

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

筆者らは、本手法を進展させた低分子化合物のメンブレイによる非標識検査は、創薬分野において候補物質を迅速に探査するスクリーニング技術になりうると期待している。スクリーニングとして本手法を導入し、既知の候補物質アレイと未知のタンパク質群（混合物）とを反応、画像化する。その結果、結合が見つかったその部分を切り出し、質量分析などを利用して結合したタンパク質の構造を詳細に調べることが可能となる。こういった利用法は、従来の標識化が困難な物質や、生体から抽出した混合物の状態のタンパク質群の分析に適していると考えられる。

### 3. 金属メッシュを用いたセンシング

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

#### 3.1 実験装置

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

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

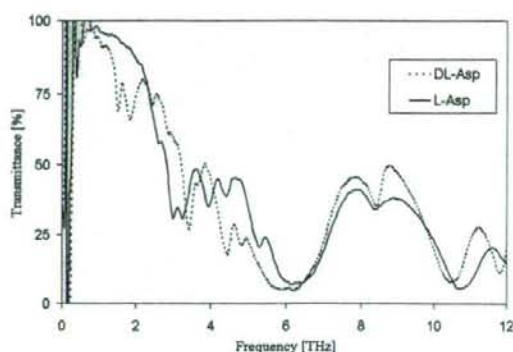


図10 FTIRによる2種類のアスパラギン酸の透過スペクトル

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

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

#### 3.2 金属メッシュの原理

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

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

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

平坦な金属表面におけるSPPの分散関係は、金属の誘電率  $\epsilon_1$ 、金属に接する物質の誘電率を  $\epsilon_2$  とすると、

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

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

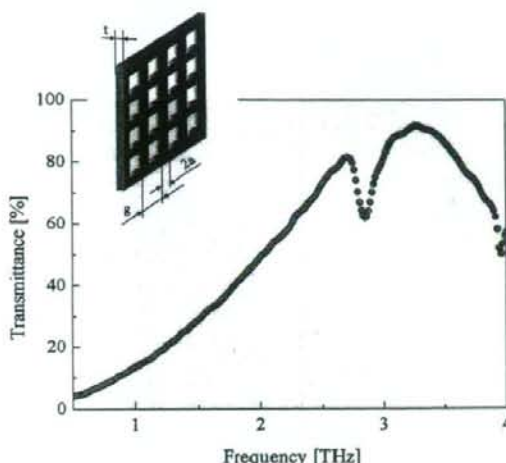


図11 金属メッシュの透過スペクトル

透過領域に相当し、 $\epsilon_2$  の値に応じて、共鳴周波数は低周波側にシフトする。このことを利用し、サブテラヘルツ領域で三角格子配列の円形開口金属アレイを利用した微量センシングといった応用も報告されている<sup>29)</sup>。また、図11に示す透過特性の2.8 THzに見られる共鳴的なディップ構造は、金属メッシュに対する斜入射成分によって生じるものである。その発生のメカニズムの詳細は明らかになっていないものの、平行光束を金属メッシュに対して斜めから入射すると、このような共鳴的なディップが生じることは既に知られている<sup>30)</sup>。今回、前節で説明した分光器はサンプルの前段に  $f=101.6 \text{ mm}$  の放物面鏡を用いており、サンプルに対して集光光学系となっている。そのため、常に金属メッシュには斜入射する成分が存在し、それらの足し合わせとなって、このようなディップ構造が観測されると考えられる。しかも、このディップは先の誘電率  $\epsilon_2$  の変化によってバンドパス特性のシフトと共に低周波側にシフトするため、ディップ周波数を観測することでセンシングが可能となる。

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

### 3.3 生体高分子の非標識検出

#### 3.3.1 サンプル調製および実験方法

金属メッシュの評価を行うには、金属メッシュに対して定量的なサンプル塗布技術が必要となる。そこで本実験では、一般に市販されているインクジェット方式のプリンタ (Canon PIXUS860i) を使用し、画像処理ソフトで画面上の描画濃度を調整することでプリンタの吐出量を調整した。

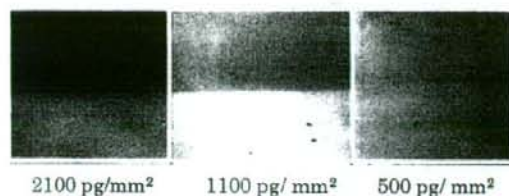


図12 発色実験の結果

サンプルには標識酵素として広く使われているペルオキシダーゼというタンパク質を用いた。今回使用したインクジェット方式のプリンタは、インクをプリンタヘッドから吐出する際に瞬間的に加熱し、その気泡によりインクを押し出す方式である。したがって、この方式のプリンタをサンプル塗布方法として導入する際、熱によるタンパク質の変性による失活が懸念される。そこでまず予備実験として、滅菌蒸留水にてペルオキシダーゼ（ナカライテスク凍結乾燥粉末）を濃度2.0 mg/ml, 1.0 mg/ml, 0.5 mg/mlに調製後プリンタにて塗布を行い、染色法により熱影響を確認した。なお、各濃度は単位面積当たりに換算すると、濃い方から順に2100 pg/mm<sup>2</sup>, 1100 pg/mm<sup>2</sup>, 500 pg/mm<sup>2</sup>に相当する。以下、ここでは単位面積当たりの質量で表記することとする。ペルオキシダーゼは疎水中の溶媒中では125~150°Cで熱失活<sup>31)</sup>、またリン酸緩衝液中では70~95°Cで酵素活性が報告されているため、加熱の影響が大きければ失活し発色しないことが予想される。プリンタへのサンプルの供給には、通常使用するインクタンクを外して取り付けた、プラスチックチューブを介してペルオキシダーゼ水溶液をプリンタヘッドに供給した。印刷媒体には、タンパク質の転写に使用されるニトロセルロースメンブレン（BIO-RAD Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane (0.2 μm)）を用い、プリンタを使ってペルオキシダーゼの印刷を行った。さらにこれらを過酸化水素と1-クロロ-4-ナフトール溶液（BIO-RAD Immun-Blot Assay Kit）に浸し、発色を検出することで酵素活性への影響を確認した。

図12に発色実験の結果を示す。図中左から順に濃度が2100 pg/mm<sup>2</sup>, 1100 pg/mm<sup>2</sup>, 500 pg/mm<sup>2</sup>の印刷されたペルオキシダーゼの発色結果で、各写真の上段が印刷した部位、下段が印刷していない部位を示している。実験の結果、3段階の濃度いずれも発色反応を確認することができ、吐出時の熱はタンパク質の活性を失うほど大きな影響を与えないことが分かった。この結果を踏まえて、同様に2100 pg/mm<sup>2</sup>, 1100 pg/mm<sup>2</sup>, 500 pg/mm<sup>2</sup>, 300 pg/mm<sup>2</sup>の濃度に調製したペルオキシダーゼ水溶液を金属メッシュ（ $g=76.3 \mu\text{m}$ ,  $t=6 \mu\text{m}$ ,  $a=9.15 \mu\text{m}$ ）に印刷し、分光器にて透過スペクトルの変化からペルオキシダーゼの検出を行った。

