

2008/2009B

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18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 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18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 小川 雄一

平成21(2009)年 3月

—目 次—

I. 総合研究報告 バイオチップセンサー技術の研究 小川 雄一	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	21
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	25

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
研究代表者 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する。特に、テラヘルツ波と呼ばれる未開拓電磁波の特徴を利用した、抗原抗体反応などの生体反応を非標識でセンシングする手法の確立と、その技術をシステム化する際のキーデバイスとなる専用小型波長可変テラヘルツ波光源を開発し、ラベルフリーかつ安価で迅速な診断および分析を可能とする技術を確立する。

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。また、予防医療の重要性が注目される中、血中の自己抗体量によりいくつかの疾病に関しては発症リスクを予測できる研究データが報告され、検査キットが一部市販されているものもあるが、病院での検査に利用されるに留まっており、予測効果が十分に生かしていない状況にある。このような停滞を打破するための方策として、発症リスクを健康診断で検査することが効果的であると考えられるが、検査キットが高価であることや、複数の疾病を網羅的に検査できる技術が確立されていないなどの問題が潜んでいる。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した。

本研究では、3年の研究期間に、各要素技術の研究ならびにシステム化に必要な知見の収集や技術の開発を行ってきた。特に本研究で確立させるセンサ部には、金属製の周期構造体の透過特性を利用した。金属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、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うために、詳細な動作原理を明らかにし、高感度化のための知見を得るための研究を行った。さらに我々は、ウェスタンブロット法などで利用されているメンブレンフィルターに着目した。テラヘルツ帯のような波長の長い電磁波において、セラミックスやプラスチックなどの高分子は高い透過性を示す。メンブレンは高分子であると共に、多孔質であり、テラヘルツ電磁波帯では吸収と屈折率が共に低い材料といえる。したがって、このような基材の上での生体高分子の反応は、テラヘルツ波にとって検出し易いと考えた。

本研究ではさらに、これらの技術を融合させた印刷技術によるメンブレン上のメッシュ作成も検討を行った。こういった技術の知見は、将来センサチップを安価に作成する技術に繋がるのが期待でき、検査システム全体の低価格化にも寄与できることが期待できる。

また、本研究で目標とする検査システムの実現には小型で高性能なテラヘルツ波光源の技術が不可欠である。特に金属メッシュセンサやメンブレンの特性や計測手法にも配慮した専用の光源開発が必要である。そこで小型で波長可変のテラヘルツ波光源が実現できるパラメトリック発振を発生原理とする光源の開発を行った。さらに、非標識検査を効率化するための画像による検査技術の検討も行い、テラヘルツ波を用いた非標識計測技術の有効性について検討を行った。

B. 研究方法

本研究は、大別すると①テラヘルツ帯電磁波の非標識検査技術への基礎研究、②金属メッシュによるセンサ技術の確立、③テラヘルツ波光源技術の開発、④画像化技術の開発の4つに分けられる。そこで本総合研究報告書では、4つの研究について各々研究方法ならびに成果について取りまとめる。

1. テラヘルツ帯電磁波の非標識検査技術への基礎研究

1.1 抗体およびメンブレンの透過特性

テラヘルツ帯においてタンパク質などの生体高分子やメンブレンがどのように観測されるかについて基礎データの収集を行った。特に、テラヘルツ帯では研究の歴史が浅いことから、赤外光などと比べて分光スペクトルの測定例が少ない。そのため、今回対象とするタンパク質やメンブレンなどがどのような物性を持つかを予め調査することが必要となる。しかし、これまでの予備実験や先行研究の報告事例からも、タンパク質の種類に固有の吸収スペクトルは観測されておらず、ブロードな吸収特性を持つことが予想される。そこで本実験では、代表的な抗体サンプルとして、IgG抗体を選び、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

抗体は、抗マウス IgG ヤギ IgG 抗体(Lot#192)を ROCKLAND 社より購入し、従来のテラヘルツ帯の固体物質の分光測定法に倣い、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、市販の抗体中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前処理を施した。

一方、本研究では、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反応基板に検討している。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。そこで、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 種比較検討することとした。

本実験では、フーリエ変換型赤外分光光度計 (FT-IR) に改造を加え、テラヘルツ帯 ($20\sim 400\text{cm}^{-1}$) までを測定できる THz 用 FTIR (図 1) にて分光測定を行った。

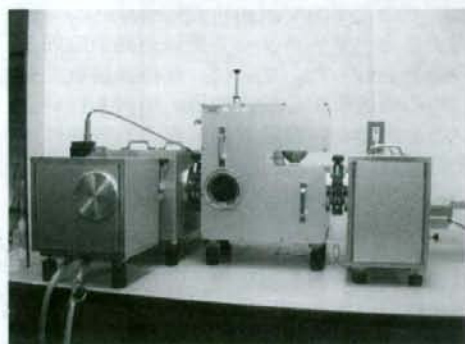


図 1. THz 用 FTIR

1.2 夾雑物下での非標識検出モデル実験

実際の臨床検査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、メンブレンには先の実験結果を踏まえて PVDF メンブレンを採用し、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。

反応処理は以下のとおりである。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のが目的であるため、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、THz 用 FTIR にて吸収スペクトルを測定した。

2. 金属メッシュによるセンサ技術の確立

2.1 直接塗布による非標識検出

まず、さまざまなサイズの金属メッシュの透過特性を THz 用 FTIR にて測定した。用いた金属メッシュの仕様を表 1 に示す。

次に、金属メッシュに生体高分子を以下に述べる 2 種類の方式で定量的に塗布し、透過特性を測定することによりセンシングの検証を行った。

一つ目は、エレクトロスプレーデポジション (ElectroSpray Deposition: ESD) 法を用いた。図 2 に ESD 法によるタンパク質溶液の塗布の模式図を示す。タンパク質溶液は内径 $30\sim 40\ \mu\text{m}$ のガラス製のキャピラリーに収められ、そこに高圧電源に接続された電極が浸されている。対向するグラウンド面(金属メッシュ)と電極間に数千ボルトの電圧を印加すると、キャピラリー先端では電界が集中し、ある電圧に達すると表

表1 金属メッシュの機構パラメータ

Mesh No.	Line / inch	g	2a	t
#1	500	50.8	17.8	6
#2	400	63.5	18.5	6
#3	333	76.2	18.2	6
#4	250	102	21.6	6
#5	150	169	34.0	22
#6	100	254	54.0	39

面張力との均衡が崩れ、サンプル溶液が飛び出し始める。飛び出した直後の液滴は強く帯電しているため、静電気力の反発により液滴が分裂し、粒径がナノサイズのパーティクルとなり、溶媒は瞬時に蒸発する。そしてナノサイズのパーティクルは静電気力によってグランド面に引き寄せられ堆積する。

