

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

非会員 加藤 英志***

非会員 吉田 永***

非会員 林 伸一郎****

正員 小川 雄一**

非会員 水津 光司**

正員 川瀬 晃道****

The Basic Consideration of Sensing Method Using a Metallic Mesh in the Terahertz Range

Eiji Kato***, Non-member, Hisa Yoshida***, Non-member, Shin'ichiro Hayashi****, Non-member,
Yuichi Ogawa**, Member, Koji Suizu, Non-member, Kodo Kawase****, Member

We report on a novel sensing method in the terahertz region using metallic mesh. Conventionally, the band-pass filter property of a metallic mesh can be adjusted by changing the mesh geometrical parameters. However, the band-pass filter parameters also depend on the refractive index of the medium in the vicinity of the mesh openings. To inspect this effect as a potential measurement principle, we calculated the electric field distribution around the metallic mesh and analyzed the frequency characteristics due to a sample attached to the metallic mesh using the Finite Difference Time Domain method. For bio-molecular sensing, the Electrospray Deposition method was applied in order to spray a uniform layer of protein over a metallic mesh. We observed a correlation between the quantity of protein and the transmission characteristics of the metallic mesh.

キーワード：テラヘルツ，金属メッシュ，表面プラズモンポラリトン，生体高分子センシング

Keywords: terahertz, metallic mesh, surface plasmon polariton, bio-molecular sensing

1. はじめに

テラヘルツ帯 (0.3 THz - 10 THz) と呼ばれる周波数帯では、実用に供する光源、検出器の開発がその他の周波数帯と比較して遅れていたため、未開拓の電磁波領域とされてきた。近年、小型卓上テラヘルツ光源⁽¹⁾に代表される光源技術や、テラヘルツ時間領域分光法 (Terahertz Time Domain Spectroscopy; THz-TDS)⁽²⁾に代表される計測技術が急速に進展し、テラヘルツ帯におけるアプリケーション開発が盛んに進められている。テラヘルツ波は、紙、プラスチック、

セラミック、木材、油脂などをある程度透過する電波の特性を有する最短波長の電磁波であり、かつ、レンズやミラーを用いて取回しが容易な光波としての最長波長の電磁波であるといえる。また、テラヘルツ帯ではさまざまな物質の特徴的なスペクトルが得られる領域でもあり、その対象は分子構造が比較的単純な気体、液体、固体などにおよぶ。そしてDNAに代表される生体高分子はそれらの結合状態により複素屈折率が異なるという知見が得られており⁽³⁾、バイオ応用が期待されている。さらに、テラヘルツ帯の波長は数百 μm のオーダーであり、実体顕微鏡に匹敵する空間分解能が得られ、イメージングによる非破壊検査応用が有望視されている⁽⁴⁾。

一方、金属の薄膜に正方形開口を規則的に配列した金属2次元周期構造 (金属メッシュ) は、1960年代にテラヘルツ帯において周波数選択性を有することが確認され、透過率が低い周波数領域では低損失のミラーや、ファブリペロー干渉計を構成する光学素子に活用されてきた⁽⁵⁾⁽⁶⁾。また、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周波数領域⁽⁷⁾や、高透過率の周波数領域において入射条件により回折異常に起因する鋭いディップが現れることが知られている⁽⁸⁾。近年ではナノメートルオーダーのプロセス技術の

* (株) アドバンテスト研究所
〒989-3124 仙台市青葉区上愛子字松原 48-2
Advantest Labs. Ltd.

** 名古屋大学大学院工学研究科
〒464-8603 名古屋市不老町
Graduate School of Nagoya Univ.,
Furo-cho, Nagoya 464-8603

*** 東北大学大学院農学研究科
〒981-8555 仙台市青葉区境通雨宮町 1-1
Graduate School of Tohoku Univ.,
1-1 Amemiyamachi, Tsutsumidori, Aoba, Sendai 981-8555

**** 理化学研究所
〒980-0845 仙台市青葉区荒巻字青葉 519-1399
RIKEN,
519-1399 Aoba, Aramaki, Aoba, Sendai 980-0845

発達により光領域においても金属 2 次元周期構造が作成可能となり、同様な異常透過現象が報告されている⁽⁹⁾。本論文では、テラヘルツ帯において幅広く利用されている金属メッシュの諸特性の解析からセンシング応用への可能性を論じ、その検証として、たんばく質の微量検出を行い、高感度かつ簡便なセンシングへの応用可能性について基礎的な検討を行った。

2. 金属メッシュの諸特性とセンシング応用

(2.1) 金属メッシュの諸特性 金属メッシュは、図 1 に示すように金属の薄板に正方格子状の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 種類の機構的なパラメータで表すことができる。

金属メッシュの光学的な特性は、反射パワーを R 、透過パワーを T 、吸収を A 、回折を D とするとエネルギー保存の関係が成り立ち、 $R+T+A+D=1$ となり、一般的にハイパスフィルタ特性を有する。回折 D は、金属メッシュへの平面波の入射角を α とし、 $\lambda/g > 1 + \sin \alpha$ の波長域では現れず、この領域では透過率が高周波になるにつれて高くなってゆく。吸収 A はメッシュの金属部分が良導体である場合、表面電流による抵抗損で表すことができるが、この値は非常に小さな値となるため、無視することができ、 $R+T=1$ と近似できる⁽⁸⁾。回折が現れる波長域では、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周波数領域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 (Surface Plasmon Polariton: 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⁽¹⁰⁾。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 、金属に接する媒質の誘電率を ϵ_2 とすると、

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \dots\dots\dots (1)$$

と表すことができる⁽¹¹⁾。ここで k_x は SPP の波数ベクトル、 c は真空中の光速である。但し、 $\epsilon_1 < 0$ 、 $\epsilon_2 \geq 1$ である。

金属 2 次元周期構造は、この表面波と結合する周波数が異常透過領域にあたり、 ϵ_2 を測定対象物とすると、測定対象物の密度や複素屈折率に応じて共鳴周波数が変化する。サブテラヘルツ領域では、波長程度の板厚を有する三角格子配列円形開口金属アレイを利用したセンシングが報告されている⁽¹²⁾。一方、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することができ、あらゆるテラヘルツ帯の周波数に対応した設計が可能である。板厚は波長の数分の 1 から数十分の 1 と薄くなるため、近年技術的進歩がめざましい印刷技術を利用してさらに安価に作成することが期待できる。

テラヘルツ帯におけるセンシングの例としては、マイク

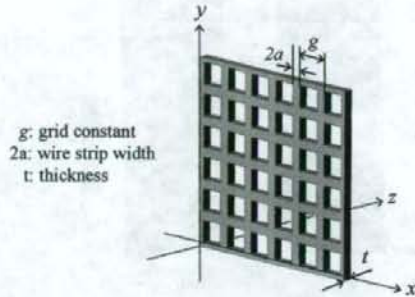


図 1 金属メッシュ
Fig. 1. A metallic mesh.

ロストリップライン共振器を用いた微量な DNA のラベルフリー検出の報告がある⁽¹³⁾。金属メッシュはセンシングエリアを 2 次元でとることができ、異なる多数のサンプルを金属メッシュに固定することにより、イメージングによる簡便かつ安価な生体高分子のラベルフリーセンシングや、高分子薄膜の品質検査などへの応用が期待できる。

(2.2) 電界分布および周波数特性の解析 金属メッシュのセンシング応用可能性を検討するにあたり、有限差分時間領域 (Finite Difference Time Domain: FDTD) 法を用いて金属メッシュ開口近傍の電磁界分布と、サンプル配置による周波数特性への影響を評価した。計算には Rsoft Design Group 社の FullWAVE⁽¹⁴⁾を使用した。図 1 の座標系に金属メッシュの開口を含む単位格子を配置し、平面波が $-z$ から $+z$ に向かって垂直入射するものとし、 $x-z$ 面と $y-z$ 面には周期境界条件を適用した。金属メッシュの機構的なサイズは $g = 76.3 \mu\text{m}$ 、 $2a = 18.3 \mu\text{m}$ 、 $t = 6 \mu\text{m}$ とし、金属の誘電分散は、ニッケルのドルーデモデルを適用した⁽¹⁵⁾。電界分布を計算する周波数は、金属メッシュの機構的なサイズから計算される透過率がピークとなる 3 THz とした⁽⁶⁾。

図 2 は金属メッシュの開口を含む単位格子 1 つ分の $x-z$ 面からみた電界強度分布であり、入射電界振幅に対して規格化した絶対値の分布を示した。図 2(a)は E_x 成分の電界強度分布である。紙面下方から平面波が金属メッシュに入射し、金属メッシュ開口内では局所的に電界が強くなり、裏面から数波長程度で再び平面波となって上方に伝搬していく様子がわかる。図 2(b)は、 E_z 成分の電界強度分布であり、図中の符号は電界の極性を表しており、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所的に強くなっていることがわかる。以上の結果から、これらの局所的に強い電界が現れる領域にサンプルに置いた場合、サンプルの密度や厚さによって (1) 式の ϵ_2 が変化し周波数特性が変化するものと考えられる。

次に、金属メッシュにサンプルを配置し、サンプル厚さの周波数特性への影響をシミュレーションにより見届もった。金属メッシュの金属部分にサンプルが均一にコーティングされた状態を想定し、サンプルの屈折率 $n = 1.5$ 、吸収係数 $\kappa = 0.01$ とし、サンプルの厚さ t が $2 \mu\text{m}$ と $4 \mu\text{m}$ の場

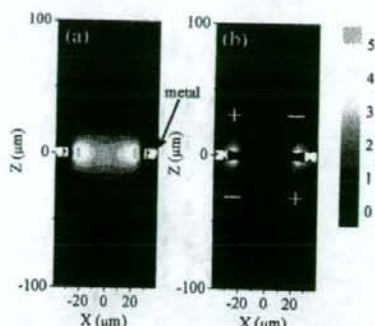


図2 金属メッシュ断面の電界分布：(a) E_x 成分, (b) E_y 成分

Fig. 2. Electric field distribution of cross section of metallic mesh for (a) Electric field of E_x and (b) E_y .