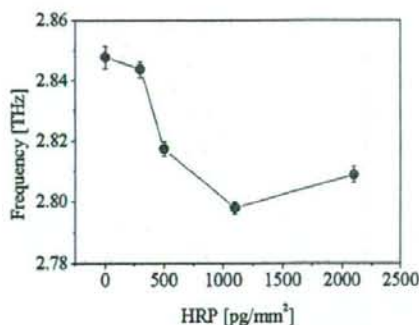
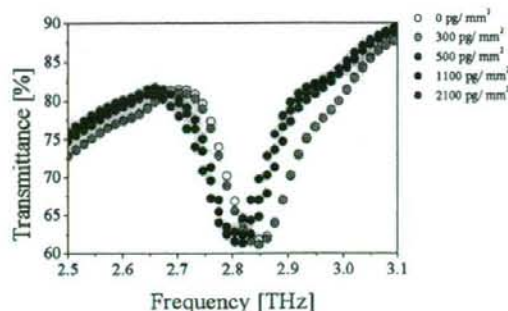


図13 ペルオキシダーゼ塗布による透過特性のシフト（上段：ディップ部拡大図、下段：塗布量に伴うディップ周波数のシフト）

### 3.3.2 実験結果<sup>32)</sup>

図13にペルオキシダーゼを印刷した金属メッシュの透過スペクトルのディップ周波数部の拡大図を示す。3.2章で述べたように、金属メッシュ上にペルオキシダーゼを塗布すると、金属メッシュ近傍の誘電率の変化に伴い、金属メッシュのバンドパス特性は低周波側にシフトが観測された。本実験では、特にディップ周波数のシフトを観測することで、定量的な塗布によるシフトを観測した。また、図中下段の図はペルオキシダーゼの量とディップの周波数の関係を示しており、4段階のいずれの濃度においても、金属メッシュ単体（HRP 0.0 pg/mm<sup>2</sup>）と比較して透過特性の低周波側へのシフトが確認できた。ただし、サンプル濃度2100 pg/mm<sup>2</sup>においては、高周波側にシフトする傾向が確認された。この原因は、プリンタによる塗布量の多い量では印刷直後に近接の液滴が表面張力によって集まり、不均一な塗布になってしまったためと考えられた。しかし、500 pg/mm<sup>2</sup>から金属メッシュのシフトを観測することが出来ており、この濃度はペルオキシダーゼの分子量から換算すると11 fmolに相当する量の検出を行うことが出来た。

## 3.4 メンブレンを用いた非標識相互作用検出

### 3.4.1 サンプル調製および実験方法

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

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

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

#### 3.4.2 実験結果

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

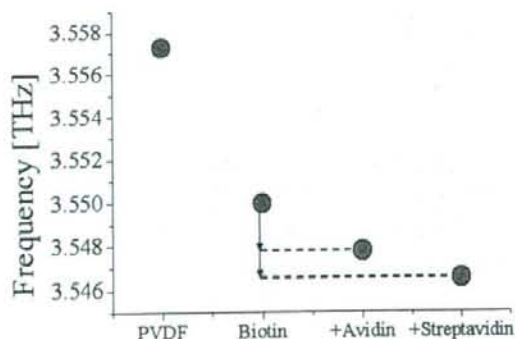


図14 各反応段階におけるディップ部の周波数

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

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

#### 4. おわりに

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

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

#### 参考文献

- 1) B. B. Hu and M. C. Nuss: *Opt. Lett.* **20**, 1716 (1995).
- 2) V. P. Wallace, P. F. Taday, A. J. Fitzgerald, R. M. Woodward, J. Cluff, R. J. Pye, and D. D. Arnone: *The Royal Society of Chemistry* **126**, 255 (2003).

- 3 D. M. Mittleman, R. H. Jacobsen, and M. C. Nuss: IEEE J. Quantum Electron, 2, 679 (1996).
- 4 M. Brucherseifer, M. Nagel, P. H. Bolivar, H. Kurz, A. Bosserhoff, and R. Buttner: Appl. Phys. Lett. 77, 4049 (2000).
- 5 K. Kawase, Y. Ogawa, Y. Watanabe, and H. Inoue: Opt. Express 11, 2549 (2003).
- 6 S. P. Mickan, A. Menikh, H. Liu, C. A. Mannella, R. MacColl, D. Abbott, J. Munch, and X.-C. Zhang: Phys. Med. Biol. 47, 3789 (2002).
- 7 B. Ferguson and X.-C. Zhang: Nature materials 1, 26 (2002).
- 8 G. Walsh: タンパク質ハンドブック (Maruzen and Wiley, 東京, 2003).
- 9 C. K. O'Sullivan and G. G. Guilbault: Biosensors Bioelectron. 14, 663 (1999).
- 10 J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz: Sensors and Actuators B 54, 3 (1999).
- 11 S. Nakajima, H. Hoshina, M. Yamashita, C. Otani, and N. Miyoshi: Appl. Phys. Lett. 90, 041102 (2007).
- 12 D. Grischkowsky, S. Keiding, M. van Exter, and C. Fattinger: J. Opt. Soc. Am. B 7, 2006 (1990).
- 13 阪井清美: 分光研究 50, 261 (2001).
- 14 H. Yoneyama, M. Yamashita, S. Kasai, K. Kawase, H. Ito, and T. Ouchi: Opt. Comm. 281, 1909 (2008).
- 15 M. Oikawa, M. Ikoma, and M. Sasaki: Tetrahedron Lett. 45, 2371 (2004).
- 16 M. Oikawa, Y. Takeda, and M. Sasaki: Tetrahedron Lett. 46, 4667 (2005).
- 17 田隅三生編: FT-IRの基礎と実際 (東京化学同人, 東京, 1994).
- 18 C. C. Homes, G. L. Carr, R. P. S. M. Lobo, J. D. LaVeigne, and D. B. Tanner: Appl. Opt. 46, 7884 (2007).
- 19 W. CULSHAW: IEEE Trans. Microw. Theory Tech., MTT-7, 221 (1959).
- 20 K. F. Renk and L. Genzel: Appl. Opt. 1, 643 (1962).
- 21 P. VOGEL and L. GENZEL: Infrared Phys. 4, 257 (1964).
- 22 R. ULRICH: Infrared Phys. 7, 37 (1967).
- 23 A. Mitsuiishi, Y. Otuka, S. Fujita, and H. Yoshinaga: J. J. Appl. Phys. 2, 574 (1963).
- 24 K. Sakai, T. Fukui, Y. Tsunawaki, and H. Yoshinaga: J. J. Appl. Phys. 8, 1046 (1969).
- 25 T. W. Ebbesen L. J. Lezec, H. F. Ghaemi, T. Thio, and P. A. Wolff: Nature 391, 667 (1998).
- 26 H. Reather: Surface Plasmons on smooth and Rough Surface and on Gratings (Springer-Verlag, Berlin, 1988).
- 27 宮丸文章, 近藤孝志, 長島 健, 萩行正憲: 電学論 A, 123, 995 (2003).
- 28 F. Miyamaru and M. Hangyo: Appl. Phys. Lett. 84, 2742 (2004).
- 29 F. Miyamaru, S. Hayashi, C. Otani, K. Kawase, Y. Ogawa, H. Yoshida, and E. Kato: Opt. Lett. 31, 1118 (2006).
- 30 J. M. Lamarre, N. Coron, R. Courtin, G. Dambier, and M. Charra: Int. J. Infrared and Millimeter Waves, 2, 273 (1981).
- 31 J. Saraiva, J. C. Oliveira, S. Oliveira, and M. Hendrickx: International Journal of Food Science and Technology 31, 233 (1996).
- 32 H. Yoshida, Y. Ogawa, Y. Kawai, S. Hayashi, A. Hayashi, C. Otani, E. Kato, F. Miyamaru, and K. Kawase: Appl. Phys. Lett. 91, 253901 (2007).

