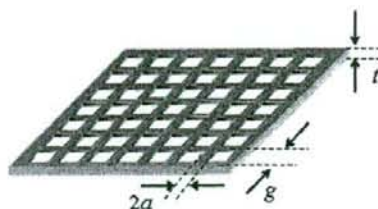


図1 金属メッシュ

Fig. 1 Schematic of a metallic mesh

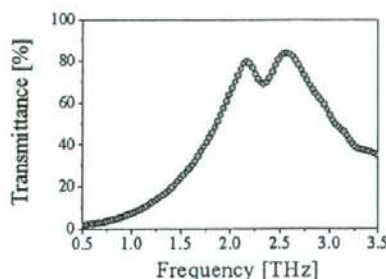


図2 金属メッシュの透過スペクトル

Fig. 2 Transmission spectrum of the metallic mesh

15) 本研究ではこの報告と同じ正方形の開口の金属メッシュを使用しており、同様の電場増強分布であると考えられる。また、図に見られるように、異常透過のピーク付近で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、古くから平行光束に対して金属メッシュを傾けた際に観測されることが知られており、今回透過測定に使用した分光器がサンプルに対して集光光束になっているため、その斜入射成分によって透過スペクトルに表れていると考えられる。金属メッシュ近傍の電場増強を利用してメンブレン上の抗原抗体反応を検出するためには、金属メッシュに対してメンブレンが十分に密着する必要がある。そこで本研究では、この金属メッシュをホルダに固定し、ホルダ側面から吸引ポンプを使用して減圧し、金属メッシュとメンブレンを密着させる方法を採用した。

分光測定には遠赤外領域に特化したフーリエ変換型赤外分光光度計（日本分光株式会社製：FARIS-1S）を用いた。本分光器の基本構成は中赤外光領域などで用いられる一般的なFT-IRと同じである。マイケルソン型の干渉計で干渉波が生成され、その強度（インターフェログラム）をフーリエ変換することでスペクトル強度に変換されるシングルビームタイプの分光器である。本研究で用いた分光器は、低波数側の光量が豊富な高圧水銀ランプを光源に用いている点と干渉計内部のビームスプリットにTHz波帯で透過率の高い、シリコンが使われている点に特徴がある。高圧水銀ランプはその高い発熱量から発せられる黒体輻射がTHz波帯で利用できる数少ない光源であり、シリコンは、遠赤外線用分光器のビームスプリットに用いられているマイラーよりも屈折率が高いことから干渉効率を強めることが可能で、フォノンの吸収が見られる 620 cm^{-1} 以下であれば、THz波帯分光器用のビームスプリットとして適している。検出器は焦電

素子型検出器を用い、室温で測定可能な周波数領域は、0.6~12 THzである。本装置は簡便な測定を実現するために試料設置部の光路長7 mmを大気に開放しており、それ以外の光路は全て100 Pa以下に真空引きされた金属筐体に収められている。尚、本実験は周波数分解能 4cm^{-1} 、積算回数100回にて透過測定を行った。

3. 実験方法

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^{-16} M)を形成する¹⁰。ビオチン標識ウシ血清アルブミン(BSA) (13 mol Biotin/mol BSA:コスモ・バイオ株式会社) 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 (Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane 0.2 μ m:Bio Rad) 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 (1 % Albumin bovine serum:SIGMA, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.5) の入ったビニルバック中で 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(Streptavidin 60 kDa: Bio-Rad) 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 となるように調整し加えた。反応後 TTBS 緩衝液 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.5) で 10 分間 \times 3 回、蒸留水で 10 分間 \times 3 回ビニルバック中で振とうして洗浄を行い、乾いたろ紙にはさみ 30 $^{\circ}$ C で 1 時間乾燥させた。

抗 α -カゼイン抗体(IgG Anti-Alpha Casein Dry Freeze Powder in 0.01 M Phosphate Buffer Saline pH 7.4:Abkern Iberia S.L.)を直径 16 mm のニトロセルロースメンブレン (Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane 0.2 μ m) 上に塗布し、25 $^{\circ}$ C で 2 時間乾燥させた後 1 % BSA(Albumin bovine serum, powder: SIGMA)水溶液 (1 % BSA 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) を含むブロッキング溶液中に α -カゼイン (α -Casein from bovine milk α -casein minimum 70 %:SIGMA)を加え、更に 25 $^{\circ}$ C で 2 時間振とうし、その後 TTBS 緩衝液 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.5) で 10 分間 \times 3 回、蒸留水で 10 分間 \times 3 回ビニルバック中で振とうして洗浄を行い、乾いたろ紙にはさみ 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。