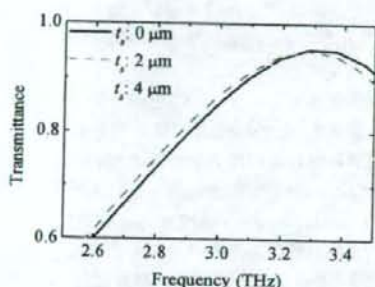


図3 シミュレーションによる金属メッシュにコーティングしたサンプル厚さと透過特性の依存性

Fig. 3. Calculated spectra of the metallic mesh and the dependence of the coated sample thickness.

合について計算を行った。図3は透過特性の計算結果である。サンプルの厚さに応じて透過特性が低周波側にシフトすること、吸収による透過率の減少が顕著に現れることを確認でき、金属メッシュがサンプルのわずかな厚さの変化に対して感度良く応答することがわかる。

3. 実験方法および結果

(3.1) 金属メッシュの透過特性 金属メッシュの機構的サイズと透過特性の関係を確認するため、格子定数 g が $50.8 \mu\text{m}$ から $254 \mu\text{m}$ 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た。材質はニッケルである。表1は作成した金属メッシュの機構的な仕様である。図4はこれらの金属メッシュをフーリエ変換赤外分光光度計(日本分光製 FARIS-IS)によりメッシュ面に対して垂直にテラヘルツ波を入射して測定した透過特性である。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高周波側にシフトすることがわかる。また、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が、これは測定に使用した

表1 金属メッシュの機構パラメータ

Table 1. Geometric parameters of the metallic meshes.

Mesh No.	Line / inch	g	$2a$	t
#1	500	50.8	17.8	6
#2	400	63.5	18.5	6
#3	333	76.3	18.3	6
#4	250	102	21.6	6
#5	150	169	34.0	22
#6	100	254	54.0	39

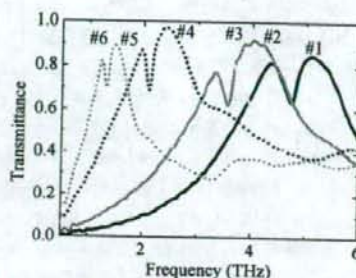


図4 6種類の金属メッシュの透過特性

Fig. 4. Measured transmission spectra of the 6 types of metallic meshes.

FTIRのビームが金属メッシュにて焦点を結ぶ集光系であることに起因し、Wood's anomalies であると考えられる。

(3.2) 微量生体高分子の定量的検出 金属メッシュに生体高分子を定量的に塗布し、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。固定する生体高分子にはタンパク質の一種であるアビジン(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作成した。アビジンは卵白中に存在する低塩基性糖タンパク質で、ビオチンと結合し、その親和力は強く不可逆であり、研究用試薬として広く利用されている。アビジンの定量的な塗布にはエレクトロスプレーデポジション(ElectroSpray Deposition: ESD)法⁽¹⁶⁾を用いた。図5はESD法によるタンパク質溶液の塗布を表した模式図である。タンパク質溶液は内径30~40 μm 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ウンド面に引き寄せられ堆積する。さらにこのプロセスは常温・常圧下で可能なため、タンパク質の失活を抑えることが可能である。テラヘルツ帯では水による吸収が非常に大きく水を含むサンプルの分析は一般的に困難であるが、本手法は分析に不要な水分を取り除くことができ、テ

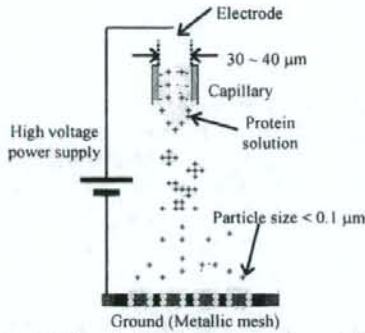


図5 ESD法を用いた金属メッシュへのタンパク質の塗布
Fig. 5. Schematic of spraying protein on to metallic mesh using the ESD method.

ラヘルツ帯におけるタンパク質のセンシングに適したサンプルの作成法になり得ると考える。

用意したサンプルを表2に示す。アビジンを塗布する基板は、表1の#3の金属メッシュ ($g: 76.3 \mu\text{m}$, $2a: 18.3 \mu\text{m}$, $t: 6 \mu\text{m}$) と、金属メッシュによるセンシングとの感度を比較するため、テラヘルツ帯で周波数特性がフラットな厚さ約 $10 \mu\text{m}$ のポリエチレン膜に白金をスパッタ (膜厚約 50 \AA) したものを用意した。ポリエチレン膜に白金をスパッタしたのは、ESD法を用いてタンパク質が基板に均一に塗布するためには基板が導電性を有している必要があるためである。これらの基板にESD装置 (Fuence社製 ES-1000) を用いてアビジン溶液を塗布した。アビジンを金属メッシュに塗布したサンプルを、電子顕微鏡を用いて観察した写真を図6に示す。10000倍にて観察したところ、メッシュの素材であるニッケル表面にアビジンを 200 ng/mm^2 塗布したものはアビジンが薄くコーティングされている様子が観察でき、 1200 ng/mm^2 になると、直径 $0.1 \mu\text{m}$ 以下のアビジンのパーティクルが堆積している様子がわかる。図7に作成したサンプルをそれぞれ前節と同様の方法で測定した 2.5 THz から 3.0 THz における透過特性を示す。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/mm^2 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同一の基板のみの透過特性であり、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、アビジンの塗布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、ディップの谷となる周波数はアビジンの無い場合の 2.82 THz から順に 2.81 THz , 2.64 THz とシフトしている。このことは、先のシミュレーション結果と合わせて考察すると、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塗布することにより、アビジンの屈折率が濃度に応じて金属メッシュ上に局在する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。

表2 ESD法により作成したサンプル

Table 2. Parameter of the ESD samples.

Sample No.	Substrate	Density of Avidin
#s1	Polyethylene membrane sputtered with platinum	200 ng/mm^2 (3.3 pmol)
#s2	Metallic mesh	200 ng/mm^2
#s3	Metallic mesh	1200 ng/mm^2 (19.8 pmol)

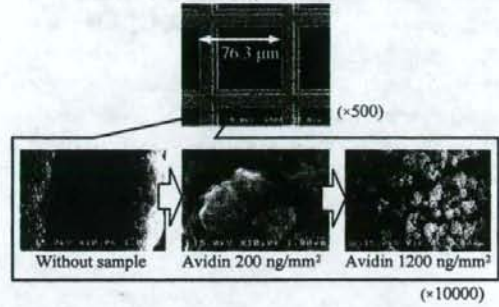


図6 アビジンを塗布した金属メッシュのSEM像
Fig. 6. SEM images of the metallic mesh with and without avidin.

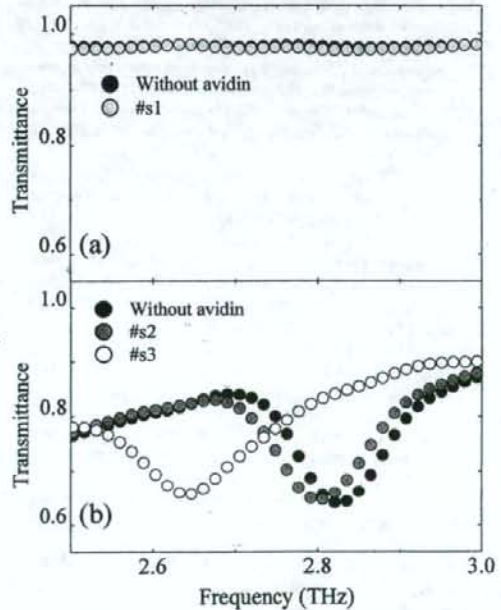


図7 作成したサンプルの透過特性: (a) #s1と#s1の基板のみ、(b) #s2、#s3と金属メッシュのみ

Fig. 7. Measured transmission spectra of the samples using the ESD method. (a) #s1 and the same substrate of #s1 without avidin. (b) #s2, #s3 and the same metallic mesh without avidin.