## PROFILE



小川雄一 東北大学大学院 農学研究科 准教授  
博士 (農学)

[略歴] 1997年, 岡山大学院農学研究科地域環境農学専攻修了。ヤンマー農機中央研究所, 理化学研究所基盤技術開発室研究協力員, 同所川瀬独立主幹研究ユニット研究員, 東北大学大学院農学研究科助手を経て, 2005年東北大学大学院農学研究科助教授。2007年より現職 (職階制度の変更に伴い)。  
[専門] 農業工学, 食品工学, テラヘルツ生物学, 応用光学



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

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

Yuichi Ogawa,<sup>1,\*</sup> Shin'ichiro Hayashi,<sup>2,1</sup>  
Masato Oikawa,<sup>1</sup> Chiko Otani,<sup>2</sup> and Kodo Kawase,<sup>4,2,1</sup>

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

<sup>2</sup>RIKEN SENDAI, 519-1399 Aramaki-aoba, Aoba, Sendai 980-0845, Japan

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

<sup>4</sup>EcoTopia Science Institute, Nagoya University, Furo-cho, Nagoya 464-8603, Japan

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

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

©2008 Optical Society of America

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

---

## References and links

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

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

## 1. Introduction

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

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

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

## 2. Materials and sample preparation

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

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

## 3. Experimental methods

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



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

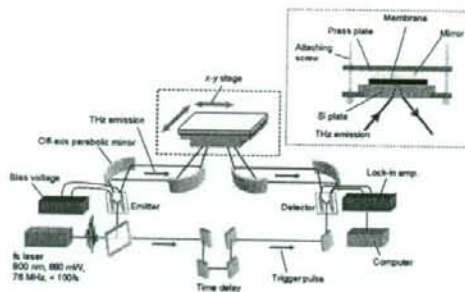


Fig. 1. Schematic diagram of the terahertz imaging system based on a THz-TDS. The inset shows a cross-section of the sample stage.

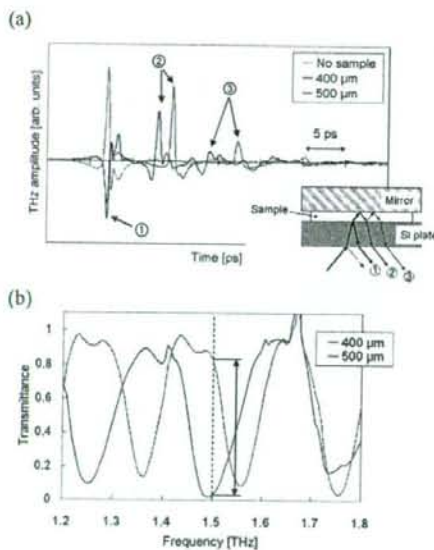


Fig. 2. Time-domain THz pulses obtained by measuring the difference signal between (a) no sample, 400  $\mu\text{m}$  and 500  $\mu\text{m}$  thickness of polyethylene; (b) frequency spectrum of the THz power. The inset on the upper figure (a) shows the schematic diagram of the reflected THz pulses.

#### 4. Result and discussion

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

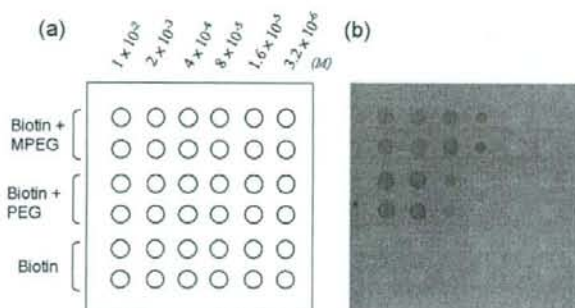


Fig. 3. (a) Schematic of the membrane with the array of samples and (b) scanner image ( $35 \times 35$  mm) of fluorescently-labeled streptavidin on membrane.

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

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

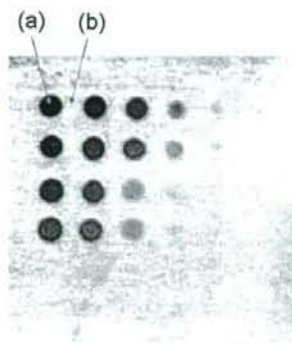


Fig. 4. THz image of the membrane at 1.5 THz. The image size is  $171 \times 171$  pixel and the spatial resolution is  $200 \mu\text{m}/\text{pixel}$ . The dark spots show the binding of biotin with the non-labeled streptavidin.

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

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

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

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

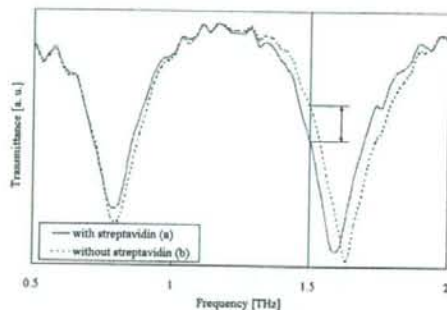


Fig. 5. Measured spectra of a membrane are without streptavidin (dashed curve) and with streptavidin (solid curve). The measurement points correspond to areas marked (a) and (b) in Fig. 4.

## 5. Conclusions

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

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

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

#### **Acknowledgments**

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

# 金属メッシュセンサによる牛乳中アレルギーのラベルフリー検出

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

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

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

### ABSTRACT

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

By using this technique, we demonstrated detecting interaction between a streptavidin - biotin, and  $\alpha$ -casein - anti  $\alpha$ -casein antibody on each membrane. The streptavidin - biotin interaction can be detected by 1.6 ~ 5.0 ng/mm<sup>2</sup> streptavidin. The possibility of detection that the  $\alpha$ -casein - anti  $\alpha$ -casein antibody interaction is shown in case of 9.0 ng/mm<sup>2</sup>  $\alpha$ -casein. These results indicate that our sensing system has enough sensitivity to detect allergen in food.

