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連する情報が含まれていると考えられる。

一方、ライフサイエンス分野では、古くからさまざまな

手法を用いて生体高分子を分析してきた。中でも任意の生体高分子に着目する研究は、生体組織や細胞中の無数の生体高分子から分離する作業が不可欠である。この作業にはさまざまな手法⁸⁾があるが、例えば、電気泳動と呼ばれるタンパク質の電気的な大ききで分離する場合、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ズ (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鳴振動数が減少することを利用した分析ツールである。また、表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象を利用した装置も、広く普及している生体高分子間相互作用解析ツールのひとつである。これらの装置の詳細な解説は、既に多くの論文や書籍で紹介されていることから、ここでは参考文献を記すに留めることとする^{9,10)}。QCM, SPR は共に、非標識で生体高分子間の結合状態をモニタリングする事が大きな特徴で、その結合と解離の様子から結合 (解離) 定数を算出するものである。これらの定数は、結合し易さの指標となることから創薬における候補物質のスクリーニングや評価指標として利用される。このような非標識による生体高分子の相互作用検出技術は、作業を簡便にするだけでなく、多検体の同時スクリーニングや、標識できないタンパク質なども分析が可能となることから、さまざまな分野で注目されている。

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

2. 低分子化合物-タンパク質の非標識イメージング検出

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

る研究について述べる。

2.1 実験装置

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

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

図 1 THz-TDS イメージング装置実験系

キャンする場合、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高いため空気から 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 波の損失がほぼ 0 と見なすことができる。この Si のサンプル台により、THz 波は集光しながら 5.8 度の入射角でサンプルに入射することとなる。

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、原理確認実験に適している、ビオチンとストレプトアビジンを用いた。ビオチンを PEG と MPEG にそれぞれ結合させ、メンブレンとの疎水

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

NA : 測定不可

性相互作用により固定化した。固定化の際、ビオチンは $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ から $3.2 \times 10^{-6} \text{ M}$ まで濃度を段階的に変化させ、再現性を確認するために各2連でドットプロットを行った。それぞれに滴下した量は $0.2 \mu\text{l}$ ずつで、メンブレン上では約 3 mm の円状に広がった。その後、未処理のメンブレン上にストレプトアビジンが結合することを防ぐために、スキムミルクでブロッキング処理を施したのち、ストレプトアビジンとの反応を行った。以後、このように作成された試料をメンブレンアレイと記す。一方、ストレプトアビジンの結合を確認するために、同様の処理を行って作成したメンブレンアレイに対し、蛍光標識 (Alexa633) 付のストレプトアビジンを反応させて、別途蛍光検出にて結合の確認を行った。

2.3 実験結果

図7に先の方法で作成したメンブレンアレイの模式図と、蛍光標識による検出結果を示す。右図の蛍光画像において濃い色に見える部分が、標識されたストレプトアビジンが検出されている箇所である。メンブレンに固定化せず、ビオチン溶液を滴下しただけの下段2列は、洗浄過程でメンブレンからビオチンが洗い流されたため、ストレプトアビジンと結合できていなかった。このことから、PEG によるビオチンの固定化が正しく出来ており、そのビオチンがストレプトアビジンとの結合能を有していることが確認できた。

先のTHz-TDSの反射測定系で得た1.5 THzでの画像結果を図8に示す。こちらの画像は標識無し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

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

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

3. 金属メッシュを用いたセンシング

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

3.1 実験装置

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

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

図10 FTIRによる2種類のアスパラギン酸の透過スペクトル

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

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

3.2 金属メッシュの原理

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

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

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

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

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

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

図11 金属メッシュの透過スペクトル

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

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

3.3 生体高分子の非標識検出

3.3.1 サンプル調製および実験方法

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

図12 発色実験の結果

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

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

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

3.3.2 実験結果³²⁾

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

3.4 メンブレンを用いた非標識相互作用検出

3.4.1 サンプル調製および実験方法

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

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

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

3.4.2 実験結果

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

図14 各反応段階におけるディップ部の周波数

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

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

4. おわりに

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

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

参考文献

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

- 3) D. M. Mittleman, R. H. Jacobsen, and M. C. Nuss : IEEE J. Quantum Electron, **2**, 679 (1996).
- 4) M. Brucherseifer, M. Nagel, P. H. Bolivar, H. Kurz, A. Bosserhoff, and R. Buttner: Appl. Phys. Lett. **77**, 4049 (2000).
- 5) K. Kawase, Y. Ogawa, Y. Watanabe, and H. Inoue: Opt. Express **11**, 2549 (2003).
- 6) S. P. Micken, 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: Infared Phys. **4**, 257 (1964).
- 22) R. ULRICH: Infared Phys. **7**, 37 (1967).
- 23) A. Mitsuishi, Y. Otuka, S. Fujita, and H. Yoshinaga: J. J. Appl. Phys. **2**, 574 (1963).
- 24) K. Sakai, T. Fukui, Y. Tsunawaki, and H. Yoshinaga: J. J. Appl. Phys. **8**, 1046 (1969).
- 25) T. W. Ebbesen L. J. Lezec, H. F. Ghaemi, T. Thio, and P. A. Wolff: Nature **391**, 667 (1998).
- 26) H. Reather: *Surface Plasmons on smooth and Rough Surface and on Gratings* (Springer-Verlag, Berlin, 1988).
- 27) 宮丸文章, 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). [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,
飼理化学研究所 基幹研究所先端光科学研究領域

テラヘルツ光応用研究チーム 研究員 理学博士
[略歴] 2000年, 明治大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻物理系博士前期過程修了, 明治大学理工学部助手. 2004年明治大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻物理系博士後期過程修了, 理化学研究所川瀬独立主幹研究ユニット研究員, 同所緑川レーザー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