4. むすび

金属メッシュを用いたセンシング法の基礎検討を目的として、金属メッシュにテラヘルツ波を入射した場合の金属メッシュ近傍の電界分布計算から金属メッシュ開口内とエッジ部に局在する強い電界を確認し、サンプル配置による周波数特性変化の解析から、サンプルのわずかな厚さの変化に対して周波数特性が変化することを確認した。検証としてタンパク質の検出実験から、 200 ng/mm^2 (3.3 pmol) という微量なタンパク質により透過特性が変化する様子を確認した。今後は更なる高感度化を目指し、メッシュ構造およびテラヘルツ波の入射条件について解析し、イメージングを取り入れたセンシングを行う予定である。

ESD法を用いたサンプル作成においてご協力いただきました株式会社フューエンスの加瀬取締役副社長、最上主任研究員に深く感謝申し上げます。

(平成19年4月24日受付、平成19年7月17日再受付)

文 献

- (1) K. Kawase, J. Shikata, and H. Ito: "Terahertz wave parametric source", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, Vol.35, pp.R1-R14 (2002-1)
- (2) M. Hangyo, T. Nagashima, and S. Naahima: "Spectroscopy by pulsed terahertz radiation", *Meas. Sci. Technol.*, Vol.13, pp.1727-1738 (2002-10)
- (3) M. Brucherseifer, M. Nagel, P. Haring Bolivar, H. Kurz, A. Bosserhoff, and R. Büttner: "Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing", *Appl. Phys. Lett.*, Vol.77, Iss. 24, pp.4049-4051 (2000-11)
- (4) N. Karpowicz et al.: "Compact continuous-wave subterahertz system for inspection applications", *Appl. Phys. Lett.*, Vol.86, pp.054105 (2005-1)
- (5) K. F. Renk and L. Genzel: "Interference Filters and Fabry-Perot Interferometers for the Far Infrared", *Appl. Opt.*, Vol.1, No.5, pp.643-648 (1962-9)
- (6) K. Sakai, T. Fukui, Y. Tsunawaki, and H. Yoshinaga: "Metallic mesh bandpass filters and Fabry-Perot interferometer for the far infrared", *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol.8, No.8, pp.1046-1055 (1969-8)
- (7) R. Ulrich: "Far-infrared Properties of Metallic Mesh and Its Complementary Structure", *Infrared Phys.*, Vol.7, Iss. 1, pp.37-55 (1967-1)
- (8) J. M. Lamarre, N. Coron, R. Courtin, G. Dambier, and M. Charra: "METALLIC MESH PROPERTIES AND DESIGN OF SUBMILLIMETER FILTERS", *Int. J. Infrared Millimeter Waves*, Vol.2, No.2, pp.273-292 (1981-3)
- (9) T. W. Ebbesen, H. J. Lezec, H. F. Ghaemi, T. Thio, and P. A. Wolff: "Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays", *Nature*, Vol.391, pp.667 (1998-2)
- (10) H. F. Ghaemi, T. Thio, D. E. Grupp, T. W. Ebbesen, and H. J. Lezec: "Surface plasmons enhance optical transmission through subwavelength holes", *Phys. Rev. B*, Vol.58, Iss. 11, pp.6779-6782 (1998-9)
- (11) H. Raether: "Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings", Springer Tracts in Modern Physics 111, p.5, Springer-Verlag, Berlin (1988)
- (12) 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, Iss. 8, pp.1118-1120 (2006-4)
- (13) P. H. Bolivar, M. Brucherseifer, M. Nagel, H. Kurz, A. Bosserhoff, and R. Büttner: "Label-free probing of genes by time-domain terahertz sensing", *Phys. Med. Biol.*, Vol.47, No.21, pp.3815-3821 (2002-10)
- (14) http://www.rssoftdesign.com/products/component_design/FullWAVE/
- (15) M. A. Ordal, R. J. Bell, R. W. Alexander, Jr., L. L. Long, and M. R. Querry: "Optical properties of Au, Ni and Pb at submillimeter wavelengths", *Appl. Opt.*, Vol.26, Iss. 4, pp.744-752 (1987-2)
- (16) V. N. Morozov and T. Ya. Morozova: "Electrospray Deposition as a

Method To Fabricate Functionally Active Protein Films", *Anal. Chem.*, Vol.71, No.7, pp.1415-1420 (1999-4)

加 藤 英 志



(非会員) 1975年12月24日生。2000年3月名古屋工業大学大学院工学研究科博士前期課程修了。同年4月(株)アドバンテスト入社。2006年4月より名古屋工業大学大学院工学研究科博士後期課程在学中。現在、テラヘルツ波応用研究に従事。

吉 田 永



(非会員) 1975年5月6日生。2001年3月東北大学大学院農学研究科博士前期課程修了。2004年10月より東北大学大学院農学研究科テラヘルツ生物工学寄附講座技術補佐員。2006年10月より同大学大学院農学研究科博士後期課程在学中。現在、テラヘルツ波応用研究に従事

林 伸一郎



(非会員) 1974年5月12日生。2004年3月明治大学大学院理工学研究科博士後期課程修了(博士(理学))。2006年4月より同研究所緑川レーザー物理工学研究室協力研究員。2007年4月より東北大学大学院農学研究科助教を兼任。現在、テラヘルツ光源の研究に従事。

小 川 雄 一



(正員) 1971年5月16日生。1997年3月岡山大学大学院自然科学研究科修士課程修了。2005年7月同大学大学院農学研究科助教(博士(農学))。2007年4月より同大学大学院農学研究科准教授。現在、テラヘルツ波の農業応用に関する研究に従事。

水 津 光 司



(非会員) 1974年1月24日生。2001年3月九州大学大学院工学研究科応用物理学専攻博士後期課程修了(博士(工学))。2007年4月より名古屋工業大学大学院工学研究科助教。現在、テラヘルツ光源・イメージングの研究に従事。

川 瀬 晃 道



(正員) 1966年9月14日生。1996年3月東北大学大学院工学研究科電子工学専攻博士課程修了(工学博士)。2007年4月より名古屋大学エコトピア科学研究所教授。現在、テラヘルツ光源・イメージングの研究に従事。

Output power enhancement of a palmtop terahertz-wave parametric generator

Shin'ichiro Hayashi, Hiroaki Minamide, Tomofumi Ikari, Yuichi Ogawa, Jun-ichi Shikata, Hiromasa Ito, Chiko Otani, and Kodo Kawase

Broadband terahertz (THz) waves were generated by optical parametric processes based on laser light scattering from the polariton mode of a nonlinear crystal. By using the parametric oscillation of a MgO-doped LiNbO₃ crystal pumped by a nanosecond Q-switched Nd:YAG laser, we have realized a broadband, high-energy and compact THz-wave source. We report the development of a THz-wave parametric generator (TPG) using a small pump source with a short pulse width and a top-hat beam profile. These characteristics of the pump beam permit high-intensity pumping especially close to the output surface of the THz wave without thermal damage to the crystal surface. We also calculated the outcoupled THz wave for beams with two different intensity profiles: a top-hat beam (in this experiment) and a Gaussian beam (previously reported). The result shows the mechanism of the output energy and/or power enhancement. © 2007 Optical Society of America

OCIS codes: 190.0190, 140.3070, 190.4410, 190.4970.

1. Introduction

The terahertz (THz) wave range, bridging the gap between microwaves and the far infrared, has found an increasing number of applications in recent years. Improved sources and detectors allow THz radiation to be applied in solving real-world problems, such as in material science, solid state physics, molecular analysis, atmospheric research, biology, chemistry, drug and food inspection, and gas tracing. From the point of view of applied research using THz waves, there is a growing demand for sources that are simple and compact and provide a high-power output.

There are several ways to generate THz waves. In the laboratory one of the most widespread processes is the optical rectification or photoconductive switching produced by using femtosecond laser pulses.^{1,2} Applied research, such as time domain spectroscopy (THz-TDS), makes use of the good time resolution and the ultra broad bandwidth up to the THz region. Novel tunable sources already exist in the sub-THz (several hundred gigahertz) frequency region, such as the backward-wave oscillator (BWO). However, the output power of a BWO rapidly decreases in the frequency region above 1 THz, and its tuning capability is relatively limited.

Only a few sources bring together qualities such as room temperature operation, compactness, and ease of use. The THz-wave parametric generation is based on an optical parametric process in a nonlinear crystal.^{3,4} The principles of the THz-wave parametric generator⁵⁻⁷ (TPG) and the THz-wave parametric oscillator⁸⁻¹⁰ (TPO) allow building systems that are not only compact but also operate at room temperature, making them suitable as practical sources. In principle, both a narrow linewidth and a wide tunability are possible in injection-seeded TPG/TPO (is-TPG/TPO) systems with single-longitudinal-mode near-infrared lasers as seeders.¹¹⁻¹⁴

A TPG, however, uses a quite simple configuration since it needs no resonator or seeder. The linewidth of the THz wave emitted from the TPG is typically broad, approximately 1 THz. In addition, several ap-

S. Hayashi (shayashi@riken.jp) is with K. Kawase at RIKEN, The Institute of Physical and Chemical Research, 2-1 Hirosawa, Wako 351-0198, Japan and with Y. Ogawa and K. Kawase at the Graduate School of Agriculture Science, Tohoku University, 1-1 Tsutsumidori Amamiyamachi, Aoba, Sendai 981-8555, Japan. H. Minamide, T. Ikari, H. Ito, and C. Otani are with RIKEN SENDAI, 519-1399 Aramaki-Aoba, Aoba, Sendai 980-0845, Japan. J. Shikata is with H. Ito at the Research Institute of Electrical Communication, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba, Sendai 980-8577, Japan. K. Kawase is also with the Department of Quantum Engineering, Nagoya University, Furocho, Chikusa, Nagoya 464-8603, Japan.

Received 27 April 2006; revised 24 August 2006; accepted 8 September 2006; posted 13 September 2006 (Doc. ID 70299); published 15 December 2006.

0003-6935/06/010117-07\$15.00/0

© 2007 Optical Society of America

plications are better suited to a TPG than to a TPO or is-TPG, such as tomographic imaging, interferometric spectroscopy, and diffuse reflection spectroscopy. Tomographic imaging and interferometric spectroscopy have to use a broadband source. The detection of scattered THz radiation strongly depends on the grain size of samples made of particles; using a broadband source reduces this effect. Also, the TPG is useful for many industrial applications such as transmission imaging for materials or food inspection.