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

### 1. 緒言

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

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

近年、周波数 0.1~10 THz の遠赤外領域のテラヘルツ (THz)

波に見られる DNA やタンパク質などの巨大分子の低振動モードによる吸収や屈折率変化を利用したラベルフリー診断の可能性が報告されている<sup>40)</sup>。一方、1960年代から格子状の開口を有する金属製のメッシュを遠赤外領域のバンドパスフィルタとして用いた研究が行われ、様々なメッシュ形状や開口サイズを持った金属メッシュの周波数特性を明らかにすると共に、メタルメッシュエタロンとして利用した分光方法なども提案されている<sup>41)</sup>。このようなバンドパス特性は、金属メッシュの周期構造が入射する波長と同程度であるときに観測される現象であることから、この領域で利用するには数十から数百マイクロメートルであれば良く、簡便で安価な手法で金属メッシュを作ることが可能となる。そのため、これらを用いたこの領域の新しい光学素子やセンサの研究が行われている<sup>40-42)</sup>。金属メッシュのバンドパス特性は金属面近傍の複素屈折率の影響を受けて、透過スペクトルが低周波数側にシフトし、それによって透過率変化が金属メッシュを用いないときと比較して大きくなり、このことを利用した金属開口アレイによる高感度表面センサが提案されている。我々はこれまで金属メッシュによるメンブレン上のインクの検出<sup>11)</sup>及び金属メッシュによるペルオキシダーゼの検出<sup>12)</sup>について報告してきた。メンブレンは、タンパク質などの生体高分子を定着させる基材としてライフサイエンス分野では広く用いられているが、THz 波帯では高い透過性と低い屈折率を示す。そこで本研究ではラベルフリー検出を行うために THz 波を利用し、高感度化のために金属メッシュによる電場増強効果を使ったセンシング法を試みる。このセンシング法によって、特に牛乳などに含まれる食品アレルギーである  $\alpha$ -カゼイン抗体の検出を目指し、メンブレンを抗原抗体反応の基材として利用した金属メッシュによる非標識検出について報告する。

## 2. 金属メッシュの基礎特性

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

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

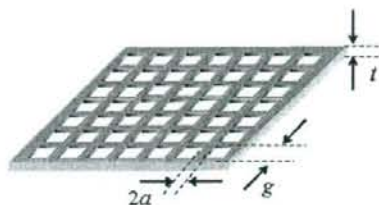


図 1 金属メッシュ

Fig. 1 Schematic of a metallic mesh

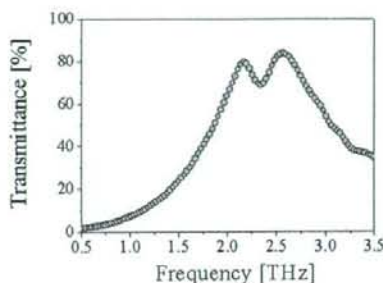


図 2 金属メッシュの透過スペクトル

Fig. 2 Transmission spectrum of the metallic mesh

<sup>14)</sup> 本研究ではこの報告と同じ正方形の開口の金属メッシュを使用しており、同様の電場増強分布であると考えられる。また、図に見られるように、異常透過のピーク付近で透過率が急激に減少するディップ（谷）がみられる。このようなディップは、古くから平行光束に対して金属メッシュを傾けた際に観測されることが知られており、今回透過測定に使用した分光器がサンプルに対して集光光束になっているため、その斜入射成分によって透過スペクトルに表れていると考えられる。金属メッシュ近傍の電場増強を利用してメンブレン上の抗原抗体反応を検出するためには、金属メッシュに対してメンブレンが十分に密着する必要がある。そこで本研究では、この金属メッシュをホルダに固定し、ホルダ側面から吸引ポンプを使用して減圧し、金属メッシュとメンブレンを密着させる方法を採用した。

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

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

### 3. 実験方法

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

ストレプトアビジン(60 kDa)は、ビオチン(M.W. 250)と強固で不可逆的な結合(解離定数 10<sup>-13</sup>~10<sup>-15</sup> M<sup>-1</sup>)を形成する<sup>16)</sup>。ビオチン標識ウシ血清アルブミン(BSA) (13 mol Biotin/mol BSA:コスモ・バイオ株式会社) 5 mg/ml 溶液 200 μl を直径 16 mm のニトロセルロースメンブレン (Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane 0.2 μm-Bio Rad) に塗布し、ビオチン標識 BSA を塗布したニトロセルロースメンブレンを乾いたペーパータオルに載せ 25 °C で 2 時間以上乾燥させた後、1 % BSA 溶液 (1 % Albumin bovine serum:SIGMA, 20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.5) の入ったビニルバック中で 25 °C、2 時間振とうし、ブロッキング処理を行った。次に、ストレプトアビジン(Streptavidin 60 kDa: Bio-Rad)とウサギ IgG 抗体をブロッキング溶液に加えて 25 °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 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.5) で 10 分間×3 回、蒸留水で 10 分間×3 回ビニルバック中で振とうして洗浄を行い、乾いた紙にはさみ 30 °C で 1 時間乾燥させた。

抗α-カゼイン抗体(IgG Anti-Alpha Casein Dry Freeze Powder in 0.01 M Phosphate Buffer Saline pH 7.4:Abkern Iberia S.L.)を直径 16 mm のニトロセルロースメンブレン (Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane 0.2 μm) 上に塗布し、25 °C で 2 時間乾燥させた後 1 % BSA (Albumin bovine serum, powder: SIGMA) 水溶液 (1 % BSA 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) を含むブロッキング溶液中にα-カゼイン (α-Casein from bovine milk α-casein minimum 70 %:SIGMA) を加え、更に 25 °C で 2 時間振とうし、その後 TTBS 緩衝液 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.5) で 10 分間×3 回、蒸留水で 10 分間×3 回ビニルバック中で振とうして洗浄を行い、乾いた紙にはさみ 30 °C で 1 時間乾燥させた。また、比較のため、抗α-カゼイン抗体を反応させずに同様の処理を行ったメンブレンサンプルを用意した。これらの各サンプルを、それぞれ金属メッシュ上で吸引ポンプにより密着させ、分光器にて透過測定を行った。

### 4. 結果

図 3(a)に、金属メッシュセンサを利用した場合の、タンパク質を塗布したニトロセルロースメンブレンの透過スペクトルを示す。本研究の測定法は単位面積あたりのサンプル量に依存するため、図中のストレプトアビジン量及びウサギ IgG 抗体量は、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

