

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22360111

研究課題名（和文） テラヘルツ帯の電磁エネルギーによる血清タンパク可視化技術の研究

研究課題名（英文） Study of visualization of protein using an energy of Terahertz wave

研究代表者

吉村 昇（YOSHIMURA NOBORU）

秋田大学・学内共同利用施設等・その他

研究者番号：60006674

研究成果の概要（和文）：本研究では、抗体反応を利用して染色しなければ可視化することができなかったタンパクの電気泳動技術に、テラヘルツ帯の電磁波を利用した可視化技術を組み合わせることにより、染色すること無く泳動後の処理結果を可視化する THz イメージング技術を開発した。さらに、分画されたタンパクの質量推定手法を新たに考案し、妥当性を検討した。

研究成果の概要（英文）：

It's necessary the stain process to observe the electrophoresis images. In this study, we have developed the visualization method for the protein using the energy of Terahertz wave. Furthermore, we evaluated the appropriateness of the mass distribution measurement method that we had developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電気電子工学，電力工学・電力変換・電気機器

キーワード：テラヘルツ，分子認識，計測工学，タンパク質

1. 研究開始当初の背景

THz 波はミリ波と遠赤外線の中間に位置づけられる 1011 から 1013Hz までの周波数帯の電磁波であり、近年まで利用することが出来なかった未開拓の電磁波である。非電離放射線である THz 波は X 線と異なり材料へ及ぼすダメージが少なく、生体に無害であるため特別な防護施設を必要としない。物質に THz をあてると原子間の振動が共振して電波が吸収される。逆に吸収周波数から物質を構成する分子の結合が分る。そのため、FTIR（フーリエ変換赤外分光光度計）で用いられ

る赤外線と比べ、極めて高い精度で有機分子の構造欠陥をも調べる可能性を秘めている。

我々はこれまでに（財）半導体研究所（仙台市）で開発された THz イメージング装置を用いて、可視光線では診断が困難な皮膚ガンの一種であるメラノーマの検査方法を研究してきた。その際、生体組織に含まれる水分により THz 波が吸収されるため、水分が多い体内での計測は現在の出力では不可能であった。この経験を基に発想を逆転させ、生体由来物質による吸収に優れ、容易に分布情

報を取得できるメリットを最大限に活用し、病態検査における電気泳動後の染色プロセスを THz イメージングで代行できるのではないかと考えるに至った。また、タンパク、アミノ酸等、生体由来物質の種類により THz 帯での電磁波吸収スペクトルが異なることが予想され、種類の識別も可能になると期待できる。

2. 研究の目的

抗体反応を利用して染色しなければ可視化することができなかった血清タンパクの電気泳動技術に、テラヘルツ帯の電磁波を利用した可視化技術を組み合わせることで、低コストに複数の生体由来物質を同定し、病態の迅速診断を可能にする検査技術を実現できると考えた。そこで、本研究課題では、THz 帯の電磁波を活用した血清タンパクの分画・可視化技術の構築を目的とする。分画手段には電気泳動の中でも発ガン性物質を使用しない「セルロース膜電気泳動法」を利用し、従来は必要不可欠だった染色法に頼らず、タンパク、アミノ酸等の存在を迅速に可視化可能な生体由来物質に特化した透過・反射測定技術を構築する。

3. 研究の方法

図 1 に TIS-200G (TUNNETT Imaging System, テラヘルツ研究所) による透過構成のブロック図を示す。ファンクションジェネレータ (DF1905, NF 回路設計ブロック) と直流電源 (KX-100H, 高砂製作所) によって TUNNETT ダイオード (Tunnel injection Transit Time DIODE) を繰り返し周期 4kHz で駆動し、0.189THz 固定で TUNNETT にて発振された連続波はホーンアンテナによって自由空間に射出される。テラヘルツ波はポリエチレンレンズで平行光にされて伝搬し、再びポリエチレンレンズで集光したあとアパーチャを通してサンプルに照射される。波長は約 1.6mm でアパーチャ開口は 1.0mm であり、波長以下の開口によってレンズのみの場合より高い空間分解能が得られるようになっている。アパーチャを通ったテラヘルツ波は試料を透過してショットキーバリアダイオード (Schottky Barrier Diode, 以下 SBD) に検出され、ロックインアンプ (SR810, STANFORD RESEARCH SYSTEMS) によって信号成分を抽出し PC に取り込まれる。