In previous research these sources were pumped using flashlamp- or laser diode-pumped *Q*-switched Nd:YAG lasers that have Gaussian beam profiles and long pulse widths (15–25 ns). The output energy of the THz wave increases with the pump energy, but eventually the damage threshold of the crystals is reached. Here we show how the output energy or power was further enhanced and how the TPG was reduced to palm-top size by using a small pump source having a short pulse width and a top-hat beam profile. These characteristics of the pump beam permit high intensity pumping especially close to the output surface of the THz wave without thermal damage to the crystal surface. The higher intensity pumping and smaller absorption of the THz wave inside the crystal allow output energy greater than 100 times higher than that previously reported.⁷ To understand the mechanism of such an improvement, we also made calculations of the THz wave generation and extraction in the case of a top-hat intensity distribution of the pump beam and compared the results with those already reported for the case of a Gaussian profile.

2. Principles of the THz Wave Parametric Generation

When a strong laser beam propagates through a nonlinear crystal, photon and phonon transverse wave fields are coupled and behave as new mixed photon-phonon states, called polaritons. The generation of the THz wave results from the efficient parametric scattering of laser light via a polariton, that is, stimulated polariton scattering. The scattering process involves both second- and third-order nonlinear processes. Thus strong interaction occurs among the pump beam, the idler wave, and the polariton (THz) wave.

One of the most suitable nonlinear crystals to generate a THz wave is lithium niobate (LiNbO₃) thanks to its large nonlinear coefficient ($d_{33} = 25.2 \text{ pm V}^{-1}$ at $\lambda = 1064 \text{ nm}$ ¹⁵) and its transparency over a wide wavelength range (0.4–5.5 μm). LiNbO₃ has four infrared and Raman-active transverse optical (TO) phonon modes, called A_1 -symmetry modes, and the lowest mode ($\omega_0 \sim 250 \text{ cm}^{-1}$) is useful for efficient THz wave generation because it has the largest parametric gain as well as the smallest absorption coefficient.⁵

The principle of tunable THz wave generation is as follows. The polaritons exhibit phononlike behavior in the resonant frequency region (near the TO-

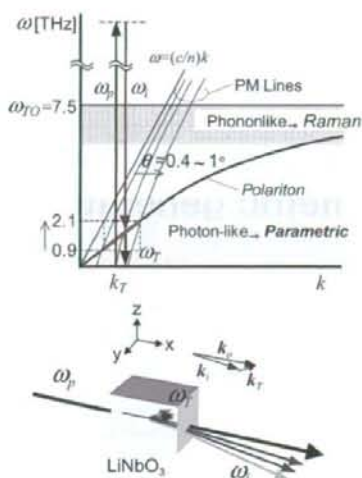


Fig. 1. Dispersion relation of the polariton and noncollinear phase matching condition.

phonon frequency ω_{TO}). However, they behave like photons in the nonresonant low-frequency region as shown in Fig. 1, where a signal photon at THz frequency (ω_T) and a near-infrared idler photon (ω_i) are created parametrically from a near-infrared pump photon (ω_p), according to the energy conservation law $\omega_p = \omega_T + \omega_i$ (p , pump beam; T , THz wave; i , idler wave). In the stimulated scattering process, the momentum conservation law $\mathbf{k}_p = \mathbf{k}_i + \mathbf{k}_T$ (noncollinear phase-matching condition, Fig. 1) also holds. This leads to the angle-dispersive characteristics of the idler and the THz waves. Thus broadband THz waves are generated depending on the phase-matching angle. Generation of a coherent THz wave can be achieved by applying an optical resonator (in the case of the TPO) or injecting a seed for the idler wave (in the case of the is-TPG). Continuous and wide tunability is accomplished simply by changing the angle between the incident pump beam and the resonator axis or the seed beam. More details about TPO and is-TPG can be found in Refs. 5–14.

The bandwidth of the TPG is decided by the parametric gain and the absorption coefficients in the THz region. According to a plane-wave approach, analytical expressions of the exponential gain for the THz and idler waves are given^{3,5} by

$$g_T = \frac{\alpha_T}{2} \left[\sqrt{1 + 16 \cos^2 \phi \left(\frac{g_0}{\alpha_T} \right)^2} - 1 \right], \quad (1)$$

where α_T is the absorption coefficient of the THz wave in the nonlinear crystal. Parameter ϕ is the phase-matching angle between the pump beam and the THz wave; g_0 is the parametric gain in the low-loss limit and takes the form

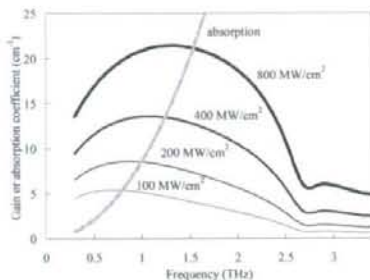


Fig. 2. Calculated gain and absorption coefficient.

$$g_0 = \frac{\pi \omega_p \omega_i I_p}{2c^3 n_T n_i n_p} \chi_p \propto \sqrt{\omega_i \omega_p I_p} \quad (2)$$

$$\chi_p = d_E + \frac{S_0 \omega_0^2}{\omega_0^2 - \omega^2} d_Q \quad (3)$$

where I_p is the pump intensity, n_T , n_i , n_p are the crystal refractive indices at the wavelengths of the THz wave, idler wave, and pump beam, respectively, ω_0 is the resonance frequency of the lowest A_1 mode, and S_0 is the oscillator strength. The nonlinear coefficients d_E and d_Q represent second- and third-order nonlinear processes, respectively. The absorption coefficient α_T in the THz region is given by

$$\alpha_T = \frac{2\omega}{c} |\text{Im}(\sqrt{\epsilon_T})| \quad (4)$$

where ϵ_T is the dielectric constant of the nonlinear crystal.

Figure 2 shows the calculated gain and the absorption coefficient at several pump intensities. The gain curve has a broad bandwidth of approximately 3 THz, with a dip appearing at approximately 2.6 THz. This is because the low frequency modes of doped MgO in the MgO:LiNbO₃ work as crystal lattice defects for LiNbO₃.⁵

3. Experimental Setup

The experimental apparatus shown in Fig. 3(a) consists of a flashlamp-pumped Q-switched Nd:YAG laser (BIGSKY Ultra), a lens, mirrors, and two nonlinear crystals. All the components, except for the detector in Fig. 3(a), can be mounted on a 12 cm × 22 cm breadboard. The small pump source has a short pulse width of approximately 5 ns. Its slight divergence is corrected by a lens placed at the output of the source. It has a top-hat profile with a beam diameter of 1.3 mm (FWHM) on the first crystal as shown in Fig. 3(b). We used two 65 mm long nonlinear MgO:LiNbO₃ crystals. Both crystal ends were antireflection coated for a wavelength of 1064 nm. The gap between the two crystals was approximately 100 μm in our experiment, which is short enough

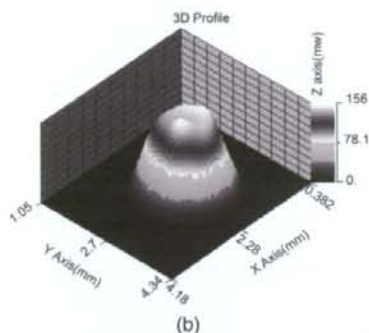
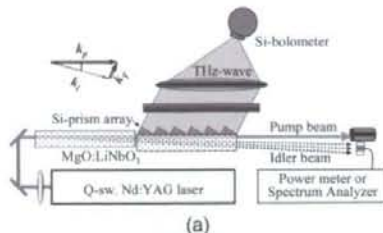


Fig. 3. (a) Experimental setup and (b) beam profile of the pump beam at the first crystal surface.

for the phase-matching condition.⁷ A Si-prism array placed on the y surface of the MgO:LiNbO₃ crystal acts as an efficient output coupler for the THz waves to avoid the total internal reflection of the THz waves on the output side crystal surface.

For efficient extraction of THz waves, the pumped region inside the second crystal must be as close as possible to the Si-prism array, because of the large absorption coefficient of the MgO:LiNbO₃ crystal in the THz range (20 cm⁻¹ at 1.5 THz).¹⁶ A top-hat beam profile is suitable for this purpose, since the high intensity region of the pump beam can be brought closer to the y surface than in the case of a Gaussian beam. The distance between the y surface and the beam center was precisely adjusted to obtain a maximum THz wave output, and it was approximately equal to the pump beam radius.

The THz wave output extracted through the Si-prism array was measured by using a 4.2 K silicon bolometer, and the idler wave energy was measured with a pyroelectric detector. The minimum and maximum sensitivity levels of the bolometer were approximately 0.01 and 10 pJ without any amplifier or attenuator. Attenuators were used when the detector was saturated; to cut diffused light from the pump and idler, a thick black polyethylene sheet was used. The time-dependent signals of the pump beam were recorded by detecting scattered light with a p-i-n photodetector.

4. Experimental Results

Figure 4(a) shows the output energy or power of the THz wave, and Fig. 4(b) shows that of the idler wave as

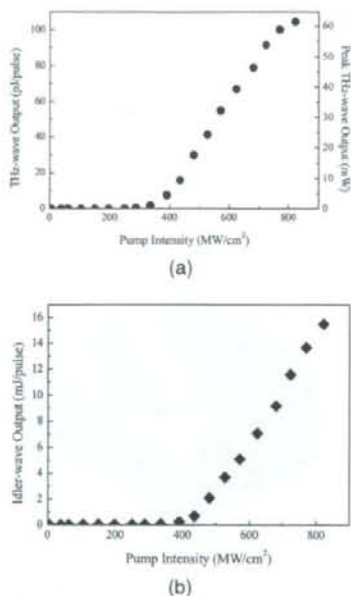


Fig. 4. Output energy of the (a) THz wave as a function of pump energy and (b) idler wave as a function of pump energy.

a function of the pump intensity. As the pump intensity is higher, the THz and the idler waves start to be detected at a pump intensity of approximately 300 MW/cm^2 (25 mJ/pulse) then increase monotonically. The highest values obtained were 105 pJ/pulse (62 mW peak power) for the THz wave and 15 mJ/pulse for the idler wave, both measured when the pump intensity was 830 MW/cm^2 (66 mJ/pulse), which corresponds to a pump energy of 66 mJ/pulse . The output of the THz wave appears to saturate when the pump intensity exceeds 750 MW/cm^2 (60 mJ/pulse). Because higher intensity pumping leads to broader bandwidth as indicated by Eq. (1), however, the absorption coefficient for the THz wave rapidly increases in the high frequency range. In comparison with the data in Figs. 4(a) and 4(b), the THz wave output was correlated with the idler wave output.