4. 結果

図 3(a)に、金属メッシュセンサを利用した場合の、タンパク質を塗布したニトロセルロースメンブレンの透過スペクトルを示す。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、図中のストレプトアビジン量及びウサギ IgG 抗体量、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

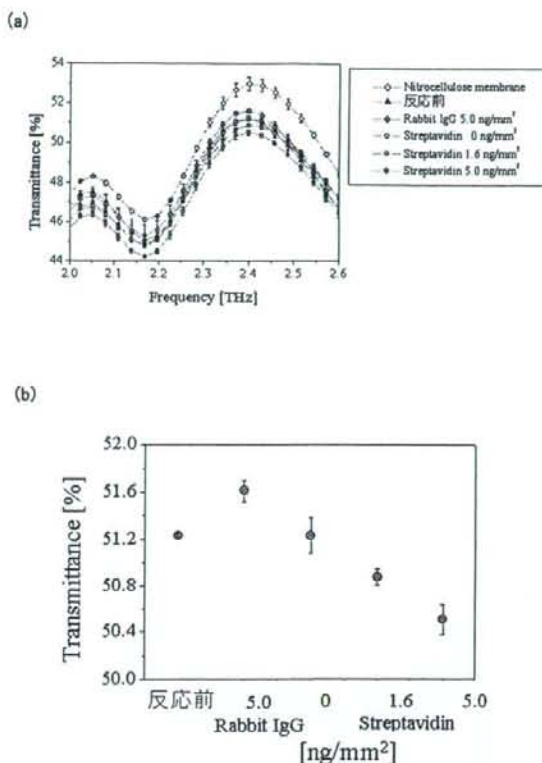


図 3 ストレプトアビジン-ビオチン反応による変化 (a)透過スペクトルの変化 (b)透過率の変化

Fig. 3 Change by streptavidin-biotin interaction (a) Change of the transmission spectra (b) Change of the transmittance

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 3(b)に、図 3(a)の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、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 5.0 ng/mm²およびストレプトアビジン 0 ng/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、5.0 ng/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ギーの検出に利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出が可能であることが示された。図 4 に、図 3(b)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、反応

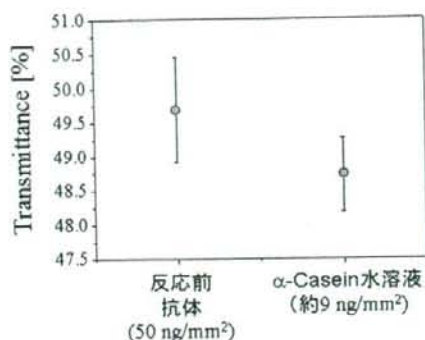


図4 抗原抗体反応による透過率変化

Fig. 4 Change of the transmittance by α -casein - anti α -casein antibody interaction

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り、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。streptavidin-biotin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量の検出の可能性が示された。

5. まとめ

本研究では金属メッシュとニトロセルロースメンブレンを組み合わせた新しいラベルフリーセンシング法について提案した。本研究のセンシング法は、THz波帯には生体高分子の高次構造に起因する吸収が存在し、ラベルフリー検出が可能であるという報告を元に、更にセンサとして金属メッシュとメンブレンを用いることで、メンブレン上のstreptavidin-biotin反応においては1.6~5.0 ng/mm²のstreptavidinの検出に成功し、抗原抗体反応においては約9 ng/mm²の α -カゼインの高感度検出の可能性も示された。このことはメンブレン上で行われるその他の様々な反応についても応用可能な汎用性の高さを示している。またメンブレンは赤外領域などでは不透明と見なされることから、本研究の透過測定によるセンシング法はTHz波帯の利用において初めて実現可能であるといえる。さらにTHz波は波長が3 mm~30 μ mであることから、波長相当の開口幅をもつ金属メッシュの作製が比較的容易であることから、金属メッシュの改良による更なる高感度化が望めるという利点がある。今後は、各反応における解離定数などの反応性の違いやメンブレンとの結合性について検討することで、高感度化をはかるとともに、実際に食品中のアレルゲンについて検出を行う予定である。