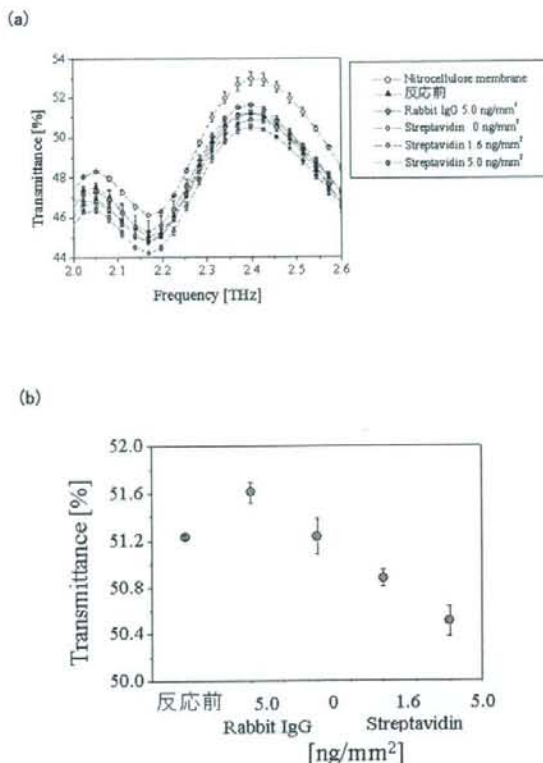


図 3 ストレプトアビジン-ビオチン反応による変化 (a)透過スペクトルの変化 (b)透過率の変化

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

様に山型を示し、ニトロセルロースメンブレンのみの場合と比較してビオチン標識 BSA の塗布および 1 % BSA 溶液によるブロッキング処理により固定されたタンパク質等の吸収によって透過率が全体的に低下する様子が観測された。透過スペクトルのサンプル依存性を詳細に調べるために、図 3(b)に、図 3(a)の透過スペクトルについて多項式による近似曲線から透過率のピークを求め、透過率のサンプル依存性を示す。ここで、反応前とは、ビオチン標識 BSA を塗布し、ブロッキング処理のみを行った試料のことである。反応前と比較して、ビオチンとは反応しないウサギの IgG 抗体 5.0 ng/mm<sup>2</sup>およびストレプトアビジン 0 ng/mm<sup>2</sup>では透過率低下は見られないが、ストレプトアビジン 1.6、5.0 ng/mm<sup>2</sup>についてはストレプトアビジン量が増加するにつれて透過率の単調な減少が観測された。また、これまでの実験において、反応するビオチン量を低下させると、本実験と同程度のストレプトアビジンを反応させても透過率の低下が観測されないことから、本実験におけるストレプトアビジンにおける透過率の低下は反応の結果であると考えられる。この検出感度は我々が目指す食品アレルギーの検出に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 4 に、図 3(b)と同様に抗α-カゼイン抗体とα-カゼインによる抗原抗体反応における透過率変化を示す。ここで、反応

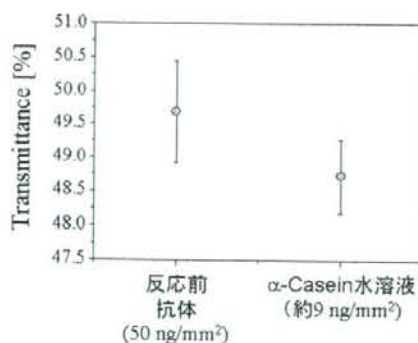


図4 抗原抗体反応による透過率変化

Fig. 4 Change of the transmittance by  $\alpha$ -casein - anti  $\alpha$ -casein antibody interaction

前とは抗 $\alpha$ -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 $\alpha$ -カゼイン抗体量は  $50 \text{ ng/mm}^2$ 、反応した $\alpha$ -カゼイン量は抗体量から見積もって約  $9 \text{ ng/mm}^2$  である。反応前と比較して、 $\alpha$ -カゼインとの反応後に透過率の低下が観察された。ストレプトアビジン-ビオチン反応と同様に、抗原抗体反応においても  $\text{ng/mm}^2$  オーダーのタンパク質量の検出の可能性が示された。

## 5. まとめ

本研究では金属メッシュとニトロセルロースメンブレンを組み合わせた新しいラベルフリーセンシング法について提案した。本研究のセンシング法は、THz 波帯には生体高分子の高次構造に起因する吸収が存在し、ラベルフリー検出が可能であるという報告を元に、更にセンサとして金属メッシュとメンブレンを用いることで、メンブレン上のストレプトアビジン-ビオチン反応においては  $1.6 \sim 5.0 \text{ ng/mm}^2$  のストレプトアビジンの検出に成功し、抗原抗体反応においては約  $9 \text{ ng/mm}^2$  の $\alpha$ -カゼインの高感度検出の可能性も示された。このことはメンブレン上で行われるその他の様々な反応についても応用可能な汎用性の高さを示している。またメンブレンは赤外領域などでは不透明と見なされることから、本研究の透過測定によるセンシング法は THz 波帯の利用において初めて実現可能であるといえる。さらに THz 波は波長が  $3 \text{ mm} \sim 30 \mu\text{m}$  であることから、波長相当の開口幅をもつ金属メッシュの作製が比較的容易であることから、金属メッシュの改良による更なる高感度化が望めるという利点がある。今後は、各反応における解離定数などの反応性の違いやメンブレンとの結合性について検討することで、高感度化をはかるとともに、実際に食品中のアレルゲンについて検出を行う予定である。

## 謝辞

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

## 参考文献

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



## マイクロチップレーザー励起によるポータブル波長可変テラヘルツ光源

林伸一郎<sup>1,2</sup>, 渋谷孝幸<sup>1,3</sup>, 酒井博<sup>4</sup>, 安井孝成<sup>5</sup>, 平等拓範<sup>6</sup>, 小川雄一<sup>2</sup>, 大谷知行<sup>1</sup>, 川瀬晃道<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>理化学研究所 (〒980-0845 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉519-1399)

<sup>2</sup>東北大学 (〒981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町1-1)

<sup>3</sup>名古屋大学 (〒464-8603 愛知県名古屋市千種区不老町)

<sup>4</sup>浜松ホトニクス (〒434-8601 静岡県浜松市浜北区平口5000)

<sup>5</sup>長岡科学技術大学 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

<sup>6</sup>分子科学研究所 (〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38)

### Portable and Tunable Terahertz-Wave Parametric Generator Pumped by Microchip Nd:YAG Laser

Shin'ichiro HAYASHI,<sup>1,2</sup> Takayuki SHIBUYA,<sup>1,3</sup> Hiroshi SAKAI,<sup>4</sup> Takanari YASUI,<sup>5</sup>  
Takunori TAIRA,<sup>6</sup> Yuichi OGAWA,<sup>2</sup> Chiko OTANI,<sup>1</sup> and Kodo KAWASE<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>RIKEN, 519-1399 Aramaki-cho, Aoba, Sendai, Miyagi 980-0845

<sup>2</sup>Tohoku University, 1-1 Tsutsumidori Amamiyamachi, Aoba, Sendai, Miyagi 981-8555