In previous TPG/TPO research, the crystal damage threshold was below the value of 200 MW/cm^2 for the pump beam intensity. With this report, by using a short-pulse width pump beam, the damage threshold was increased approximately four times. Moreover, the top-hat beam profile allowed for high-intensity pumping especially close to the THz wave output surface, without any thermal damage to the crystal surface. These combined characteristics of pump beam yield 100 times more output energy of the THz wave.

Figure 5 shows the pump depletion rate dependence of the pump energy. The pump energy was mainly transferred to the idler wave at approximately 1070 nm and to the THz wave. In the nonlin-

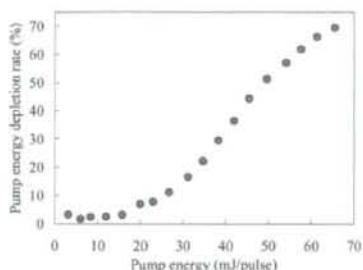


Fig. 5. Pump depletion rate as a function of pump energy.

ear crystal, the pump beam generated two idler waves and two THz waves, both pairs satisfying the noncollinear phase-matching condition. Unfortunately, most of the generated THz wave was lost because of the large absorption coefficient of the crystal. Higher-intensity pumping allows a higher conversion efficiency from the pump beam to the THz wave because, as the pump energy increases, the depletion ratio is larger. The depletion ratio curve starts growing above the generation threshold of the idler and THz waves at approximately 25 mJ/pulse pump energy; the maximum depletion rate is approximately 70% at a pump energy of 65 mJ/pulse .

Figure 6(a) shows the time profile of the pump beam in two cases: through the crystals (the lower curve) and when the crystals are removed (the upper curve)

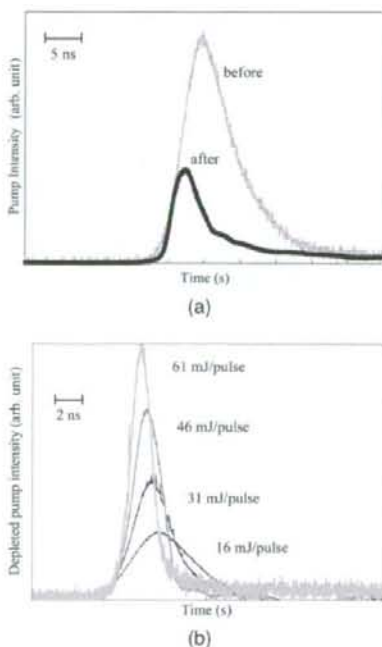


Fig. 6. (a) Time profile of the pump beam before/after transmission through the crystal; (b) time profile of the depleted pump beam.

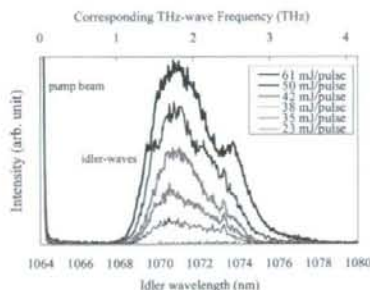


Fig. 7. Idler-wave spectra measured at varying pump energies.

curve). The measurement was done using a p-i-n photodetector at a pump energy of 65 mJ/pulse. The two signals started rising in a similar manner, but after reaching the generation threshold, the THz and idler waves were generated, and part of the pump energy was transferred to them. Figure 6(b) shows the time-dependent pump pulse shape of the depleted pump, with the crystals in the beam. As the pump energy is increased, the pulse length of the depleted pump becomes narrower because the generation of the idler and the THz waves starts earlier and leads to pump depletion sooner. When generating narrow linewidth THz waves, high-intensity THz and idler waves regenerate the pump beam, a phenomenon called back conversion.¹⁴ In our experiment, although a large pump depletion occurs, no back conversion was observed. This is probably attributable to the broadband spectrum of the generated THz waves, which are not sufficiently bright at any frequency.

Figure 7 shows the idler wave spectrum observed for varying pump energies. According to the non-collinear phase-matching condition, the propagating direction of the generated idler waves is slightly different from that of the pump beam, with an angle between them of approximately 1.5° outside the crystal. As the pump energy increases, the idler wave spectrum covers a broader spectral region, especially toward longer wavelengths. At the maximum pump energy, the idler wave spectrum was found to cover the range 1067–1079 nm. This spectrum corresponds to the THz wave frequency range 0.898–3.87 THz (77.6–334 μm). The measured spectrum is much broader than that observed in a previous report.⁵ The main reason for this broader spectrum might be the fact that the parametric gain could have a broader bandwidth by higher pump energy as shown in Fig. 2. The dip in the spectra at approximately 1073 nm appears to be attributable to the MgO doping of the LiNbO₃; the lattice defects produced by the MgO lead to additional peaks of the absorption coefficient α_T .⁵

5. Discussion

The output energy–power enhancement and broadband generation of the THz waves are accomplished by high-intensity pumping and a reduced absorption

of the generated THz wave, which in turn are made possible by using a short-pulsed pump source with a top-hat beam intensity profile. Here we estimate the output energy of the THz wave by taking into account two main effects. One is the parametric gain, which depends on the pump intensity. The other is the outcoupling efficiency of the generated THz wave that depends on the generation point in the crystal.

The calculated parametric gain curve as a function of the THz-wave frequency by Eqs. (1)–(4) at typical pump intensities in this experiment and previously reported⁷ are shown in Fig. 2. The top curve represents the parametric gain curve when the pumping energy is 800 MW/cm², and the bottom curve is for 100 MW/cm². These gain curves peak at 0.7–1.5 THz depending on the pump intensity. As the pump intensity increases, the peak of the gain curve shifts and broadens toward higher frequencies. This explains the experimental result shown in Fig. 7. The gain coefficient in this experiment is several times higher than previously reported.

Next, we consider the effect of the pump beam profile on the generation and outcoupling of the THz wave. The intensity profile of the generated THz wave depends on that of the pump beam; we also take into account that the THz wave is generated only in the pumping area where the generation threshold is exceeded. Subsequently, the outcoupling efficiency of the generated THz wave strongly depends on the position of the generation point, specifically the distance to the crystal surface, because the LiNbO₃ has a large absorption coefficient. The results are shown in Fig. 8.

We compared the output THz waves in two cases: a pump beam with a top-hat profile and one with a Gaussian profile, both having the same peak intensity and the same FWHM diameter. The corresponding intensity profiles are given by

$$I_{\text{TOP HAT}}(x, y) = \begin{cases} I_0, & (x - x_c)^2 + (y - y_c)^2 \leq w/2 \\ 0, & (x - x_c)^2 + (y - y_c)^2 \geq w/2 \end{cases} \quad (5)$$

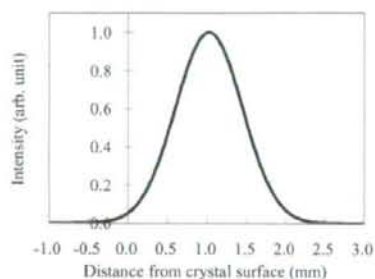
$$I_{\text{Gauss}}(x, y) = I_0 \exp\left[-\frac{(x - x_c)^2 + (y - y_c)^2}{2(2w\sqrt{\ln 4})^2}\right], \quad (6)$$

where I_0 is the peak intensity, the reference for the coordinate system is taken at the crystal surface, (x_c, y_c) is the pump beam center, and w is the diameter of the pump beam at FWHM.

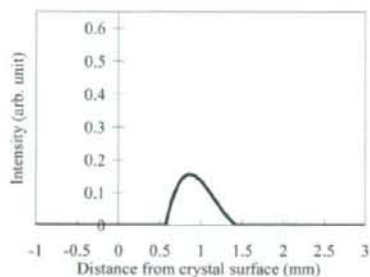
The generated THz wave I_{THz0} is absorbed while propagating in the LiNbO₃ crystal. If the absorption coefficient of the THz wave in the crystal is α_T and the propagating distance is d_p , the THz wave reaching the crystal surface I_{THzout} is given by

$$I_{\text{THzout}}(d_p) = I_{\text{THz0}} \exp(-\alpha_T d_p). \quad (7)$$

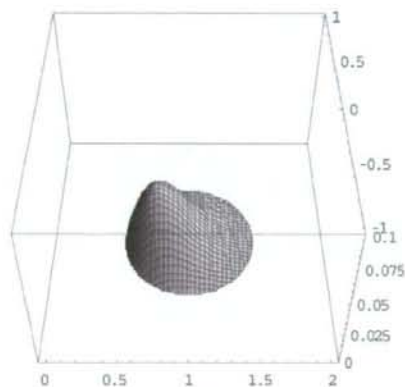
To estimate the THz wave output, we integrate all the generated waves depending on the intensity pro-



(a)



(b)



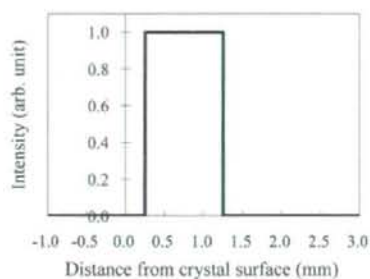
(c)

Fig. 8. (a) Cross section of the pump beam intensity (Gaussian profile), (b) cross section of the generated THz wave, (c) 3D image of the generated THz wave.