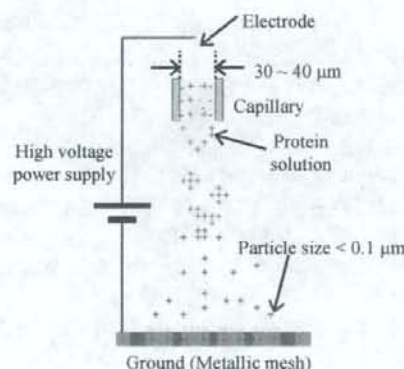


図2 ESD法の概念図

本実験では、アビジン(ナカライテスク 純度97%凍結乾燥粉末)を用い、滅菌蒸留水を溶媒とする溶液をサンプルとして使用した。このとき、金属メッシュ($g: 76.3 \mu\text{m}$, $2a: 58 \mu\text{m}$, $t: 6 \mu\text{m}$)上への塗布量は、アビジン溶液の濃度とキャピラリーからの吐出量から見積もることとし、 $200\text{ng}/\text{mm}^2$ と $1200\text{ng}/\text{mm}^2$ 相当量を金属メッシュ上に塗布した。

次に、2つ目の塗布方法として、プリンタを用いた方式を検討し、金属メッシュの感度評価実験を行った。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。したがって将来、この方式のプリンタをサンプル塗布方法として採用する際に、熱による酵素活性の失活が懸念される。そこでまず、滅菌蒸留水にてペルオキシダーゼ(ナカライテスク 免疫化学用 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。ペル

オキシダーゼは疎水中の溶媒中では125~150℃で熱失活し、またリン酸緩衝液中では70~95℃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、ニトロセルロースメンブレン(BIO-RAD社製 Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane (0.2 μm))を用い、プリンタ(Canon PIXUS860i)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社製 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。その結果、発色が確認され、心配された失活の影響は少ないと判断できる結果を得た。

そこで、本手法を使って0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, 2.0 mg/ml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($g: 76.3 \mu\text{m}$, $2a: 58 \mu\text{m}$, $t: 6 \mu\text{m}$)に印刷し、THz用FTIR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。

2.2 メンブレンを介した非標識検出

メンブレンは生体高分子を疎水結合や静電的な力により結合させる特性を有していることや、テラヘルツ帯において低い屈折率と吸収特性を示すことから、本研究で目指すセンサチップの基材として有力な候補である。そこで本実験では、メンブレン上での微量な抗原抗体反応を金属メッシュの高感度化で検出する方式の検討を行った。はじめに、金属メッシュ使用による感度向上を見積もるために、後進波管(BWO)をテラヘルツ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、先の実験で示すとおり、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の波長可変域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、プロ

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 μ 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 μ 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 μ 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 3 ml 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 3 ml 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、オブティカルチョッパーで 200Hz にチョッピングした。複数の軸は必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ポロメータを使用した。シリコンポ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。

次に、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、THz 用 FTIR にて透過測定を行った。

2.3 印刷技術によるセンサ機能付与の検討

本実験では、印刷技術でテラヘルツ波のバンドパス特性を付与するために、さまざまな方法で検討を行った。

まず、家庭用プリンタとして市販されているアルプス社のインクリボンに着目した。このインクリボンは熱転写型で、金属層を持ったリボンが市販されている。また、金属メッシュの透過特性は幾何学的形状や寸法のほかに、材質である金属の電気伝導度にも依存する。そのため、印刷によってメッシュを作製する場合、使用するインクリボンがテラヘルツ (THz) 波帯での電磁周波数に対して金属的な応答を示さなければならない。そこで、THz-TDS (THz-Time Domain Spectroscopy: テラヘルツ時間領域分光) 装置で作成したメッシュの透過特性の評価を行った。実験に使用した THz-TDS 装置は、先端赤外社製の赤外パルス分光計測装置 pulse IRS-2300rkopt で、測定はサンプルに対して平行光で行い、測定範囲は半径 5mm の円形、水蒸気の影響を避けるために装置内を真空にして測定した。本実験のために試作したメッシュサンプルを表 2 に示す。

表2 試作したメッシュサンプル

材質：アルミニウム

試料No.	グリッド間隔(g)	ライン幅(L)	厚み(t)
①	100 μm	20 μm	20 nm
②	140 μm	40 μm	20 nm
③	200 μm	80 μm	20 nm

基板に印刷されたインクリボンは、図3に示すとおり、金属層の両面に剥離層と接着層が存在する。

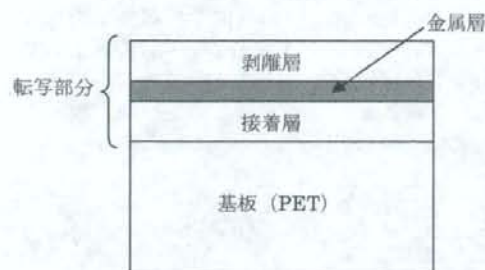


図3 PETに印刷されたインクリボンの断面図

また、本メッシュセンサの原理解析を通じて、金属層の近傍での屈折率変化に最も感度が高いことも確認済みである。そこで剥離層にピオチンを混ぜ込んだ特殊インクリボンを試作し、アビジンとの結合反応実験による評価を行った。作成したサンプルは、PETを基板とし、その上に接着層を介して剥離層を持つサンプル(B,C)と、接着層の上に金属層(Cu: 20 nm)でメッシュを構成し、その上面に剥離層を持つサンプル(E,F)の4パターンである。サンプルBおよびEには剥離層にピオチン $5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ を付加し、サンプルCとFにはピオチン化BSAを $5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ 付加した。試作したメッシュサンプル(E,F)は金属部の線幅(L)を $120 \mu\text{m}$ 、グリッド間隔(g)を $360 \mu\text{m}$ とし、THz用FTIRにて分光測定を行った。

さらに、サンプル(B,C)においてはアルカリフオスファターゼによる発色実験を行い、インクリボンに付加したピオチンの活性を確認することとした。

次に、インクジェット方式のプリンタによるメッシュ作成を検討した。ピエゾ素子を用いた市販のインクジェット式プリンタ(コニカミノルタIJ社製EB100+XY100)により、ナノサイズの銀インクが基板に塗布され、130度30分程度の焼成過程を行うと、溶剤等が除去され、金属光沢を有する膜を作ることが可能である。そこで本実験ではまず、光沢紙に本プリンタを用いて一様に銀色で塗りつぶした部分が実際にテラヘルツ波を伝播しないかどうかを確認した。次に、同じく光沢紙に様々なサイズのメッシュ構造を印刷で作成し、THz用FTIRにて透過特性を測定した。

さらに基板をメンブレンに変更し、均一に印刷し

た部位を分光器で測定したところ、高い透過性を示した。このことは、金属面としての特性を有していないことを示しており、テスターで導電性を確認することができなかった。このことを確認するため、走査型電子顕微鏡による表面観察を行った。