本研究で使用したイメージングは主に透過イメージングである。基本的に発信源と検出器は固定されており、試料をラスタースキャンすることによってイメージングされる。簡単なイメージング構成を図 2 に示す。イメージング範囲が広い場合は点情報で出力を取得するため、イメージングには多くの時間を要する。試料を透過したテラヘルツ波は検

出器に入りロックインアンプによって微小信号が抽出され、直流出力としてパソコンに送られる。送られたデータは電圧強度分布としてイメージングされる。

本研究で使用した電気泳動はセルロースアセテート膜を支持体とした支持体電気泳動法である。図 3 に電気泳動に使用する装置の概念図を示す。電気泳動用の電源は GPO650-0.5REGULATED DC POWERSUPPLY (TAKASAGO.LTD), 泳動槽は EPC105AA (アドバンテック社), セルロースアセテート膜は SELECA-V (東洋濾紙), 緩衝液は pH8.6 のペロナール緩衝液 (ナカライテック) を使用した。図 3 に示されている電源は定電流をセルロースアセテート膜に流す設定となっている。セルロースアセテート膜上に流す電流は、

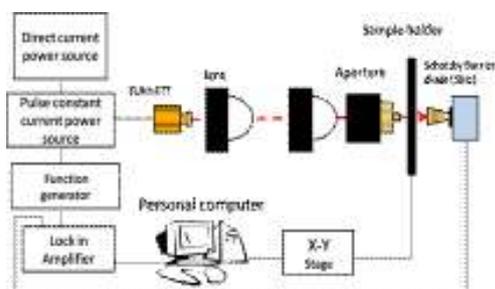


図 1 テラヘルツイメージングシステムのブロック図

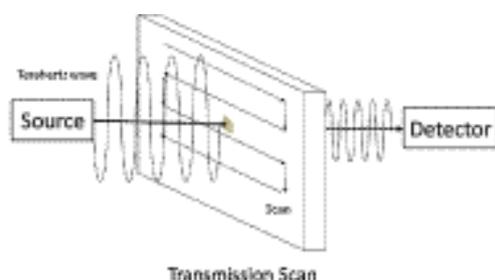


図 2 テラヘルツ波による透過イメージングの手法

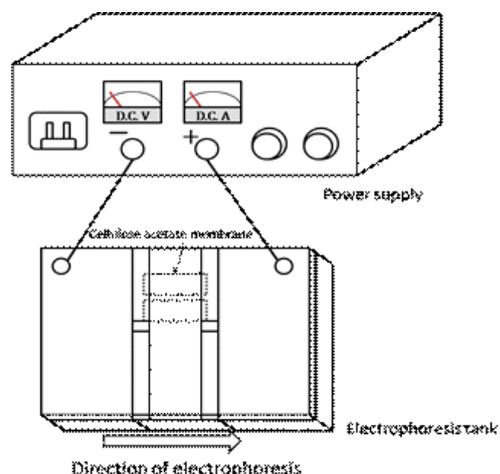


図 3 電気泳動装置の概念図

幅 1cm あたり 0.4~0.8mA が適している。セルロースアセテート膜を固定し、両端が泳動用緩衝液 (200ml) に常に浸っている状態で電圧を印加できる様に構成されている。

卵白 5 μ l を幅 2.6cm に切ったセルロースアセテート膜に泳動槽の正極側の端部から 2cm 離れた部分に縦 5mm, 横 1cm の線状に塗布し、定電流 0.8mA を 45 分間流して泳動する。これは先ほど設定した泳動条件に一致する。図 4 に泳動後の卵白の可視光写真を示す。可視光下では泳動した卵白は透明であり、目視できない。テラヘルツイメージと比較するために、本サンプルにも参照用のリファレンスマーカーを三点付けた。サンプルを 20 時間以上乾燥させた後に、TIS-200G にてイメージングした。イメージング範囲は X 軸方向に 4.0cm, Y 軸方向に 2.1cm, イメージングピッチは 300 μ m に設定した。