<sup>3</sup>Nagoya University, Furo-cho, Chikusa, Nagoya, Aichi, 464-8603

<sup>4</sup>Hamamatsu Photonics K. K., 5000 Hiraoguchi, Hamakita, Hamamatsu, Shizuoka 434-8601

<sup>5</sup>Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomiokacho, Nagaoka, Niigata 940-2188

<sup>6</sup>Institute for Molecular Science, 38 Nishigo-Naka, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8585

(Received December 4, 2008)

We have developed a terahertz wave parametric source using MgO:LiNbO<sub>3</sub> pumped by a sub-nanosecond, passively Q-switched, microchip Nd:YAG laser. This pump source allows high intensity pumping without damaging of the nonlinear crystal and generates a narrow linewidth and tunable terahertz wave with injection seeding by an external cavity diode laser for the idler wave. The high intensity pumping causes a gain curve broadening of the terahertz wave parametric generation, especially in the high frequency region. We obtained an output terahertz wave with a tuning range of 0.9–3 THz (100–330 μm), a peak power of 100 mW, and a linewidth of less than 10 GHz. This room temperature operated, palm-sized source promises to be a new widely tunable terahertz wave source that is suited to a variety of applications.

**Key Words:** Terahertz wave, Far-infrared lasers, Frequency conversion, Parametric amplifiers

#### 1. はじめに

近年、遠赤外線あるいはサブミリ波の領域において新しい発生・検出方式の研究が急速に進展しつつあり、それに伴ってテラヘルツ光という言葉がよく用いられるようになった。テラヘルツ光とは、マイクロ波と赤外光の間に位置する電磁波であり、 $10^{12}$  Hz (1 THz) 付近の周波数を持つことからこう呼ばれている。テラヘルツ光の厳密な定義はまだ存在しないが、およそ波長が1 mm～30 μmの領域、周波数に換算すると0.3 THz～10 THzの領域を指す。

テラヘルツ光は電波のように紙、プラスチック、ビニール、繊維、半導体、セラミクス、脂肪、粉体、氷など様々な物質を透過すると共に、光波のようにレンズや

ミラーで空間を自在に取り回すことができる。また、電波に比べて波長が短いため、多くのイメージング用途にとって必要十分な波長程度の空間分解能を有している。さらに近年、ビタミンや糖、医薬品、農業、禁止薬物、爆薬など様々な試薬類に固有の吸収スペクトル(指紋スペクトル)が3 THz以下の低周波数領域で見出され、その分光応用可能性が広がりがつつある。また、これまでこの領域の光源・検出器が未発達のために解明されていない物理現象・生命現象・物質構造の解明、および宇宙、大気や生体、プラズマなどの計測・診断、さらにはテラヘルツ光による非線形現象など幅広い基礎的研究分野の発展につながる可能性も大きいばかりでなく、この周波数帯の電磁波の特徴を生かしたイメージング、非破壊計測、爆薬・禁止薬物検出、バイオテクノロジーや医学へ

の応用、および様々な産業応用への可能性など、テラヘルツ光研究は今後ますます重要になることが予想される<sup>1)</sup>。

しかしながら、この領域は、光波と電波のそれぞれの領域が重要な応用技術とともに発展・成熟してきたのとは対照的に、発生および検出技術面および応用面共に開拓が遅れているが、近年、レーザー光の波長変換を用いて比較的簡便にテラヘルツ光発生が実現できるようになってきた。最も一般的なテラヘルツ光の発生・検出方法は、電気光学結晶や光伝導性アンテナ、半導体、超伝導体等をフェムト秒レーザーで励起して広帯域なテラヘルツ光パルスを発生・検出するテラヘルツ時間領域分光法(THz Time Domain Spectroscopy)<sup>2,3)</sup>である。このTHz-TDSは、従来の熱型光源を用いた遠赤外フーリエ変換分光光度計に比べて非常に感度が高く、物質のテラヘルツ分光やイメージング等に用いられ成果を上げている。

一方で、物質の特定量子状態への励起、超高分解能の分光、超高速光エレクトロニクス等への応用にはスペクトル線幅の狭い周波数可変テラヘルツ光源が必要である。現在、周波数1 THz程度以下の領域では、比較的コンパクトで発振スペクトル幅の狭い周波数可変な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以上の高周波領域での光源開発は遅れている。この領域における広帯域周波数可変テラヘルツ光源には、自由電子レーザー<sup>4)</sup>、p-Geレーザー<sup>5)</sup>、フォトミクス<sup>6)</sup>などがあるが、それぞれシステムが大規模である。極低温を要する、出力が低いなどの課題を抱えている。また、中赤外域で高出力を実現している量子カスケードレーザー<sup>7)</sup>も、原理的に波長可変性に乏しく、3 THz以下の領域では、数例の報告例はあるものの現在はレーザー発振が困難である。このため、可搬性にも通じるコンパクトで室温動作可能かつ簡便なテラヘルツ光源が実現すれば、この領域の研究が飛躍的に進展するのは間違いない。

このような背景の下、我々は非線形光学効果(ニオブ酸リチウム(LiNbO<sub>3</sub>)結晶中の誘導ポラリトン散乱現象<sup>8,9)</sup>)を用いたパラメトリック波長変換によるテラヘルツ光源(テラヘルツ光パラメトリック発生器: Terahertz-wave Parametric Generator, およびテラヘルツ光パラメトリック発振器: TP Oscillator, 光注入型テラヘルツ光パラメトリック発生器: injection-seeded TPQ)の研究に取り組んでいる<sup>10)</sup>。本光源は非線形光学結晶と励起光源だけでテラヘルツ光を発生させるため、小型簡便かつ室温動作可能であり、LiNbO<sub>3</sub>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、テラヘルツ光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。テラヘルツ光の波長制御のため、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。共振器を用いないパラメトリック発生の場合、パルス幅の制約なくコンパクトな短パルス励起光源を用いることができる。このとき、発生するテラヘルツ光は励起

光源の性質に依存する。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<sup>11)</sup>、種光注入による線幅の狭窄化を目指す場合には線幅の狭いシングルモード発振の励起光源を用いられたい。本報告では、ポータブル波長可変光源を目指し、励起光源としてマイクロチップレーザーを用いた光注入型テラヘルツ光パラメトリック光源について述べる。

## 2. 波長可変テラヘルツ光発生原理

Qスイッチ動作のパルスレーザーから発生したレーザー光のような強電場を持つ電磁波が横光学フォノンモードをもつ非線形光学結晶を通過すると、光子と格子振動が結合してポラリトンと呼ばれる素励起状態を形成する。Fig. 1に、非線形光学結晶としてLiNbO<sub>3</sub>を利用した場合のポラリトンの分散曲線を示す。共鳴周波数 $\omega_0$ 付近では格子様に振舞うが、共鳴周波数から十分離れた低周波数領域では光子様に振舞う。このため、ポラリトンを介した誘導ラマン散乱(誘導ポラリトン散乱)によって、広帯域なテラヘルツ光発生を行うことができる。誘導ポラリトン散乱は、LiNbO<sub>3</sub>やLiTaO<sub>3</sub>、GaPなどの極性結晶で観測されることが報告されている<sup>12)</sup>。特にLiNbO<sub>3</sub>は、可視～近赤外領域で広帯域に透明(0.4-5.5  $\mu\text{m}$ )で光損傷に対する耐性が高く(損傷限界>数百MW/cm<sup>2</sup>)<sup>13)</sup>、誘導散乱で高い利得が得られ、テラヘルツ光の結晶中のロスが他の材料に比べて小さい<sup>14)</sup>、などの特性をもつことから高出力、広帯域なテラヘルツ光発生に有利である。