3. テラヘルツ波光源技術の開発

本研究で利用する金属メッシュは、急峻なディップを使った高感度な計測手法であることから、使用するテラヘルツ波光源には線幅の狭く、波長可変性を有するものが適している。現在、周波数1 THz程度以下の領域では、比較的小型で発振スペクトル線幅の狭い波長可変連続波光源である後進波管(Backward Wave Oscillator)が利用できるが、寿命が数百時間程度と短く、BWOの出力が急減する1 THz以上の高周波領域における光源開発は遅れている。このため、本研究の目標である非標識検査システムの開発には、小型で室温動作可能かつ簡便なテラヘルツ波光源が必要である。そこで、本研究では非線形光学効果(ニオブ酸リチウム(LiNbO₃)結晶中の誘導ポラリトン散乱現象)を用いたレーザー光のパラメトリック波長変換による光源開発に取り組んだ。本光源は励起光源と非線形光学結晶のみ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、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選択するためにはパルス幅の長い励起光が必要であるため、励起光源のサイズが大きくなってしまふ。共振器を用いないテラヘルツ波パラメトリック発生の場合、パルス幅の制約なく小型な短パルス励起光源を用いることができる。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窄化を目指す場合には発振線幅の狭いシングルモード発振の励起光源を用いなければならないこととなる。そこで本研究では、2種類の異なる性質を持つテラヘルツ波を発生するための小型光源を開発した。

テラヘルツ波パラメトリック発生のための実験装置の概略図を図4に示す。実験装置は、励起光源、波長板、非線形光学結晶、注入光源、検出器から構成される。発生したテラヘルツ波を検出するための光学系を除くと、テラヘルツ波パラメトリック発生に必要な部分は、励起光源に小型のQスイッチ動作Nd:YAGレーザー(波長: 1064 nm, 最大エネルギー: $750 \mu\text{J}/\text{pulse}$, パルス幅: 420 ns, 繰返し: 100 Hz), 注入光源に小型の半導体レーザー(波長: 1070-1080 nm, 最高出力: 30 mW)を使用したことで、 $15 \times 24 \text{ cm}^2$ 程度と非常に小型である。励起光は、トップハ

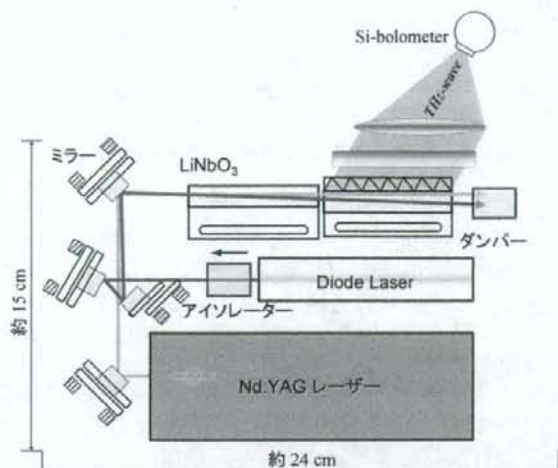


図4 実験装置外略図

ット型の強度分布を持ち、結晶入り口で $\phi 1.3$ mm (半値全幅) である。両端面に励起光波長 (1064 nm) に対する無反射膜を施した 2 本の MgO:LiNbO₃ 結晶 (各 $4 \times 5 \times 65$ mm) を間隔 $100 \mu\text{m}$ 以下になるように縦列配置し、励起光および注入光を、位相整合条件を満たす方向に入射した。テラヘルツ波は結晶中を、励起光および注入光 (アイドラー光) と、ノンコリニア位相整合条件を満たす方向に発生しながら通過する。このとき、MgO:LiNbO₃ 結晶はテラヘルツ波帯に大きな吸収係数を持つため、効率よく取り出すためには、励起光を結晶の取り出し面近くを励起しなければならぬ。しかし、トップハット型の強度分布はビーム広がり小さく端面近傍を高強度励起できるため、従来のガウス型強度分布に対して有利と考えられる。そこで本実験では、トップハット型ビームを用いたテラヘルツ波発生の実験を行った。なお、発生したテラヘルツ波は、2 目目の結晶の y 面に圧着した Si 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、Si ボロメーターもしくはショットキーバリアダイオードによって検出される。

次に、種光源を注入するタイプの光源実験を行った。実験装置は、先の構成に加えて注入光源を必要とする。図 5 に、実験装置の概略図を示す。励起光源には、マイクロチップ Nd:YAG レーザーを利用した。図 6 にその構成を示す。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共振する。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 ($105 \times 30 \times 32$ 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、 $M^2 = 1.05$ 、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。テラヘルツ波およびアイドラー光検出系は先の実験と同様である。

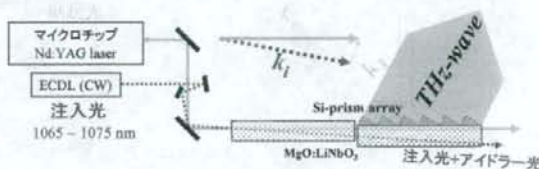


図5 光注入型実験装置

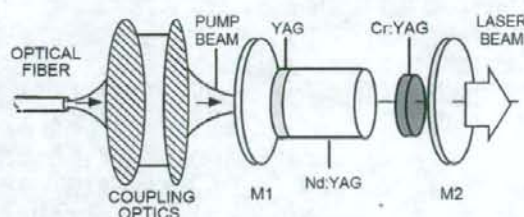


図6 マイクロチップ Nd:YAG レーザー

4. 画像化技術の開発

4.1 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によって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り、その対応の検討が必要となった。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かと期待される。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。

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、本手法の原理確認には、THz-TDSの実験系による実験を行うこととした。図7に本実験で使用したシステムの概略図を示す。

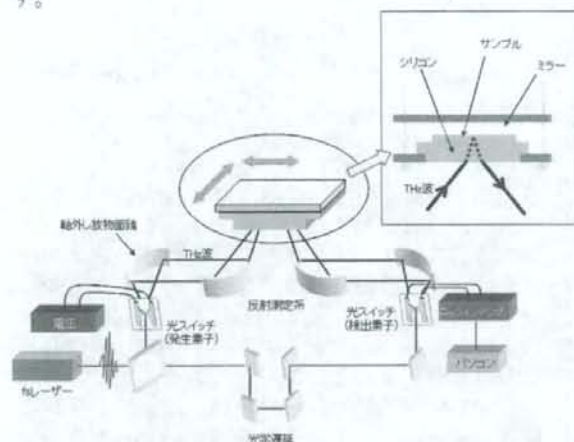


図7 テラヘルツ干渉イメージングシステムの模式図

測定試料はXYステージ上に配置され、順次ステージを動かして各ポイントで分光測定を行いながらイメージングを行う。本測定系では、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 $10k\Omega \cdot cm$ 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ため空気から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。

原理確認を行う本実験では、サンプルに厚さ $400\mu m$ と $500\mu m$ のポリエチレン板を用いた。これらのサンプルとSiとの界面での反射およびポリエチレンを透過し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。

4.2 小分子とタンパク質の非標識画像化検出実験

4.1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 $0.2 \mu l$ ずつで、メンブレン上では約3mm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. テラヘルツ帯電磁波の非標識検査技術への基礎研究

1.1 抗体およびメンブレンの透過特性

THz 用 FTIR 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 8 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} ($=3\text{THz}$) 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。