図 5 に卵白を泳動したサンプルのイメージング結果を示す。テラヘルツイメージを見ると赤色の点線の内側における前項でも吸収が強かった初期位置の部分と、赤色の実線の内側における泳動終了時のタンパク質の位置に特徴的な二つの吸収を見てとれる。また、初期位置から電気泳動を経て、最終的な泳動位置に至るまで、もう一ヶ所弱い吸収が図 5 の赤色の破線の内部に確認できる。

その後、結果を比較するため同サンプルを染色した。染色には先ほどと同様にボンソー 3R 染色液を使用し、1 分間染色液に卵白を電気泳動したセルロースアセテート膜を浸した後、水によって脱色する。その後、20 時間以上乾燥させた。

図 6 に染色後の可視光写真を示す。ここで、両者を比較すると、図 6 の右側にある赤点線内で確認された吸収は染色後の図 5 にも確認できた。よって本痕跡は卵白の初期塗布位置と判断できる。さらに、図 5 の左側、赤色の実線で囲まれた部分にも図 6 と同様に吸収が確認できる。よって図 6 で確認できた吸収は泳動終了時のタンパク質の痕跡であると考えた。また、卵白をサンプルとした場合でも、図 6 にて左側の赤色の実線で囲まれた部分のタンパク質が右側の赤色の点線で囲まれた部分のタンパク質よりも濃く染色されている。ここで図 5 のイメージングと比較すると、図 5 も同様に左側の赤色の実線で囲まれた部分のタンパク質の吸収が強いことがわかり、泳動終了位置に初期位置よりも多くのタンパク質が残留していることをイメージングからも確認できる。

ここで、前項と本項のテラヘルツイメージを比較した際に、注目すべき点が泳動痕である。図 6 において染色後のサンプルにはタンパク質が泳動された痕跡が染色されており、そのなかでも赤色の破線で囲まれた部分の内側に染色箇所が濃い部分が存在する。この

染色箇所が濃い部分を図 5 のイメージング画像と比較すると、イメージング画像においても同様のタンパク質の吸収があることを確認できた。本結果から卵白を電気泳動した際に、泳動によって出来たバンドを確認できる可能性が高いと考えた。この結果を踏まえて、THz 波吸収イメージングによる電気泳動後のタンパク質量法を考案した。今回、タンパク質の定量には Nanodrop 2000 スペクトロフォトメータ (NanoDrop Technologies, inc, 以下 Nanodrop) と呼ばれる分光光度計を使用した。Nanodrop は広波長領域 220-750nm に対応した分光光度計であり、測定サンプルを定位置に保ち、吸光度を測定した。本装置は、パルス式キセノンフラッシュランプと呼ばれる光源から、コンデンサを用いたパルス光をサンプルに照射し、リニア CCD アレイと呼ばれる光の強度を電圧に測定する素子により、サンプルを通過した光を分光し、分析する。分光するためには、あらかじめブランクと呼ばれる、吸収の基準となる溶液が必要である。ブランクを先に測定したのち、サンプルの吸収を測定する。本研究ではブラ



図 4 卵白の電気泳動後の可視光で撮影した写真

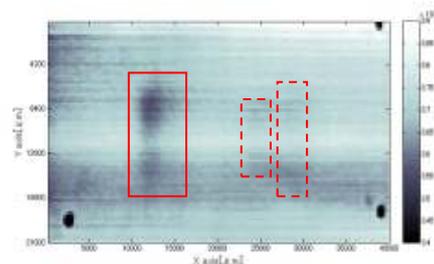


図 5 電気泳動後の卵白のテラヘルツイメージ

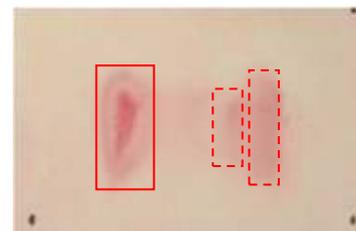


図 6 電気泳動後の卵白の染色後サンプル

ンクに水を使用して実験した。Nanodrop の出力は Absorbance と呼ばれる、サンプルとブランクの透過光強度における対数比として出力される。なお、タンパク質の量はランベルト・ベールの法則によって算出される。

卵白をサンプルとして $1\mu\text{l}$ 使用し、幅 3.0cm のセルロースアセテート膜の上部に塗布して 45 分間電気泳動した。泳動後のセルロースアセテート膜は十分に乾燥させた後、円形孔の空いたテンプレートを使用し、下部に卵白の原液と、卵白の濃度が 0.5 、および 0.2 になるように水で希釈した溶液を縦方向に 3 箇所、それぞれ 5 点ずつ滴下する。