謝辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金医療技術推進研究事業及び平成20年度科学研究費補助金萌芽の先端医療技術推進研究事業の支援により遂行されました。

参考文献

- (1) 文部科学省 アレルギー疾患に関する調査研究委員会：アレルギー疾患に関する調査研究報告書 (2006)。
- (2) 海老澤元宏：最新食物アレルギー (2001)。
- (3) 厚生労働省：平成10・11年度厚生省食物アレルギー検討委員会調査結果
- (4) M. Nagle, P. Haring Bolivar, M. Brucherseifer, and H. Kruz: "Integrated THz technology for label-free genetic diagnostics", *Appl. Phys. Lett.* vol.80, pp.154-156(2002)。
- (5) S. P. Micken, A. Menikh, H. Lie, C. A. Mannella, R. MacColl, D. Abbot, A. Munch, and X-C Zhang: "Label-free bioaffinity detection using terahertz technology", *Phys. Med. Biol.* vol.47 pp.3789-3795 (2002)。
- (6) R. Ulrich: "Far-infrared properties of metallic mesh and its complementary structure", *Infrared Phys.* vol.7 pp.37-55(1967)。
- (7) K. Sakai, T. Fukui, Y. Tsunawaki, and H. Yoshigawa: "Metallic mesh bandpass filters and Fabry-Perot interferometer for the far infrared", *Jpn. J. Appl. Phys.* vol.8 pp.1046-1055 (1969)。
- (8) F. Miyamaru, T. Kondo, T. Nagashima, and M. Hangyo: "Large polarization change in two-dimensional metallic photonic crystals in subterahertz region", *Appl. Phys. Lett.* vol.82 pp.2568-2570 (2003)。
- (9) F. Miyamaru, and M. Hangyo: "Finite size effect of transmission property for metal hole arrays in subterahertz region", *Appl. Phys. Lett.* vol.84 pp.2742-2744 (2004)。
- (10) H. Cao and A. Nahata: "Resonantly enhanced transmission of terahertz radiation through a periodic array of subwavelength apertures", *Opt. Express* vol.12 pp.1004-1010 (2004)。
- (11) F. Miyamaru, S. Hayashi, C. Otani, K. Kawase, Y. Ogawa, H. Yoshida, and E. Kato: "Terahertz surface-wave resonant sensor with a metal hole array", *Opt. Lett.* vol.31 pp.1118-1120 (2006)。
- (12) H. Yoshida, Y. Ogawa, Y. Kawai, S. Hayashi, A. Hayashi, C. Otani, E. Kato, F. Miyamaru, and K. Kawase: "Terahertz sensing method for protein detection using a thin metallic mesh", *Appl. Phys. Lett.* vol.91 pp.253901-1-3 (2007)。
- (13) R. Ulrich, K. F. Renk and L. Genzel: "Tunable submillimeter interferometers of the Fabry-Perot type", *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.* vol.11 pp.363-371 (1963)。
- (14) T. W. Ebbesen, H. J. Lezec, H. F. Ghaemi, T. Thio and P. A. Wolff, "Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole array", *Nature*, vol. 391, pp 667-669(1998)
- (15) 加藤英志, 吉田永, 林伸一郎, 小川雄一, 水津光司, 川瀬見道, "金属メッシュを利用したテラヘルツ帯センシングの基礎検討", *電気学会論文誌 C*, vol. 127, pp2088-2092(2007)
- (16) J. Wong, A. Chilkoti, and V. T. Moy: "Direct force measurements of the streptavidin-biotin interaction", *Biomole. Eng.* vol.16 pp.45-55 (1999)。

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

非会員 吉田永 (東北大学)・非会員 小川雄一 (東北大学)・非会員 林伸一郎 (理化学研究所, 東北大学)
非会員 大谷知行 (理化学研究所)・非会員 川瀬晃道 (名古屋大学, 理化学研究所, 東北大学)