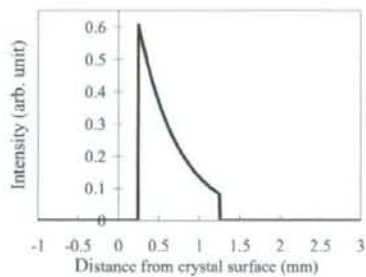
file of the pump beam:

$$E_{\text{THz}} = \iint I_{\text{pump}}(x, y) g_T I_{\text{THzout}} dx dy. \quad (8)$$

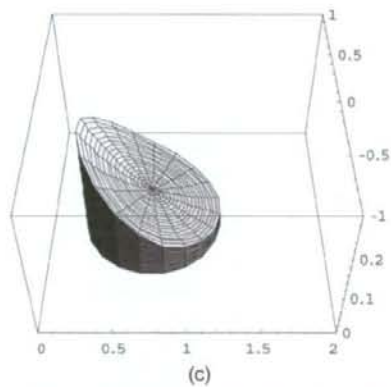
Figures 8(a) and 9(a) show the cross section of the pump beam we used in the calculation. Figures 8(b) and 9(b) show the amount of THz waves that are coupled out of the crystal, depending on the generation point. The 0 point of the x axis is taken on the crystal surface, where the THz waves are coupled out. In the simulation, the top-hat beam can approach the



(a)



(b)



(c)

Fig. 9. (a) Cross section of the pump beam intensity (top-hat profile), (b) cross section of the generated THz wave, (c) 3D image of the generated THz wave.

surface at a distance equal to the beam radius; however, in the real experiment, the intensity profile of the pump beam shown in Fig. 3(b) has some small spread. Therefore in our simulation we took the distance from the crystal surface closer by one half of the beam radius, $0.75w$, than the Gaussian one. Even under the same pumping conditions the top-hat beam allowed more than 20 times greater total output energy than in the case of the Gaussian beam. The reason is that the top-hat beam profile can provide stronger pumping near the output surface of the crystal so that the THz waves suffer less absorption on the way out.

By integrating the number of the THz waves coupled out of the crystal, depending on the intensity profile of the pump beams, including the gain coefficient for the two beams, we found that the output energy of the THz wave from a 800 MW/cm² top-hat pump beam in our experiment was approximately 100 times higher than that from a 100 MW/cm² Gaussian pump beam.

6. Conclusion

We have demonstrated experimentally and have also calculated the output enhancement of the TPG, and at the same time achieved a considerable downsizing of this THz source, all of which were realized by using a small pump source with a short pulse width and a top-hat beam profile. We measured a THz-wave output energy of 105 pJ/pulse, with a power peak at 62 mW, and a broadband spectrum extending from 0.9 to 3.8 THz. The new source is more than 100 times brighter and has a spectrum more than twice as broad as that previously reported.⁷ We observed a large pump depletion rate of approximately 70%. We also explained the mechanism of the power enhancement by simulating the THz wave generation by using two pump beams with different intensity distributions.

At present, this TPG system has no tunability and can be used in situations where a broad spectrum is acceptable or desirable. However, from these results it can also be expected that a wide tunability will be possible by seed injecting the idler wave. Other combinations between pulse width and energy of the pump beam, within the limits of the damage threshold, have the potential to allow the generation of a THz wave with various characteristics. The palmtop size of this THz wave source will probably lead to its wide application. We are also considering the use of a laser-diode-pumped YAG laser to further decrease the size of the TPG source.

The authors thank A. Dobroui, K. Shindo, and T. Shibuya from RIKEN for useful discussions, C. Takyu for his excellent work coating the crystal surface, and T. Shoji for his superb polishing of the crystals. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Young Scientists (17760290) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

References

- P. R. Smith, D. H. Auston, and M. C. Nuss, "Subpicosecond photoconducting dipole antennas," *IEEE J. Quantum Electron.* **24**, 255–260 (1988).
- X. C. Zhang, B. B. Hu, J. T. Darrow, and D. H. Auston, "Generation of femtosecond electromagnetic pulses from semiconductor surfaces," *Appl. Phys. Lett.* **56**, 1011–1013 (1990).
- S. S. Sussman, *Tunable Scattering from Transverse Optical Modes in Lithium Niobate*, Microwave Laboratory Report No. 1851 (Stanford University, 1970).
- M. A. Piestrup, R. N. Fleming, and R. H. Pantell, "Continuously tunable submillimeter wave source," *Appl. Phys. Lett.* **26**, 418–421 (1975).
- J. Shikata, K. Kawase, K. Karino, T. Taniuchi, and H. Ito, "Tunable terahertz-wave parametric oscillators using LiNbO₃ and MgO:LiNbO₃ crystals," *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.* **48**, 653–661 (2000).
- A. Sato, K. Kawase, H. Minamide, S. Wada, and H. Ito, "Tabletop terahertz-wave parametric generator using a compact, diode-pumped Nd:YAG laser," *Rev. Sci. Instrum.* **72**, 3501–3504 (2001).
- J. Shikata, K. Kawase, T. Taniuchi, and H. Ito, "Fourier-transform spectrometer with a terahertz-wave parametric generator," *Jpn. J. Appl. Phys.* **41**, 134–138 (2002).
- K. Kawase, M. Sato, T. Taniuchi, and H. Ito, "Coherent tunable THz-wave generation from LiNbO₃ with monolithic grating coupler," *Appl. Phys. Lett.* **68**, 2483–2485 (1996).
- K. Kawase, M. Sato, K. Nakamura, T. Taniuchi, and H. Ito, "Unidirectional radiation of widely tunable THz wave using a prism coupler under noncollinear phase matching condition," *Appl. Phys. Lett.* **71**, 753–755 (1997).
- K. Kawase, J. Shikata, H. Minamide, K. Imai, and H. Ito, "Arrayed silicon prism coupler for a terahertz-wave parametric oscillator," *Appl. Opt.* **40**, 1423–1426 (2001).
- K. Imai, K. Kawase, J. Shikata, H. Minamide, and H. Ito, "Injection-seeded terahertz-wave parametric oscillator," *Appl. Phys. Lett.* **78**, 1026–1028 (2001).
- K. Kawase, J. Shikata, K. Imai, and H. Ito, "Transform-limited, narrow-linewidth, terahertz-wave parametric generator," *Appl. Phys. Lett.* **78**, 2819–2821 (2001).
- K. Kawase, H. Minamide, K. Imai, J. Shikata, and H. Ito, "Injection-seeded terahertz-wave parametric generator with wide tunability," *Appl. Phys. Lett.* **80**, 195–197 (2002).
- K. Kawase, J. Shikata, and H. Ito, "Terahertz-wave parametric source," *J. Phys. D* **35**, R1–R14 (2002).
- I. Shoji, T. Kondo, A. Kitamoto, M. Shirane, and R. Ito, "Absolute scale of second-order nonlinear optical coefficients," *J. Opt. Soc. Am. B* **14**, 2268–2294 (1997).
- J. Shikata, M. Sato, T. Taniuchi, and H. Ito, "Enhancement of terahertz-wave output from LiNbO₃ optical parametric oscillators by cryogenic cooling," *Opt. Lett.* **24**, 202–204 (1999).

Terahertz sensing method for protein detection using a thin metallic mesh

H. Yoshida,^{a)} Y. Ogawa, and Y. Kawai*Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, 1-1 Tsutsumidori, Anemiyama, Aoba, Sendai 981-8555, Japan*

S. Hayashi

Laser Technology Laboratory, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako 351-0198, Japan

A. Hayashi and C. Otani

Terahertz-wave Research Program, RIKEN, 519-1399 Aoba, Aramaki, Aoba, Sendai 980-0845, Japan

E. Kato

Advantest Laboratories, Ltd., 48-2 Matsubara, Kamiyashi, Aoba, Sendai 989-3124, Japan

F. Miyamaru

Faculty of Science, Shinshu University, 3-1-1 Asahi, Matsumoto, Nagano 390-8621, Japan

K. Kawase

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

(Received 3 August 2007; accepted 27 November 2007; published online 18 December 2007)

A label-free biological sensor, which is based on the resonant transmission phenomenon of a thin metallic mesh, is proposed in the terahertz wave region. By using this sensor, we demonstrate the highly sensitive detection of small amounts of protein horseradish peroxidase. For quantitative investigation of the sensitivity of our sensor, horseradish peroxidase was printed on the metallic mesh surface by using a commercial available printer. A distinct shift of the transmission dip frequency is observed for 500 pg/mm² (11 fmol) of horseradish peroxidase printed on the metallic mesh, indicating the significantly high sensitivity of our sensor. © 2007 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.2825411]

In the past two decades, terahertz waves, located in the frequency region between the microwaves and the infrared, have found an increasing number of applications in various fields of research.¹⁻³ Especially, terahertz technology has a broad applicability in the biomedical context because the collective vibration modes of many protein and DNA molecules are predicted to occur in the terahertz range.^{4,5} The refractive index and absorption coefficients of single-stranded DNA and double-stranded DNA are different from each other in the terahertz region, indicating distinguishable characteristics.⁶ Reports have also been published on the avidin-biotin complex⁷ and the imaging of artificial RNA.⁸ These studies have revealed the potential applications of label-free sensings for many biomedical molecules by using the terahertz waves. In biomedicine, label substrates, which might involve fluorescence, an enzyme reaction, or a radioisotope are used for the detection of proteins. However, these procedures are complex and take a lot of time. The label-free detection with terahertz waves is a convenient technique in biomedicine, which enables us to realize easier and faster medical and food inspections than other techniques.