以上のように作製したサンプルを TIS-200G によってイメージングした。イメージング範囲は X 軸方向に 36mm 、Y 軸方向に 26mm 、 $400\mu\text{m}$ 刻みでイメージングしている。

図 7 に本サンプルのテラヘルツイメージを示す。上部にサンプルである卵白の泳動痕が見て取れ、さらに赤直線内における泳動の終了位置にタンパク質の強い吸収を確認できる。さらに下部にはテンプレートによって滴下した希釈率の異なる卵白の吸収が希釈率に応じた吸収の強度で確認できる。

初めに、イメージの下部に存在する、それぞれの希釈率における卵白の吸収を抽出する。イメージから抽出した吸収部分の出力電圧を平均し、さらに、抽出した吸収部分のピクセル数を求めた。今回のイメージングはスキャンピッチを $400\mu\text{m}$ と設定しているため、ピクセル数から吸収の面積を求めることが出来る。卵白 $0.2\mu\text{l}$ に含まれるタンパク質の量を先ほど算出した面積で割ることで、テラヘルツイメージ上における 1mm^2 あたりのタンパク質量を算出した。図 8 に得られた特定の希釈率における平均出力電圧とタンパク質の推定量の関係を示す。タンパク質の推定量を y [ng/mm^2]、平均電圧を x [mV] として近似式を求めると以下の式が得られた。

$$y = -44.2x + 186 \quad \dots (1)$$

$R^2 = 0.99$ となり、線形近似は妥当であると考えた。実際に泳動されたタンパク質の推定量を算出した結果、泳動終了位置には 1mm^2 あたり約 288ng となり、泳動後のタンパク質の量を定量することが可能となった。この関係式を基に図 7 の赤い点線で囲まれた電気泳動処理結果を (1) 式を用いてピクセルあたりのタンパク質量分布画像を作成した。図 9 にタンパク質量分布画像を示す。同図 (a) に X-Y 平面に示したタンパク分布画像、同図 (b) に泳動方向でみたタンパクの質量分布画像を示す。同図 (a) において画素の濃度がその位置におけるタンパクの量を示す。同図 (b) において、横軸は泳動方向 (x 軸)、縦軸が蓄積したタンパクの量を示す。以上の処理により、電気泳動後のタンパクの蓄積量を質量分布画像として可視化できることを明らかに

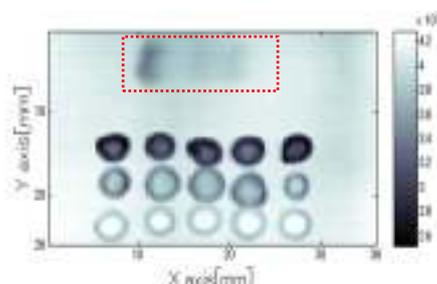


図 7 タンパク質量用試料のテラヘルツイメージ

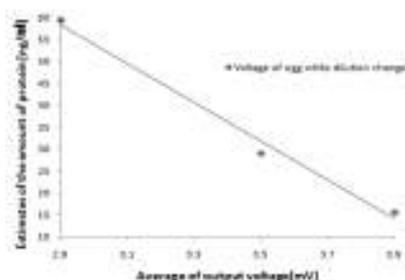


図 8 各々の平均出力電圧におけるタンパク質の推定量の推移

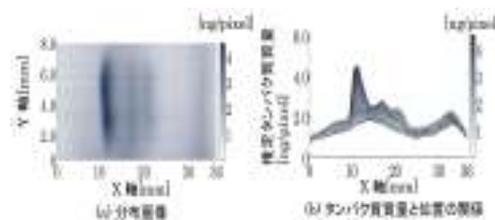


図 9 タンパク質量分布画像

した。

4. 研究成果

本研究では、テラヘルツ帯の電磁波がタンパク質で吸収される特徴を活かして電気泳動後の可視化処理に利用される染色処理をテラヘルツイメージングで代行できるのではないかと考え、電気泳動後のサンプルを対象としたテラヘルツイメージングの計測技術の構築に取り組んだ。以下に、本研究で得られた成果を列記する。