誘導ポラリトン散乱過程では、励起光(周波数 $\omega_p$ )とアイドラー光( $\omega_i$ )、ポラリトン(テラヘルツ光:  $\omega_r$ )の間に、エネルギー保存則 $\omega_p = \omega_i + \omega_r$ と運動量保存則(ノンコリニア位相整合条件) $k_p = k_i + k_r$ が成立し、屈折率の波長分散特性のために励起光の光軸からの散乱角に応じてアイドラー光およびテラヘルツ光の波長が定まる。光強度が $\sim 100$  MW/cm<sup>2</sup>程度以上のナノ秒パルスレーザーを用いてシングルパスでLiNbO<sub>3</sub>結晶(A,対称モード)の最低準位:  $\omega_{p0} = 250$  cm<sup>-1</sup> = 7.5 THz)を励起すると、帯域が1 THzを超えるアイドラー光およびテラヘルツ光の発生が観測される。本稿では、このシングルパス励起の広帯域なテラヘルツ光の発生をテラヘルツ光パラメトリック発生と呼ぶ。

テラヘルツ光パラメトリック発生の利得幅は、パラメトリック利得と非線形光学結晶によるテラヘルツ光の吸収によって決まり、共鳴周波数から十分離れた低周波領域において、平面波近似の下でノンコリニア位相整合条件( $k_p = k_i + k_r$ )を考慮して求めると、パラメトリック利得 $g_r$ は、

$$g_r = \frac{\alpha_r}{2} \left\{ \sqrt{1 + 16 \cos^2 \phi \left( \frac{g_0}{\alpha_r} \right)^2} - 1 \right\} \quad (1)$$

と表される。ここで、 $\phi$ は励起光とテラヘルツ光の間の位相整合角、 $g_0$ は低ロス限界でのパラメトリック利得、

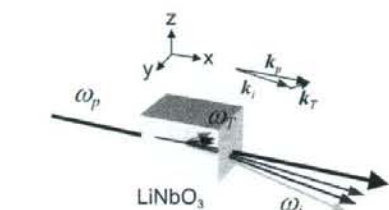
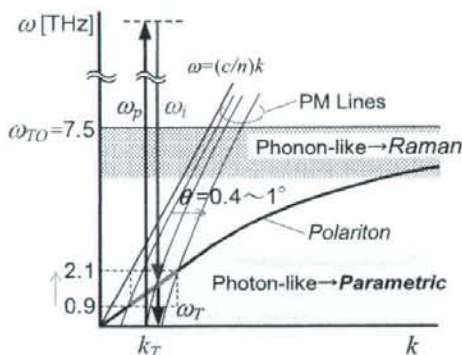


Fig. 1 The dispersion relation of the polariton and the noncollinear phase matching condition in LiNbO<sub>3</sub>.

$\alpha_T$ はテラヘルツ光の吸収係数を表し、

$$g_0 = \sqrt{\frac{\pi\omega_p\omega_1 I_p}{2c^3 n_r n_p}} \chi_r \propto \sqrt{\omega_r I_p} \quad (2)$$

$$\chi_r = d_r + \frac{S_0 \omega_0^2}{\omega_p^2 - \omega^2} d_0 \quad (3)$$

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

である<sup>10,17)</sup>。ただし、 $I_p$ は励起光強度、 $c$ は真空中の光速、 $n_r, n_p, n_s$ はそれぞれ、テラヘルツ光、アイドラー光、励起光の屈折率、 $S_0$ は振動子強度、 $\omega_0$ は $A_1$ モードの共鳴周波数、 $d_r, d_0$ はそれぞれ電子分極、イオン分極に起因した2次と3次の非線形光学過程、 $\epsilon_r$ は誘電率を表す。

東北大の四方らは、一致溶解組成LiNbO<sub>3</sub>結晶をX(ZZ)Y配置で測定したラマンスペクトルの解析により、 $A_1$ モードの固有周波数および線幅(減衰定数)を決定し、周波数依存性を示した<sup>17)</sup>。Fig. 2に、これらの結果を用いてパラメトリック利得(1)式を計算した結果を示す。非線形結晶を高強度で励起した場合、3 THz以上の領域に及ぶ周波数領域にわたって数 $\text{cm}^{-1}$ 以上の高い利得を有することがわかる。上記の低周波モードは、吸収係数 $\alpha_T$ に付加的なピークとして寄与するため、パラメトリック利得にディップ(2.7 THz付近)となって現れる。

### 3. 実験装置

Fig. 3に、実験装置の概略図を示す。実験装置は、励起光源(マイクロチップNd:YAGレーザー)、波長板、レンズ、ミラー、非線形光学結晶(MgO:LiNbO<sub>3</sub>)、注入光

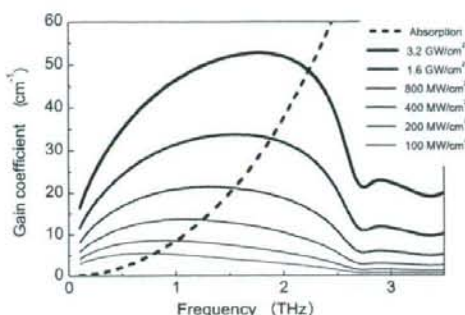


Fig. 2 Calculated gain coefficient for terahertz wave generation using MgO:LiNbO<sub>3</sub> crystal pumped at 1064 nm.