In this paper, we propose a label-free sensing method using a thin metallic mesh in the terahertz region. The transmission characteristics of thin metallic meshes, investigated since the 1960s,^{9,10} are those of a band-pass filter in the far-infrared region. This is due to the resonant transmission caused by an excitation of surface plasmon polaritons¹¹ (SPPs). The transmission properties of a thin metallic mesh are determined mainly by its geometric parameters, but, when a material is placed near the mesh openings, are also

affected by the refractive index of that material, in the sense that a shift of the resonant transmission frequency occurs.^{12,13} Our sensing method is based on the change of the transmittance of terahertz radiation through a thin metallic mesh accompanied by the resonant frequency shift when a sample substance is applied on the mesh openings. The transmittance of the thin metallic mesh does not change due to the absorption, but dominantly due to the variation of the refractive index of the sample substances near the openings.¹⁴ Using this thin metallic mesh sensor, we detected the protein horseradish peroxidase, which is an oxidation/reduction enzyme existing in many organisms and is typically used as an indicator in biochemical reactions. The horseradish peroxidase is one of the most widespread label substrates in biomedicine.

In our experiment, the thin metallic mesh was made from electroformed nickel, allowing the fabrication of a smooth surface and precise periodicity of the grating. The two dimensional square metallic mesh was 6 μm thick with a grating period of 76.3 μm and a metallic linewidth of 18.3 μm, in both dimensions. This metallic mesh behaves as a high-pass filter and the peak transmission is approximately 95% at 3.37 THz. We measured the transmission spectra of a thin metallic mesh using a Fourier transform infrared spectrometer (FARIS-1S; JASCO, Japan), in which the terahertz beam was focused into an area of about 7 mm in diameter on the thin metallic mesh (Fig. 1). We used the protein horseradish peroxidase (Nacalai Tesque) as a sample, by dissolving it in sterilized pure water at the concentrations of 1.0, 0.5, 0.25, and 0.125 mg/ml. These enzyme solutions were spread on the thin metallic mesh. For a quantitative investigation of the sensitivity of the metallic mesh sensor, the accurate spreading of sample substances on the sensor is criti-

^{a)}Electronic mail: yoshida_h@bios.tohoku.ac.jp. Tel./FAX: +81-22-717-8946.

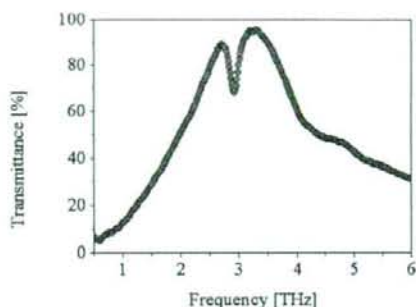


FIG. 1. Measured transmission spectrum of a thin metallic mesh with a grating period of $76.3 \mu\text{m}$ and a metallic linewidth of $18.3 \mu\text{m}$.

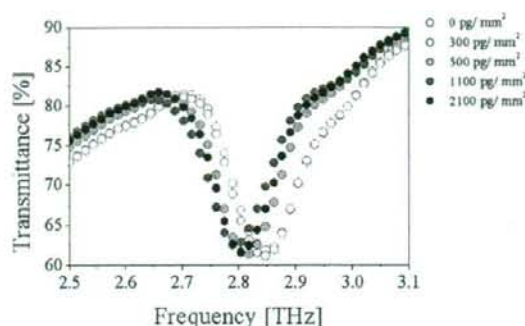
cally important. We printed horseradish peroxidase on the metallic meshes using a commercial inkjet printer (Pixus 860i; Canon, Tokyo, Japan), the same that was previously used to fix DNA on a chip.¹⁵ The amount of the sample was controlled using an image processing software. By using the inkjet printer, a considerably small amount of sample can be spread on various materials more readily than with other printing systems.

Figure 1 shows the transmission spectrum of the thin metallic mesh. The broad transmission peak is observed at 3.37 THz and the peak transmittance exceeds the fraction of a mesh opening. This resonant transmission phenomenon is derived from the resonant excitation of SPPs. The resonant frequency of the SPP is expressed as

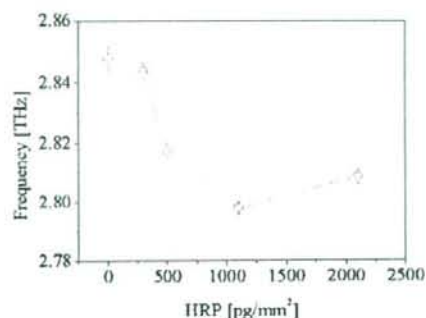
$$f_{\text{SPP}} = |\mathbf{k}_{\text{in}} + \mathbf{G}| \frac{c}{2\pi} \left(\frac{\epsilon_m + \epsilon_d}{\epsilon_m \epsilon_d} \right)^{1/2}, \quad (1)$$

where \mathbf{k}_{in} is the in-plane wave-vector of the incident terahertz wave, \mathbf{G} is the reciprocal lattice vector of the periodic structure, and ϵ_m and ϵ_d are the dielectric constants of the metal and the interface medium. The discrepancy between the observed peak frequency (3.37 THz) and the resonant frequency of SPPs (3.93 THz) expected from the Eq. (1) is attributed to the Fano-like interference effect between the terahertz waves transmitted directly through metal openings and reemitted from the SPPs excited on the metal surface.^{16,17} In Fano's original study, he investigated the situation of the interference between two contributions, a non-resonant continuum state and a resonant discrete one. For the problem of transmission of terahertz wave through metal mesh, the former corresponds to the directly transmitted terahertz wave and later corresponds to the reemitted terahertz wave from SPPs. This Fano-like interference leads to the asymmetric spectral shape around the resonant frequency and, consequently, the redshift of the transmission peak with respect to the SPP resonant frequency.

When we used collimated incident terahertz waves, this transmission dip is not observed at normal incidence while it is observed at oblique incidences (not shown). In addition, the transmission dip frequency shows the incident angle dependence. From these results, the observed transmission dip arises as a result of the transmission peak splitting for oblique incidence. For the square lattice structured surface, the first order SPP mode splits into two modes analogous to photonic band modes in photonic crystals.^{18,19} In this case, the spectral dip is possibly observed between transmission



(a)



(b)

FIG. 2. (Color online) (a) Measured transmission spectra of a thin metallic mesh with various concentrations of horseradish peroxidase. (b) The transmission dip frequency as a function of the horseradish peroxidase concentration.

peaks of these two modes. For the focused incident beam, like our experiment, the component of oblique incident terahertz wave involved and, thus, the transmission dip appears as the integral of the contributions from several oblique components. Since the resonant frequencies of the transmission peak and dip strongly depend on the refractive index in the vicinity of the metallic mesh openings, the extremely small amount of the sample substances can be detected by monitoring the position of the transmission peak and/or dip.

Figure 2(a) shows the measured transmission spectra of the thin metallic mesh with various amounts of peroxidase printed on it. We present the transmission spectra only in the frequency range around the transmission dip observed in Fig. 2. The transmission dip frequency shows a tendency to decrease with increasing the amount of sprayed peroxidase. The transmission dip frequency, which is estimated from the fitting of the measured spectrum with a Lorentz function, is plotted in Fig. 2(b) as a function of the amount of peroxidase. A clear frequency shift of the transmission dip is observed for 500–2100 pg/mm^2 horseradish peroxidase with respect to that of the bare metallic mesh (0 pg/mm^2). This result indicates that the sensing with thin metallic meshes is extremely sensitive for the detection of very small amounts of biomolecules, equal to the sensitivity of the conventional method using an antibody labeled horseradish peroxidase. Nagle *et al.* reported the detection of the femtomole order of

DNA by using a coplanar waveguide with a resonant structure²⁰ and at functionalized electrodes via hybridization in the terahertz region.²¹ Our thin metallic mesh sensing can detect proteins in the order of femtomole, which should allow the application of our sensor to protein detection in biomedicine.

The peak frequency basically shifts to the lower frequency side with increasing the volume of the horseradish peroxidase in the range from 300 to 2100 pg/mm². The peak frequency for 2100 pg/mm², however, returns slightly to the higher frequency with respect to that for 1100 pg/mm². This result is due to the inhomogeneous spreading of the horseradish peroxidase on the metallic mesh in our printing system. More precise spreading can help to avoid this ambiguity in the detection of the frequency shift.

The transmittance at the dip frequency changes only slightly with the volume of the horseradish peroxidase. This indicates that the absorption of the terahertz wave by the sample substances plays a minor role for the variation of the transmission spectrum. Such a small variation of the transmittance makes it difficult to detect the sample substances by monitoring the transmission intensity at a single frequency.

In conclusion, we demonstrated the highly sensitive detection of protein molecules in amounts in the femtomole order by using a thin metallic mesh sensor. For spreading the extremely small amount of sample substances on the metallic mesh sensor, we used a commercially available printer with which horseradish peroxidase could be printed. For the metallic mesh sensor printed with 500 pg/mm² (11 fmol) horseradish peroxidase, a redshift of the transmission dip frequency is observed clearly, which is based on the variation of the refractive index in the vicinity of the metallic mesh openings. This result exceeds the detection limit of conventional terahertz spectroscopy for protein molecules. As a next challenge, we aim to achieve a label-free selective detection of proteins by using an antigen/antibody reaction.