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

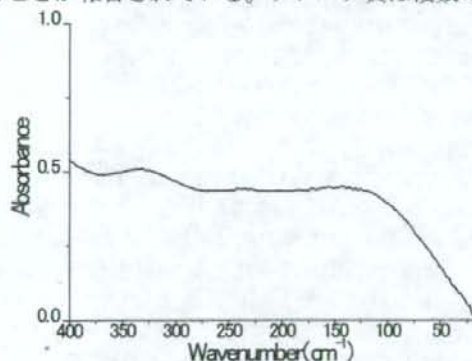


図 8 抗体ペレットの吸収スペクトル

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

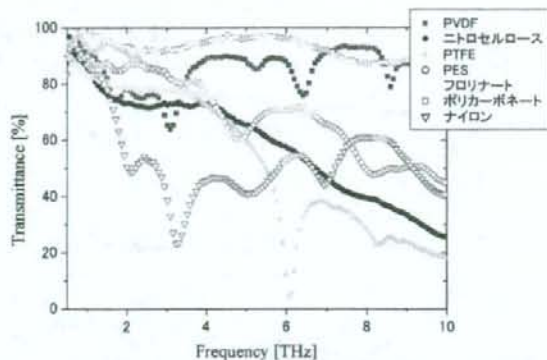


図 9 各種メンブレンフィルターのテラヘルツ帯の透過スペクトル

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、基材として検討を進めている各種メンブレンの透過スペクトルを図 9 に示す。さまざまな材質でテラヘルツ波帯に特徴的な吸収を示すことや、タンパク質が 3THz 以上の周波数帯で吸収変化が少なことから、利用できるテラヘルツ波光源に合わせて基材を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用を考える上では注目すべき点である。さらに、DNA のような液体サンプルを基板上に滴下し、乾燥させて分光測定を行う際、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、その問題を解決することもメンブレンを利用してテラヘルツ波による透過測定を行う際のメリットの一つと考えられた。

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 10 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 265cm^{-1} の吸光度で各サンプルの比較を行った結果を図 11 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

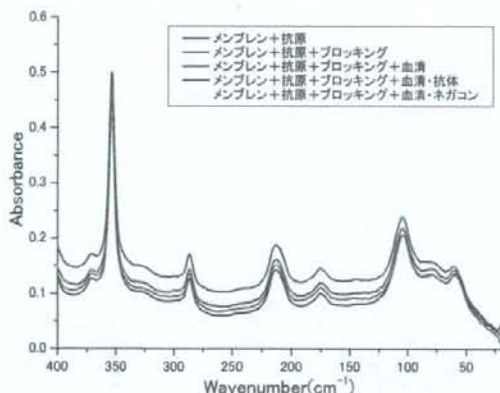


図 10 血清モデルサンプルを用いて調製したメンブレンサンプルの吸光度スペクトル

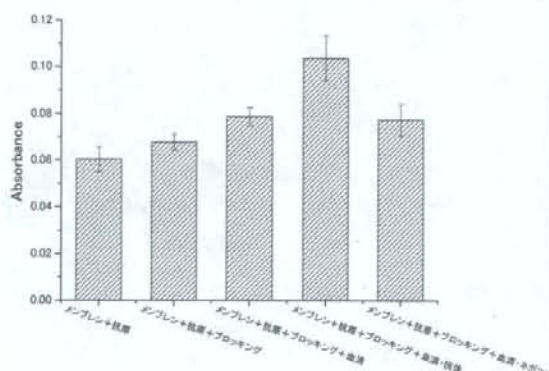


図 11 265cm⁻¹での吸光度および標準偏差

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	0.00967
メンブレン+抗原+ブロッキング+血清+ネガコン	0.07726	0.00678

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、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。

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。テラヘルツ波で測定する場合、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がたい。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、目的と分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。

2. 金属メッシュによるセンサ技術の確立

2.1 直接塗布による非標識検出

金属メッシュの機構的パラメータと透過特性の関係を確認するため、格子定数 g が 50.8 μm から 254 μm まで 6 種類の金属メッシュを、エレクトロフォーミング法により作成し、THz 用 FTIR にて透過スペクトルを測定した。図 12 に測定結果を示す。いずれの金属メッシュも開口率が約 60% であるが、透過率が 0.8 を上回っており異常透過現象が現れている。ピーク周波数は格子定数 g が小さくなるにつれて高周波側にシフトしていくことがわかる。つまり、ピークの周波数は金属メッシュの格子定数で決まることとなる。また、カットオフ周波数は開口サイズで決まることから、おおよその周波数特性が g, a, t のパラメータで決定されることが確認できた。しかし、ピーク周波数付近で透過率が急激に減少するディップがみられる。このディップは、測定に使用した FTIR のビームが集光光束で金属メッシュに入射させたことに起因していると考えられる。

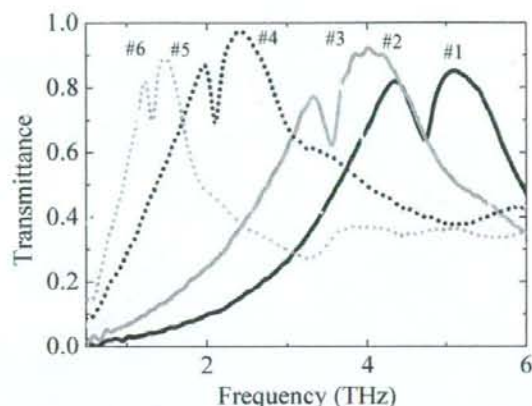


図12 さまざまな機構サイズの金属メッシュの透過特性

回折が現れる周波数域では、透過率が金属に対する開口の面積比よりも共鳴的に高くなる現象が現れることが知られており、金属メッシュ表面において金属材料とその界面の誘電率および2次元周期構造により決まる表面プラズモンポラリトン(SPP)ライクなモードによる表面波との結合と再放射に起因すると考えられている。そのような中に観測されるディップは、SPPやRayleigh anomalyのモードでは説明ができないモードである。

これらは、名古屋大学との共同研究により、回折エバネッセント波のモデルで説明できることが明らかとなった。つまり、金属メッシュ表面における回折エバネッセント波の金属表面上での干渉を考慮することで、透過スペクトルにディップが現われる。電磁界シミュレーションの結果、テラヘルツ波を斜入射することで金属メッシュ表面において回折エバネッセント波同士の干渉が完全位相不整合の状態から緩和されることで金属表面に共鳴的な固有モードが存在することが可能となり、そのモードが非共鳴の伝播モードとカップリングすることで透過スペクトルにディップが生じることが分かった。

以上の特性を有する金属メッシュに対し、ESD法でアビジンを塗布した金属メッシュをTHz用FTIRで測定した結果を図13に示す。

上段(a)は、ポリエチレンに白金をスパッタした基板に200 ng/mm²のアビジンを塗布したサンプルと、アビジンを塗布していないサンプルの透過特性を比較したものである。白金のスパッタにバラつきがみられ、アビジンの有無による明瞭な違いを確認することは出来ない。一方、下段(b)は、薄型金属メッシュにアビジンを塗布したサンプルの透過特性を示している。アビジンを塗布していない場合と比べ、量に応じて段階的に低周波側にシフトしている様子が確認できる。また、挿入図は急峻なディップ部を拡大したもので、ディップの谷となる周波数はアビジンの無い場合の2.82THzから順に2.81THz、2.64THz