Label-free detection of allergen in milk using a metallic mesh sensor

Non Member Hisa YOSHIDA (Tohoku University), Non Member Yuichi OGAWA (Tohoku University),
Non Member Shin'ichiro HAYASHI (RIKEN, Tohoku University),
Non Member Chiko OTANI (RIKEN) and Non Member Kodo KAWASE (Nagoya University, RIKEN, Tohoku University)

ABSTRACT

We propose a new label-free allergen sensing technique using a metallic mesh and nitrocellulose membrane which is generally used for fixation of protein. Our sensing method relies on a change in the transmittance of terahertz (THz) radiation passed through the metallic mesh on which a sample substance is contacted. Label-free detection using THz radiation is a new technique in biomedicine, which enable us to take easier and faster food allergen inspections.

By using this technique, we demonstrated detecting interaction between a streptavidin - biotin, and α -casein - anti α -casein antibody on each membrane. The streptavidin - biotin interaction can be detected by 1.6 ~ 5.0 ng/mm² streptavidin. The possibility of detection that the α -casein - anti α -casein antibody interaction is shown in case of 9.0 ng/mm² α -casein. These results indicate that our sensing system has enough sensitivity to detect allergen in food.

KEYWORDS : label-free, metallic mesh, membrane, terahertz wave, allergy test

1. 緒言

子供の食物アレルギーは年々増加の傾向にあり、小学生以上の有病者数は約 32 万人にのぼり、全児童数の 1 ~ 3 % と報告されている¹⁾。このような食物アレルギー反応の中で、免疫グロブリン E (IgE) 抗体が介在して起こる反応がよく知られている。この抗体は、皮膚や腸粘膜、気管支粘膜、鼻粘膜、結膜等でマスト細胞と呼ばれる細胞と結合した状態で食物抗原 (アレルギー) と出会うことにより化学伝達物質の放出を誘導し、アレルギー反応となって現れる。この過程は、アレルギーを含む食物の摂取から約 2 時間以内に発症するのがほとんどである²⁾。食物アレルギーを引き起こす物質は、乳幼児期は鶏卵が 40% 程度と多く、次いで牛乳など乳製品が 30% 程度を占めている³⁾。このような状況において、学校給食では除去食の対応が最も多く、使用食材の情報開示等も進められている。一方で、調理員の不足や施設の不備、またアレルギーの種類が多いことなどから対応が十分に行えない学校もある⁴⁾。現在食品中のアレルギーの検出原理には 2 つあり、一つはアレルギー食品をそれぞれに対応する抗体で検知する方法、もう一つはアレルギー食品由来の DNA を検知する方法がある。抗体を検知する方法では、標識抗体を利用した ELISA 法やウエスタンブロッティング法が広く用いられている。食品中のアレルギー検査は、検査に時間と熟練を要するという点や、発色に際し有害な廃液が生じるなどの理由から、検査

の必要性は高いものの身近な検査として定着するには至っておらず、現在は大規模な食品製造現場などに限られている。そこで筆者らは、これらの問題を解決するために、食品アレルギーの簡便かつ迅速なラベルフリー検出法を目指して研究を行っている。ラベルフリー検出法には、標識・発色過程が省略でき検査自体が簡便になるという利点がある。さらに検出に標識を用いないことから、検査対象ごとに標識を変える必要がなく、一度に複数のアレルギーを検出できる可能性があるが、一般に食品中のアレルギーの検査には、数 ng ~ 数 μ g の精度が必要とされており、高感度な検査手法が必要となる。分子間相互作用を解析する方法として、水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法と表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象を利用した方法がある。QCM, SPR は共にラベルフリーで生体高分子間の結合状態をモニタリングすることが大きな特徴で、分子間の結合 (解離) 定数を時間変化に応じて算出するものである。これらは創薬における候補となる物質のスクリーニングや評価指標として利用されている優れたツールであるが集積化が難しく、また本研究が目指すアレルギー検査のようにアレルギーとなるタンパク質の有無を簡便に検出する技術とは性格が異なり、食品製造現場でのアレルギー検査には新たなラベルフリー検出技術が求められている。

近年、周波数 0.1~10 THz の遠赤外領域のテラヘルツ (THz)