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Young Scientists (18070501) from The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

- ¹M. Tonouchi, *Nat. Photonics* **1**, 97 (2007).
- ²B. Ferguson and X.-C. Zhang, *Nat. Mater.* **1**, 26 (2002).
- ³A. Dobroiu, R. Beigang, C. Otani, and K. Kawase, *Appl. Phys. Lett.* **86**, 261107 (2005).
- ⁴A. Markelz, S. Whitmore, J. Hillebrecht, and R. Birge, *Phys. Med. Biol.* **49**, 3798 (2002).
- ⁵B. M. Fischer, M. Walther, and P. U. Jepsen, *Phys. Med. Biol.* **47**, 3807 (2002).
- ⁶M. Nagle, P. Haring Bolivar, M. Brucherseifer, and H. Kruz, *Appl. Phys. Lett.* **80**, 154 (2002).
- ⁷S. P. Mickan, A. Menikh, H. Liu, C. A. Mannella, R. MacColl, D. Abbott, A. Munch, and X.-C. Zhang, *Phys. Med. Biol.* **47**, 3789 (2002).
- ⁸B. M. Fischer, M. Hoffman, H. Helm, R. Wilk, F. Rutz, T. Klein-Ostmann, M. Koch, and P. U. Jepsen, *Opt. Express* **13**, 5205 (2005).
- ⁹R. Ulrich, *Infrared Phys.* **7**, 37 (1967).
- ¹⁰K. Sakai, T. Fukui, Y. Tsunawaki, and H. Yoshinaga, *Jpn. J. Appl. Phys., Part 1* **8**, 1046 (1969).
- ¹¹H. Raether, *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings* (Springer, Berlin, 1988).
- ¹²F. Miyamaru and M. Hangyo, *Appl. Phys. Lett.* **84**, 2742 (2004).
- ¹³H. Cao and A. Nahata, *Opt. Express* **12**, 1004 (2004).
- ¹⁴F. Miyamaru, S. Hayashi, C. Otani, K. Kawase, Y. Ogawa, H. Yoshida, and E. Kato, *Opt. Lett.* **31**, 1118 (2006).
- ¹⁵T. Okamoto, T. Suzuki, and N. Yamamoto, *Nat. Biotechnol.* **18**, 438 (2000).
- ¹⁶L. Martín-Moreno, F. J. García-Vidal, H. J. Lezec, K. M. Pellerin, T. Thio, J. B. Pendry, and T. W. Ebbesen, *Phys. Rev. Lett.* **86**, 1114 (2001).
- ¹⁷E. Popov, M. Neviere, S. Enoch, and R. Reinisch, *Phys. Rev. B* **62**, 16100 (2000).
- ¹⁸J. D. Joannopoulos, R. D. Meade, and J. N. Winn, *Photonic Crystal* (Princeton University Press, Princeton, 1995).
- ¹⁹H. F. Ghaemi, T. Thio, D. E. Grupp, T. W. Ebbesen, and H. J. Lezec, *Phys. Rev. B* **58**, 6779 (1998).
- ²⁰M. Nagle, P. H. Bolivar, M. Brucherseifer, and H. Kruz, *Appl. Phys. Lett.* **80**, 154 (2002).
- ²¹M. Nagle, F. Richter, P. H. Bolivar, and H. Kruz, *Phys. Med. Biol.* **48**, 3625 (2003).

テラヘルツ波による生体高分子の非標識検出

小川 雄一^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す

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

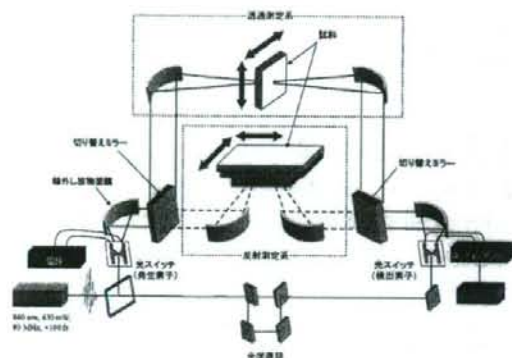


図1 THz-TDS イメージング装置実験系

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ため空気から 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 波の損失はほぼ 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。

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付着、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

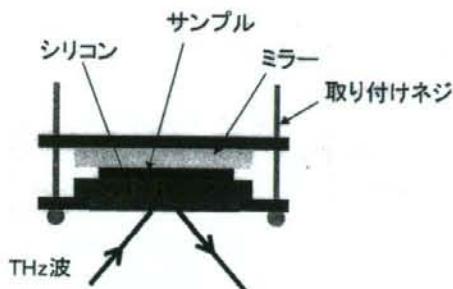


図2 反射測定系でのサンプル台模式図

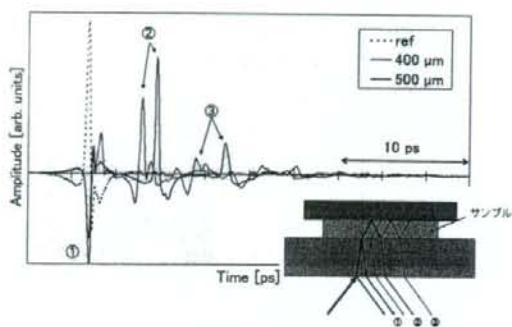


図3 サンプル上面にミラーを配置した際の THz-TDS による時間波形

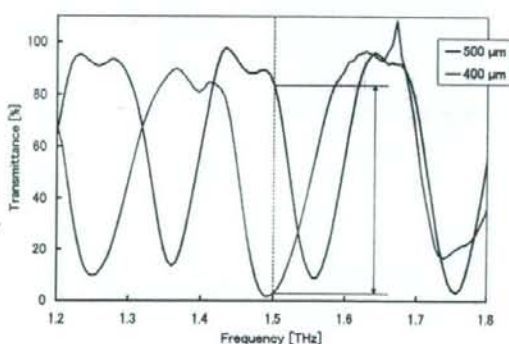


図4 フーリエ変換後の透過率 (破線部は1.5 THzを示す)

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

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^{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、原理確認実験に通じている。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

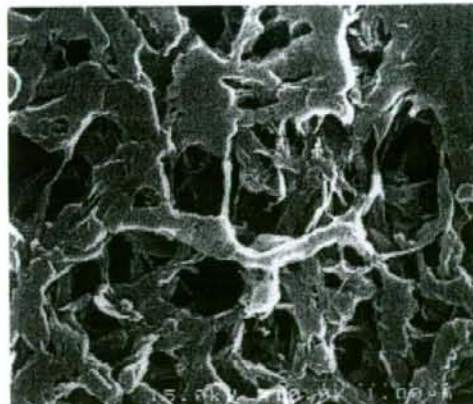


図5 PVDFメンブレンのSEM画像 (×10,000)

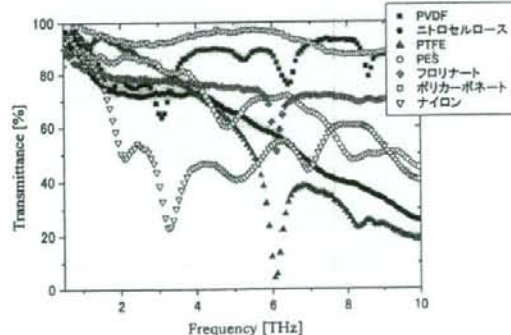


図6 各種メンブレンフィルターの透過特性

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	ポリビニリデンプロライド	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 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	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

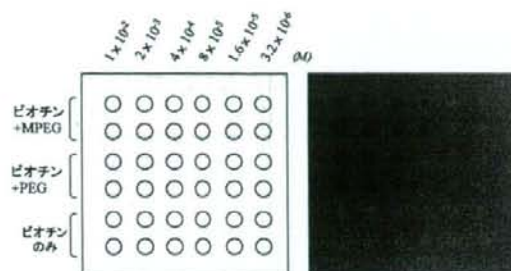


図7 ビオチンメンブレンアレイの模式図 (左) と蛍光検出画像 (右)

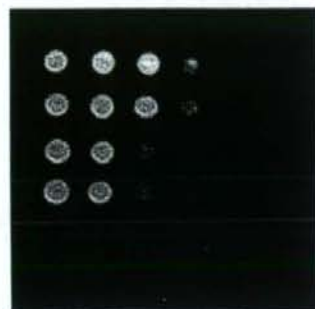


図8 ビオチンメンブレンアレイ上のストレプトアビジンの検出画像

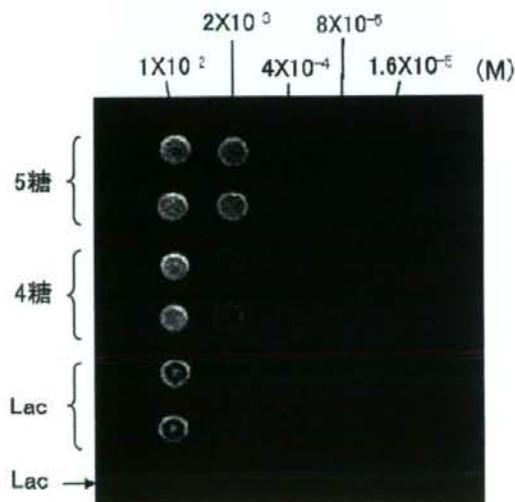


図9 糖鎖メンブレンアレイ上のレクチンの検出画像

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