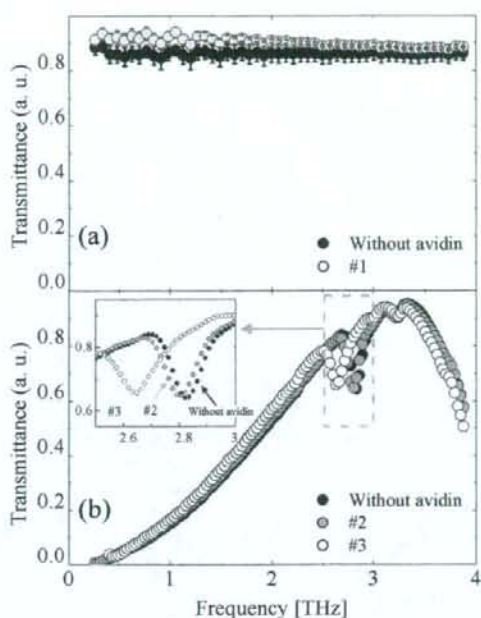


図13 アビジン付着による透過特性の変化

とシフトしている。このことは、金属メッシュ開口近傍の局所的に電界の強い部分にアビジンを固定することにより、アビジンの屈折率が濃度に応じてその電界に影響を及ぼし、周波数特性の変化としてテラヘルツ帯で検出されていることを示している結果であると考えられる。

さらに、バブルジェット方式のプリンタによってペルオキシターゼを定量的に塗布した金属メッシュの透過スペクトルを図14に示す。また、図中左上枠内の図はペルオキシタ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2.0 mg/mlにおいては、高周波側にシフトする傾向が確認された。

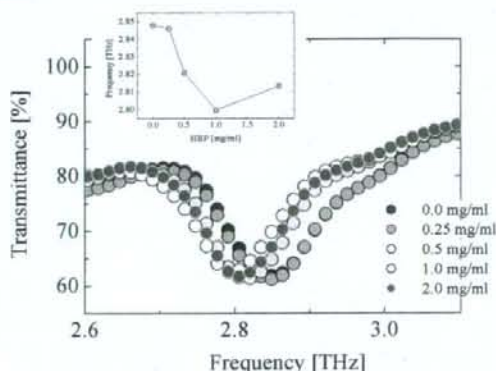


図14 ペルオキシターゼ付着による透過特性の変化

今回、0.5mg/ml においてディップ部の低波数側へのシフトが観測され、本手法で検出できていることが明らかとなった。この量は、プリンタに投入したサンプルの調整濃度から見積もると、 $500\text{pg}/\text{mm}^2$ のペルオキシターゼに相当する。この量は、臨床検査などで必要とされる ng から pg オーダーと同程度であり、本手法が現段階において既に実用レベルの感度を有していることが明らかとなった。しかし、実際の検査には夾雑物が含まれるため、反応の選択性などを十分に検討する必要がある、今後金属メッシュのさらなる高感度化や再現性に改良を加えながら検討するべきである。

2.2 メンブレンを介した非標識検出

BWO 実験系による単純透過測定の結果を図 15 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て測定した結果を図 16 に示す。メッシュ上にメンブレンがのったことで、ピーク的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。

任意の測定部位で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ノイズを避けて 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て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 17 に示す。金属メッシュと組み合わせて測定することで、透過測定では観られなかった吸光度の差をみる事ができた。

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て測定すると、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。

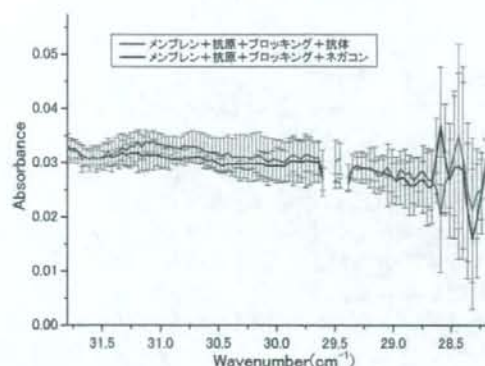


図 15 メンブレンサンプルの BWO 測定範囲での吸光度スペクトル

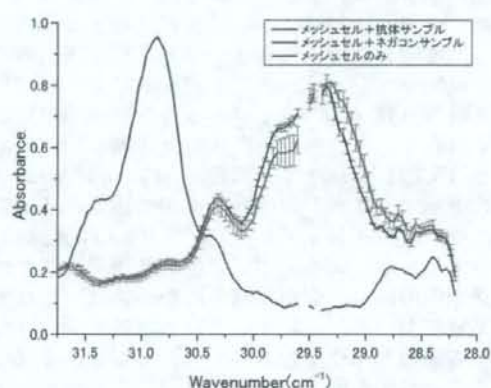


図 16 メンブレンサンプルをメッシュセルと組み合わせて測定した吸光度スペクトル

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

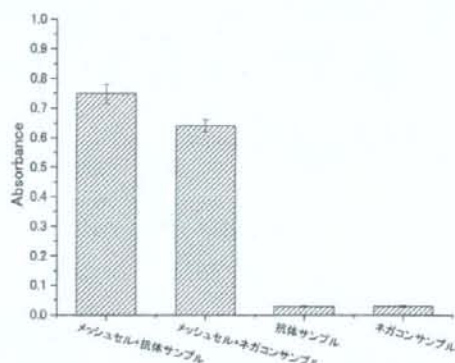


図 17 29.2cm^{-1} における吸光度および標準偏差

次に、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 -カゼイン抗体の非標識検出を試みた結果について述べる。本実験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18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って吸収され、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18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 5.0 ng/mm^2 およびストレプトアビジン 0 ng/mm^2 では透過率低下は見られないが、ストレプトアビジン $1.6, 5.0 \text{ ng/mm}^2$ 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、食品アレルギー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出が可能であることが示された。

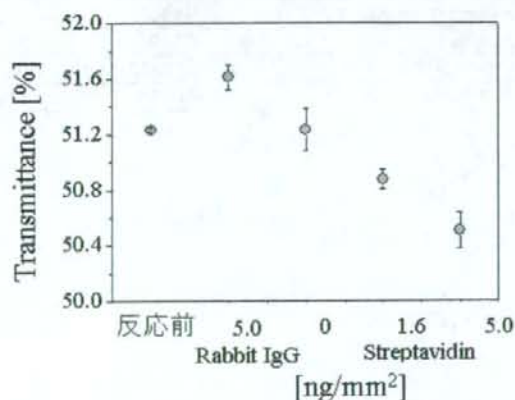


図18 ストレプトアビジン-ビオチンの選択的な結合による透過率変化

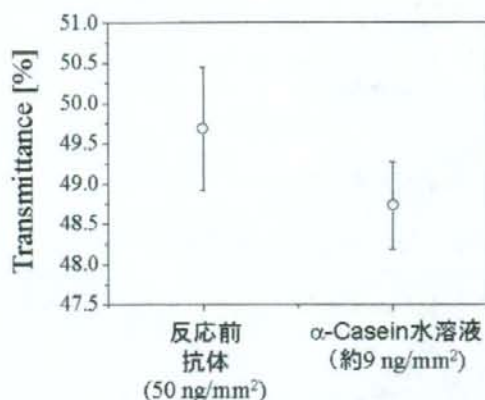


図11. α -カゼイン抗体の検出実験結果

図19に、図18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/mm^2 、反応した α -カゼイン量は抗体量から見積もって約 9 ng/mm^2 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測された。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 オーダーのタンパク質量の検出の可能性が示された。