4-1. テラヘルツイメージングに適した電気泳動条件の構築

タンパク質のサンプルでイメージングが確認できる電気泳動条件を検討した。検討した電気泳動条件はサンプルを $5\mu\text{l}$ 、ガラス製のマイクロピペットにて、幅 2.6cm に切ったセルロースアセテート膜に複数回に分けて少量のサンプルを均一に同じ位置へ塗布する。塗布する位置は泳動槽における陰極側のセルロースアセテート膜の端部から 2cm 離れた場所に長さ 1cm 、幅 1mm 以内に収めるように塗布するのが望ましい。塗布されたサンプルを定電流 0.8mA にて 45 分間電気泳動し、

電気泳動したサンプルをメンブレンに挟んで 20 時間以上乾燥させ、サンプルを作製することで、電気泳動特有のタンパク質のバンドをテラヘルツイメージでも確認できることを明らかにした。

電気泳動後のサンプルを明瞭にイメージング可能な必要量を検討した。サンプルである卵白を $1\mu\text{l}$ 塗布し、前述した電気泳動条件でサンプルを作製したのち、サンプルをテラヘルツイメージングしたところ、テラヘルツイメージから、 $5\mu\text{l}$ の塗布量よりも詳細なタンパク質の分離が確認した。本結果から、電気泳動によって生じる細かなタンパク質分離をテラヘルツイメージで確認するためには $1\mu\text{l}$ のサンプル塗布量が必要であることを明らかにした。

4-2. テラヘルツイメージングシステムの装置条件における成果

TUNNETT ダイオードの位置を $10\mu\text{m}$ 刻みで移動させ、セルロースアセテート膜上の 1 点における SBD の出力電圧が、TUNNETT ダイオードの距離を奥行き方向に移動することで、非対称な正弦波状に変化することを明らかにした。また本研究で使用したセルロースアセテート膜では、波の山が $100\mu\text{m}$ 、山から谷へと移行する中間地点が $250\mu\text{m}$ 、谷が $550\mu\text{m}$ 、さらに谷から山へと移行する中間地点が $800\mu\text{m}$ 、そして再び山となるのが $900\mu\text{m}$ であることを確認した。

TUNNETT ダイオードの移動変化によってテラヘルツイメージがどのように変化するかを調べ、さらに、得られたテラヘルツイメージからセルロースアセテート膜上に電気泳動されたサンプルを高い再現性でイメージング可能な TUNNETT ダイオードの位置が「SBD の出力電圧が谷から山へと移動する中間地点」であることを明らかにした。なお、本研究で使用したセルロースアセテート膜の条件では、再現性良くイメージングできる移動距離が $800\mu\text{m}$ であることを明らかにした。

アパーチャとサンプル間の距離を離れた時のテラヘルツイメージを確認し、距離を狭めるほどタンパク質の吸収が再現性良く確認できることを明らかにした。さらに本研究で使用したセルロースアセテート膜で電気泳動したタンパク質を再現性良くイメージングするためには、アパーチャ-サンプル間距離が 0.1mm であれば良いことを明らかにした。

4-3. 電気泳動後のタンパク質定量法

サンプルテンプレートを作製し、それぞれのセルに $0.2\mu\text{l}$ の卵白を滴下後乾燥させることで、テラヘルツイメージからタンパク質を定量するためのリファレンスデータを作成した。なお、ここでは Nanodrop を用いて卵白の希釈率ごとのタンパク質量を計測し

ており、単位面積あたりのタンパクの量を求め、リファレンスデータとした。

イメージングによって得られたテラヘルツイメージと上記リファレンスデータを比較することで、テラヘルツイメージからタンパク質の推定量を算出する手法を構築した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① 今野大, 水戸部一孝, 藤村和由, 鈴木雅史, 吉村昇: 各種無電解めっき電極の耐イオンマイグレーション性能, 電気学会論文誌 A, 査読有, Vol.133, No.4, pp.153-158 (2013)
- ② M. Kabir, M. Suzuki, N. Yoshimura, K. Shiozawa, M. Ogishima, H. Shintate and H. Andoh: Measurement of Electrical Characteristics of ZnO Microvaristors, IEEJ Trans. Elect. Electron. Engg., 査読有, Vol.7, No.1, p.107-108 (2012)
- ③ H. Zhang, K. Mitobe, M. Kabir, M. Suzuki Y. Mitobe, T. Habuchi and N. Yoshimura: Improvement of CW THz Imaging System for Cellulose Acetate Membrane Electrophoresis, IEEJ Trans. Elect. Electron. Engg., 査読有, Vol.7, No.S1 (2012)
- ④ M. Kabir, M. Suzuki and N. Yoshimura: Reduction of Excess Activated Sludge by Ferrite Particles: Methods for Practical Use, Int. J. Soc. Mater. Engg. Resour., 査読有, Vol.17, No.2, p.120-25 (2010).