源(外部共振器型半導体レーザー)、アイソレーター、テラヘルツ光用レンズ、テラヘルツ光検出器(4 Kシリコンボロメーター、SBD)によって構成される。発生したテラヘルツ光を検出するための光学系を除くと、テラヘルツ光パラメトリック発生に必要な部分は、励起光源に小型の単一縦モードLD励起受動Qスイッチ動作マイクロチップNd:YAGレーザー<sup>18,19)</sup>を使用したことで、 $15 \times 25 \text{ cm}^2$ 程度と非常に小型である。このレーザーは、発振線幅0.009 nm以下、出力1.3 MW(0.7 mJ/pulse、パルス幅0.5 ns)、繰り返り100 Hzである。また、過飽和吸収体(Cr<sup>4+</sup>:YAG)による受動Qスイッチ動作のため電気ノイズが少なく、出力揺らぎも $\pm 2\%$ と小さい。

両端面に励起光(1.064 nm)に対する無反射膜を施した2本のMgO:LiNbO<sub>3</sub>結晶(各 $4 \times 5 \times 65 \text{ mm}^3$ )を間隔100  $\mu\text{m}$ 以下になるように縦列配置し、レンズによって並行光となった励起光( $\phi 0.3 \text{ mm}$ )を入射した。励起光は結晶中を、ノンコリニア位相整合条件を満たす方向にアイドラー光およびテラヘルツ光を発生させながら通過する。このとき、注入光(連続波、出力:100 mW、波長:1,065-1,080 nm)を、1本目の結晶入り口において、ノンコリニア位相整合条件を満たすように波長と入射角度を選択し、注入する。

MgO:LiNbO<sub>3</sub>結晶は数THz帯に大きな吸収係数(10~100  $\text{cm}^{-1}$ @1~3 THz)を持つため、効率よくテラヘルツ光を取り出すためには、励起光を結晶の取り出し面近くを励起しなければならぬ。本研究では、出力テラヘルツ光が最大になるように調整した。発生したテラヘルツ光は、2つ目の結晶のy面に圧着したシリコン製プリズムア

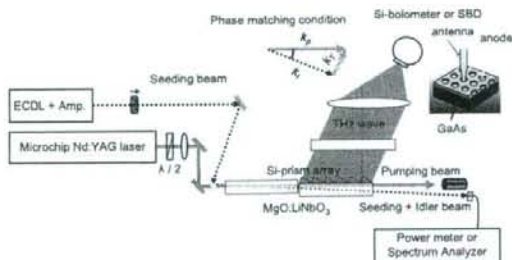


Fig. 3 Experimental setup.

レイによって結晶外に取り出され、レンズ系で集光後、4 Kシリコンボロメーターによって検出される。検出器が飽和する場合は薄膜減衰器を使用した。なお、テラヘルツ光の時間波形を取得する場合は、4 Kシリコンボロメーターの代わりにショットキーバリアダイオード(SBD)を使用した。アイドラー光の強度、スペクトルはそれぞれ、パワーメーター、光スペクトラムアナライザーによって検出した。

#### 4. 結果と考察

Fig. 4に、アイドラー光出力の、励起光強度依存性を示す。光注入を行わない場合、励起光強度が上昇し、400  $\mu\text{J/pulse}$  (尖頭値1.4  $\text{GW/cm}^2$ ) 付近に達すると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アイドラー光出力は単調に増加し、最高出力は、励起光強度が750  $\mu\text{J/pulse}$  (2.9  $\text{GW/cm}^2$ ) のとき、アイドラー光は110  $\mu\text{J/pulse}$  であった。従来の励起光源である単一縦モード動作のフラッシュランプ励起QスイッチNd:YAGレーザー(パルス幅15 ns)を利用した場合と比較すると、アイドラー光の発生しきい値が41  $\text{mJ/pulse}$ <sup>12)</sup> から400  $\mu\text{J/pulse}$  以下と約1/100に、非線形光学結晶の損傷しきい値は450  $\text{MW/cm}^2$ <sup>12)</sup> から2.9  $\text{GW/cm}^2$  以上と約6倍に改善された。これらはいずれも、励起光のパルス幅が短くエネルギーが小さいため、熱的な損傷を抑えられたことにより実現されたと考えられる。また、飽和や損傷の傾向は見られないことから、さらに高強度励起することによってアイドラー光の出力向上が見込まれる。

Fig. 5に、励起光エネルギーが750  $\mu\text{J/pulse}$  のときのアイドラー光スペクトルを示す。アイドラー光は1,069.1~1,074.9 nmの領域で観測された。これは、テラヘルツ光周波数1.45~2.97 THzに相当する。励起光の尖頭値が高いため、従来型と比較して、アイドラー光強度の最大値が1,070 nm付近(1.5 THz相当)<sup>12)</sup> から1,072 nm付近(2.1 THz相当)へと長波長側に移動している。

Fig. 6に、出力テラヘルツ光時間波形を示す。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  $\mu\text{J/pulse}$  である。注入

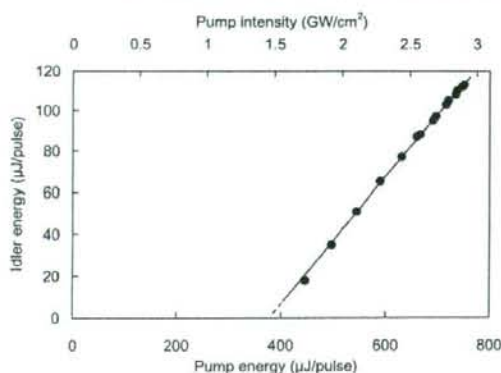


Fig. 4 Pumping energy dependence of Idler wave.

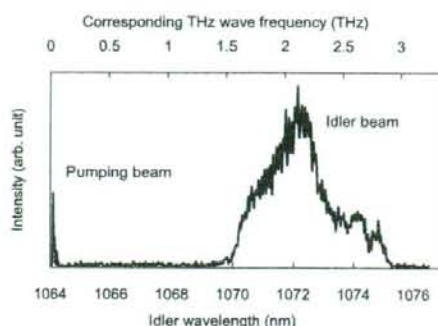


Fig. 5 Idler wave spectrum.

光がない場合(下方)、出力約1 mW(尖頭値)、周波数1.5~2.7 THzの広帯域なテラヘルツ光が観測された。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のテラヘルツ光が観測された。これは、光注入を行わない場合と比較して20倍程度の出力増強である。

Fig. 7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光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光強度変化より、波長約140  $\mu\text{m}$  (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光線幅の狭窄化(1 THz以上 $\rightarrow$ 10 GHz以下)である。

Fig. 8に、テラヘルツ光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光の波長が変化する様子を観測した。最大のテラヘルツ光出力は、励起光エネルギーが550  $\mu\text{J/pulse}$ 、注入光が100 mWのとき、約100 mW(尖頭値)、1.85 THz付近であった。これは、アイドラー光スペクトルと同様に、過去の報告(1.4 THz付近<sup>12)</sup>)と比較して高周波側に移動しており、これは主に、Fig. 2に示した、高強度励起による利得曲線の広帯域化およびピーク周波数の移動を反映していると考えられる。1,073 nm付近に見られるテラヘルツ光出力の落ち込みは、損傷しきい値向上のためにドーパしたMgOに起因している。MgOはLiNbO<sub>3</sub>の結晶に格子欠陥として作

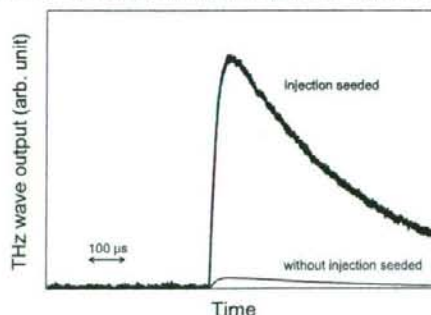


Fig. 6 Time dependent signal of terahertz-wave.