2.3 印刷技術によるセンサ機能付与の検討

図20に試作したメッシュサンプルの透過特性を示す。図中の実線は Ulrich が金属メッシュフィルターのバンドパス特性を等価回路で説明しようとした計算式を元に算出した計算値である。この計算値は金属製のメッシュと非常にマッチすることは事前に確認済みである。試料②、③では透過率は低いものの、バンドパス特性が確認できた。また、計算値よりも透過率が低く、ピークの周波数が低周波側に観測される結果となった。このことは、金属部分の上下面が剥離層や接着層で満たされていることや、局在した電界の中に、基板の PET フィルムが存在するため、これらの複素屈折率の影響を受けていることが考えられる。試料①でバンドパス特性が確認できず、透過特性が高く見える理由としては、グリッド間隔が狭く、線幅が他のものより厳しい条件での印刷であることから、周期構造で十分に導電性を持たせることができなかったためと考えられた。

金属部分の材料をアルミ以外にも銅で試作し、印刷精度などを比較したところ、アルミの方が細かい印刷が可能で、金属部の厚みに関しては、銅の方が厚くできることが分かった。図21に、剥離層にビオチンなどを付加した特殊インクリボンにより作成した印刷メッシュの透過特性を示す。

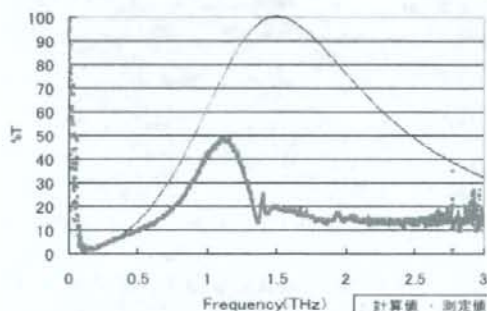
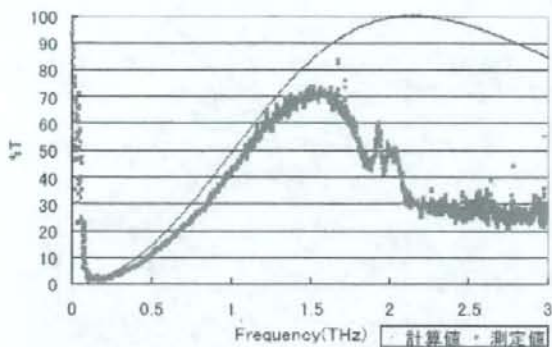
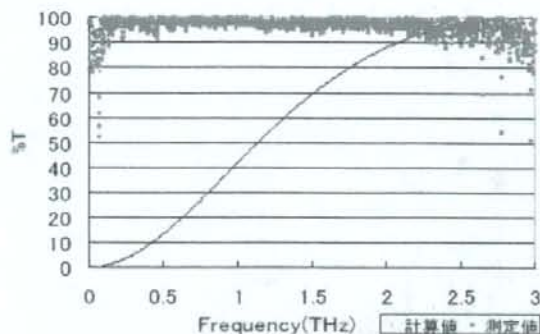


図20 印刷メッシュの透過特性と計算値
(上段より試料 No.①, ②, ③)

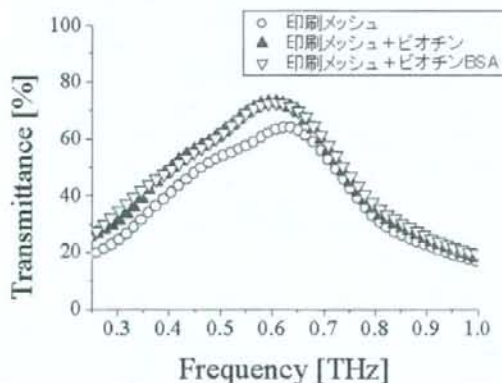


図21 ビオチン付加インクによる印刷メッシュの透過特性

0.6 THz 付近に異常透過のような特性を観察することができたが、ビオチンなどを付加していない印刷メッシュの方が透過率が低くなる傾向が見られた。ビオチンおよびビオチン化BSAが付加された印刷メッシュの方が低周波側にシフトしているように見えるが、BSAの存在有無に関わらず同程度しかシフトしていないことから、正しく機能していないことが予想された。さらに発色によりビオチンの活性を確認した結果を図22に示す。

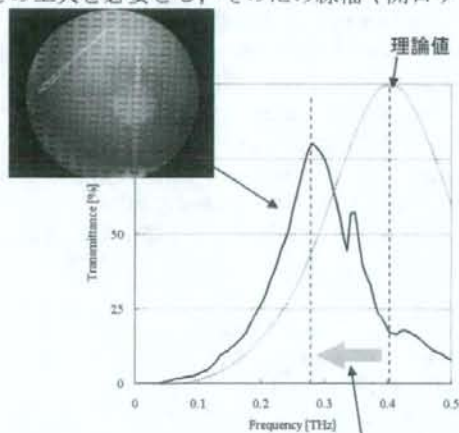
もし、ビオチンが活性を保ったまま表面に存在すると、発色試験により紫色に呈するが、今回の実験では観測できなかった。さらにSEMによる顕微鏡観察で剥離層の有無を確認したところ、剥離層の存在が確認できたことから、インクリボンの製造過程において、何らかの化学反応や物理的な作用によってビオチンの活性が失われたと推察することができる。



図22 発色試験の結果

次に、インクジェット方式による銀ナノインクを用いて印刷メッシュを作成し、透過特性を調べた結果について述べる。図23にポリイミド基板に作成した銀ナノインクによる印刷メッシュの顕微鏡写真とその透過特性を示す。

ポリイミドの屈折率を受けて低周波側にシフトした透過特性を示したが、異常透過を観測することができた。ただし、本方式のプリンタは、ドットによる塗布を行うため、導電性を持たせるには重ね打ちなどの工夫を必要とし、そのため線幅や開口サイズ



基板の影響によるシフト

図23 銀ナノインクによる印刷メッシュの透過特性

によっては再現性が得られない傾向が見られた。

一方で、ポリイミドそのものがこの周波数帯で吸収ピークを持つことから、ポリイミドを基板としたセンサチップの構成は困難であることが予想された。そこで、生体高分子の固定に利用しやすいメンブレンに対する印刷を試みた。しかし、メンブレンはナノオーダーの多孔質膜であり、ピコリットルオーダーのインク粒子はメンブレン内部に入り込むため導電性を持たせたメッシュの作成が困難であった。図 24 に SEM による観察画像を示す。メンブレン自体は生体高分子との相性が良いものの、その上に印刷で導体を構成するのは困難であるため、メンブレン以外の素材の探査が必要であることが明らかとなった。