[学会発表] (計 20 件)

- ① 小野 結太, カビール ムハムドゥル, 鈴木 雅史, 吉村 昇: ZnO 粒子の含有量が異なるエポキシの電気特性, 平成25年電気学会全国大会, 2013年3月, 名古屋
- ② 小久保 研介, 鈴木 雅史, 水戸部 一孝, 吉村 昇: テラヘルツ波による水トリーの非破壊検査に関する研究, 平成24年電気学会基礎・材料・共通部門大会, P-20, p.98, 秋田 (2012)
- ③ 高橋 裕, 水戸部 一孝, 伊藤 武志, 鈴木 雅史, 吉村 昇: 電気泳動への THz の応用, 平成24年電気学会基礎・材料・共通部門大会, 2012年9月, 秋田
- ④ H. Zhang, K. Mitobe, M. Suzuki, Y. Mitobe, T. Habuchi, and N. Yoshimura: Single Frequency Continuous Wave Terahertz Imaging of DNA Marker and Protein Marker on Membrane, International Conference on Adva

nced Electro materials (ICAE) November, 2011, Jeju, Korea

- ⑤ K. Mitobe, M. Suzuki and N. Yoshimura: Analysis of the dendrite on printed wiring board by soft X-ray microscope and THz imaging, International Conference on Power and Energy Systems (ICPS) December, 2011, Chennai, India
- ⑥ H. Zhang, K. Mitobe, M. Suzuki and N. Yoshimura: Continuous Wave Terahertz Imaging Method for Ion Migration Detection, International Conference on Condition Monitoring and Diagnosis 2010 (September, CMD2010), Tokyo, Japan

[図書] (計3件)

- ① 水戸部一孝: 車載用センサ/カメラ技術と安全運転支援システム, 技術情報協会, pp.639-655 (分担) (2009)
- ② K. Mitobe: Business opportunities in personal transportation -Traffic safety for older adults- : The Silver Market Phenomenon -Second Edition-, edited by Kohlbacher, F. and Herstatt, C., Springer, Heidelberg, p.371-81, ISBN:978-3-642-14338-0 (2010)
- ③ M. Kabir, M. Suzuki and N. Yoshimura: Waste Water Treatment and Reutilization, edited by Einschlag F. S. G., Intech, p.133-50, ISBN: 978-953-307-249-4 (2011)

[産業財産権]

○取得状況 (計2件)

名称: 余剰汚泥の粉碎方法、余剰汚泥減容化方法及び余剰汚泥の粉碎装置

発明者: 鈴木 雅史, 吉村 昇, カビールムハムドゥル, 酒井 教行

権利者: 国立大学法人秋田大学, 株式会社五十鈴製作所

種類: 特許

番号: 第5217778号

出願年月日: 平成20年8月25日

国内外の別: 国内

名称: 作業判定システム及び作業判定方法並びに該作業判定方法を記録した記録媒体

発明者: 高橋哲也、山腰明、水戸部一孝、吉村昇

権利者: トヨタ自動車東日本株式会社、国立大学法人秋田大学

種類: 特許

番号: 第5215331号

出願年月日: 平成22年2月3日

国内外の別: 国内

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 昇 (Noboru Yoshimura)

秋田大学・学内共同利用施設等・その他

研究者番号: 60006674

(2) 研究分担者

水戸部 一孝 (Kazutaka Mitobe)

秋田大学・工学資源学研究科・准教授

研究者番号: 60282159

鈴木 雅史 (Masafumi Suzuki)

秋田大学・工学資源学研究科・教授

研究者番号: 60226553

カビールムハムドゥル (Kabir Mahmudul)

秋田大学・工学資源学研究科・講師

研究者番号: 10422164