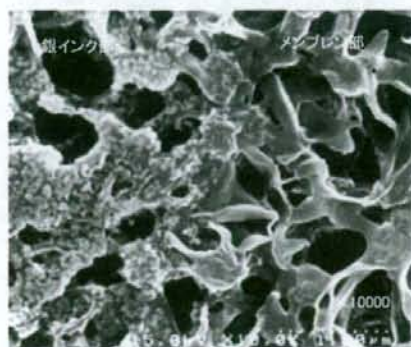


図 24 銀ナノインクを印刷したメンブレン表面の SEM 画像 (左側：銀インク部、右側：メンブレン)

3. テラヘルツ波光源技術の開発

図 25(a), (b) にテラヘルツ波およびアイドラー光出力の、励起光強度依存性を示す。励起光強度が上昇し、 300 MW/cm^2 (約 25 mJ/pulse) 付近に達すると、THz 光およびアイドラー光が観測され始める。その後、励起光エネルギーの増加に伴って THz 光出力、アイドラー光出力は共に単調に増加する様子が確認された。最高出力は、励起光強度が 820 MW/cm^2 (66 mJ/pulse) のとき、THz 光は 105 pJ/pulse (尖塔値 62 mW)、アイドラー光は 15 mJ/pulse であった。

過去の研究において、テラヘルツ波の最高出力は 1 pJ/pulse (尖塔値 $300 \text{ }\mu\text{W}$)、結晶の損傷閾値は 200 MW/cm^2 以下であった。本研究において、短パルス・トップハット型の励起光により結晶表面および内部の熱的損傷を避け、高強度励起による高出力化が達成された。

このとき、アイドラー光のスペクトルは、励起光強度が 61 mJ/pulse のとき、 $1067 - 1079 \text{ nm}$ (THz 光周波数に換算すると $0.898 - 3.87 \text{ THz}$) と、非常に広帯域に渡って観測された。図 26 に本研究におけるテラヘルツ波出力パルス毎の強度分布を示す。本研究における光源の安定性は、 $3.8\%_{\text{rms}}$ であった。テラヘルツ波の出力は励起光の尖塔値に大きく左右される

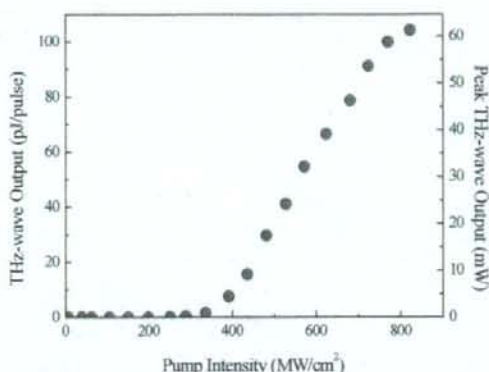


図 25(a) テラヘルツ波出力の励起光エネルギー依存性

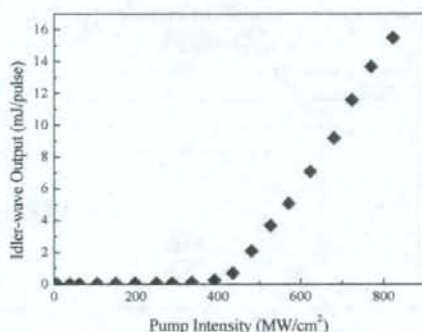


図 25(b) アイドラー光出力の励起光エネルギー依存性のため、トップハットビームを使用することで、励起光エネルギーの揺らぎに対する尖塔値の揺らぎを小さく、出力安定性の向上をすることに成功した。

次に、光注入型の実験系の結果を示す。図 27 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 $550 \text{ }\mu\text{J/pulse}$ である。注入光がない場合 (下方)、出力約 1 mW (尖頭値)、周波数 $1.5 - 2.7 \text{ THz}$ 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った。

図 28 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 $140 \text{ }\mu\text{m}$ (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る。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窄化 (1 THz 以上 $\rightarrow 10 \text{ GHz}$ 以下) に相当し、金属メッシュセンサが持つ数十 GHz のバンドパス特性を計測するのに適した特性を持たせることに成功した。図 29 に、

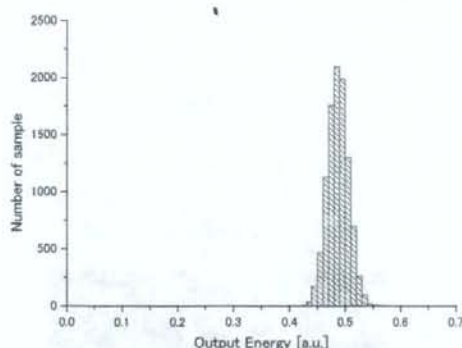


図 26 テラヘルツ波出力強度分布

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 $\mu\text{J}/\text{pulse}$ 、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 LiNbO_3 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。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。

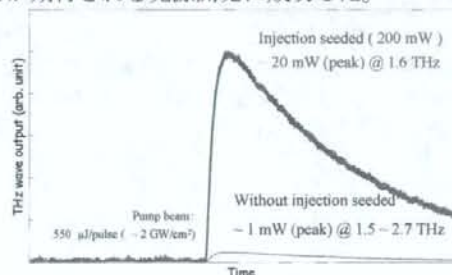


図 27 テラヘルツ波出力時間波形

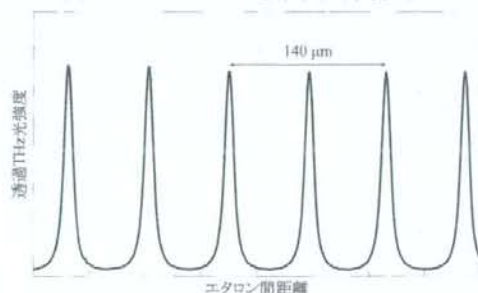


図 28 波長および線幅計測例

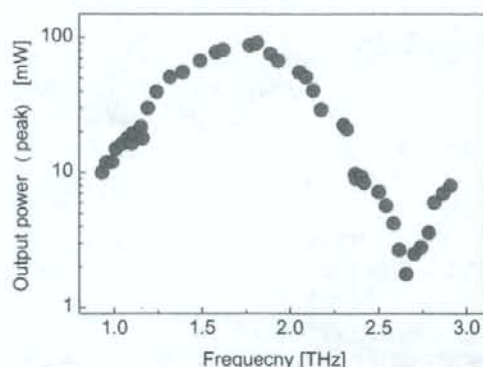


図 29 テラヘルツ波出力の周波数依存性

4. 画像化技術の開発

4.1 テラヘルツ干渉イメージング法の測定原理検証

図 30 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 31 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

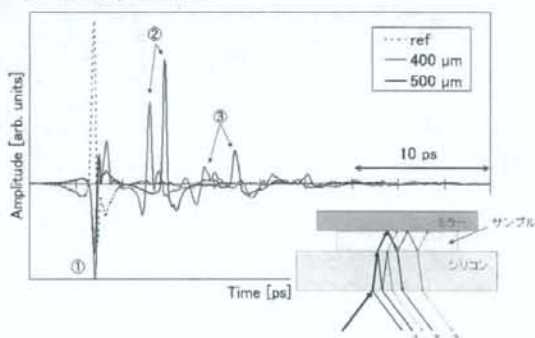


図 30 時間波形で見た各界面からの反射波の様子

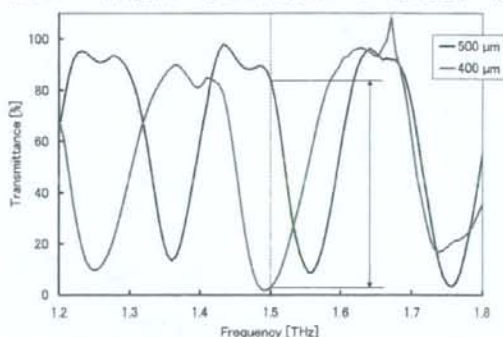


図 31 サンプルの上下面の反射波による干渉波形

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。

4.2 小分子とタンパク質の非標識画像検出実験

図32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。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33に示す。こちらの画像は標識無しの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

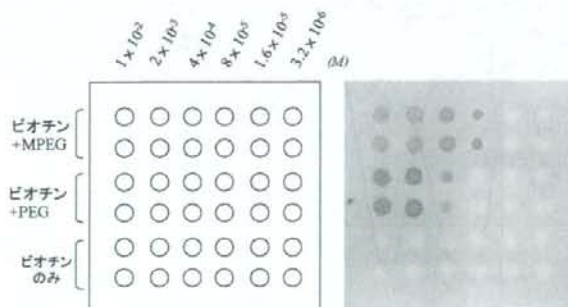


図32 ビオチンアレイの模式図(左)と標識つきストレプトアビジンとの結合後の蛍光画像(右)

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。

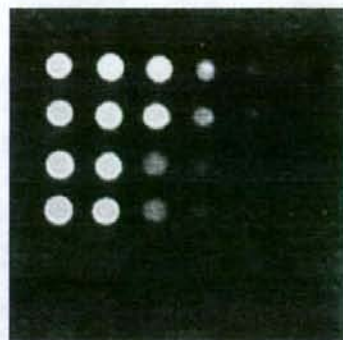


図33 ビオチンアレイに結合したストレプトアビジンの非標識検出画像

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から、新しい測定法の可能性を検証することを目標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、結合が見つかると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、生体が

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

本研究の目的は、テラヘルツ波帯の電磁波を用い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。3年の研究期間に、まず金属メッシュセンサの動作原理や特性および新規製造法に至るまでの幅広い基礎研究を展開した。その結果、金属メッシュセンサが数百ピコグラムものタンパク質を検出できる能力を有していることを示した点や、メンブレンフィルター上での抗原抗体反応の非標識検出に成功した点など、本手法が実際の臨床検査などで利用できる可能性を示すことができた。同時に、本技術の実用化に不可欠なテラヘルツ波光源技術の開発を進め、小型で高出力な波長可変光源を実現した。特にトップハットビームプロファイルを持つ励起レーザーの採用により、従来まで報告されていたテラヘルツ波出力を100倍程度向上させた点や、マイクロチップレーザーと呼ばれる先端の技術を導入して10GHz以下の狭線化にも成功したことは、金属メッシュの感度向上につながることから、本検査技術を実用化する上で重要な技術開発に成功したと言える。

一方で、当初予定していた金属メッシュとメンブレン一体型によるセンサチップの開発は、メンブレンに対する導電性周期構造作成の困難さや、金属メッシュに対する均一な密着性が問題点として明らかになったことから、新たな画像化手法による技術開発が必要となった。そこで、単なる画像化技術だけでなく、高感度化を兼ね備えた新規計測手法として、テラヘルツ波干渉イメージング法を提案し、原理実験ならびにメンブレン上の小分子アレイとタンパク質の特異的な結合の非標識検出にも成功した。この技術は、既存の蛍光法による検出感度以上の感度を有しており、創薬におけるリガンド探索などでハイスループットなスクリーニング技術として利用できる可能性があることを示した。

今回、最終年度にテラヘルツカメラが市販レベルまで近づいていることを会議で知る機会を得た。このような検出技術は、将来的に本研究で進めてきたセンサ技術と、光源技術を組み合わせることが可能で、テーブルトップサイズで高速の非標識検査装置になりうる。本研究の最終年度にこれらを組み合わせる実験を行う機会を得たが、光源とカメラの特性が合っておらず、画像を得るに至らなかった。しかし、黒体放射方式の光源でメンブレン上の小分子とタンパク質の非標識画像を得ることができたことから、今後引き続き本研究を遂行し、カメラ技術も組み合わせるシステム開発を進める予定である。

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, 吉田永, 林朱, 加藤英志, 宮丸文章, 大谷知行, 川瀬晃道, テラヘルツ波を利用した試薬レスタンパク質分析の基礎研究, 日本赤外線学会誌, 16(2), 52-59 (2007).
- 林伸一郎, 川瀬晃道, “テラヘルツ波パラメトリック光源の小型化,” OPTO NEWS, 155(5), 15-18 (2006).
- S. Hayashi, H. Minamide, T. Ikari, J. Shikata, H. Ito, Y. Ogawa, C. Otani, and K. Kawase, “Output power enhancement of Terahertz-wave parametric generator,” *Appl. Opt.*, 46(11), 117-123 (2007).
- 小川雄一, “テラヘルツイメージングの分析への応用,” *ぶんせき*, vol.11, pp. 575-578 (2007).
- 加藤英志, 吉田永, 林伸一郎, 小川雄一, 水津光司, 川瀬晃道 “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,” 電学論C, Vol. 127, No. 12, pp.2088-2092 (2007).
- H. Yoshida, Y. Ogawa, Y. Kawai, S. Hayashi, A. Hayashi, C. Otani, E. Kato, F. Miyamaru, K. Kawase, “Terahertz sensing method for protein detection using a thin metallic mesh,” *Appl. Phys. Lett.* Vol.91, No. 25, 253901 (2007).
- 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).
- Y. Ogawa, 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ゲン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

- Y. Ogawa, S. Hayashi, E. Kato, H. Yoshida, F. Miyamaru, C. Otani, and K. Kawase, “Terahertz label-free biochip sensor with thin metal mesh,” *Proceedings of Progress In Electromagnetics Research Symposium (PIERS2006-TOKYO)*, pp.2A4-1-2A4-5, (2006).
- E. Kato, H. Yoshida, S. Hayashi, Y. Ogawa, and K. Kawase, “THz sensing method based on thin metallic mesh and an application for bimolecular sensing,” *Conference Digest of the 2006 Joint 31st International Conference on Infrared and Millimeter Waves and 14th International Conference on Terahertz Electronics (IRMMW-THz 2006)*, p. 185