

第2章 電波照射装置の開発とミネラルゼーションにおける電波影響解析 (臼井健二)

2-1. はじめに

マイクロ波とは周波数が 300MHz～300GHz の電波であり、携帯電話や電子レンジなど身の周りの様々な製品に利用されている。マイクロ波は高い加熱能を有しており、単純加熱のような外部から熱伝導し溶液が加熱されるのではなく、物質に直接作用し加熱することが出来る。マイクロ波の高い加熱能を利用した応用例として、無機材料^[1]や有機材料の合成^[2]、金属や酵素の触媒活性の向上^[3]、整形外科の加温治療やガンの温熱治療^[4]など様々な分野で用いられている。しかしながら、マイクロ波が物質や生体に与える分子レベルでの影響は明らかとなっていない。そこで、我々は、分子レベルでのマイクロ波の影響を解析する題材として、ペプチドを用いたミネラルゼーションを選択することにした。バイオミネラルゼーションとは、生体内に存在するタンパク質やペプチドなどの有機物が無機物の結晶化を巧みに制御し、歯や骨といった組織を構築する自己組織化メカニズムである^[5]。また、 CaCO_3 のミネラルゼーションにおいては、酸性リッチなタンパク質やペプチドが関与していることが知られている^[6]。 CaCO_3 のミネラルゼーションを題材にした理由としては、1) 生体反応の一例であること、2) タンパク質の小型版であるペプチドは、電荷（沈殿能）を変化させることが可能であることが挙げられる。本研究を通してマイクロ波の与える影響が解明できれば、医学分野では新しい治療法への応用や新たな電磁波防護方法の検討が可能となり、工学分野ではさらに多様な合成への応用が期待できる^[7,8]。我々はこれまでに、4種類の電荷の異なる CaCO_3 沈殿ペプチドを合成し、 CaCO_3 のミネラルゼーションにおける電荷の影響を調査したところ、ペプチドの電荷の違いによって CaCO_3 の形状や沈殿能が大きく異なることが示されている^[9]。また、4種のペプチドのうち S peptide を用いて、マグネトロン型マイクロ波発生装置による電波照射下で CaCO_3 のミネラルゼーションを行ったところ、単純加熱とは異なる形状の沈殿物の形成が確認されている（図 2.1）^[10]。そこで本研究では、沈殿能の異なるペプチド 4 種類のペプチドを用いた CaCO_3 のミネラルゼーションにおけるマイクロ波およびペプチドの影響を単純加熱と

比較することにより、分子レベルでのマイクロ波の影響を調査することにした。

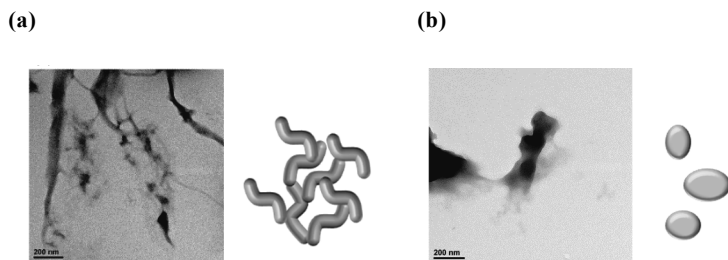


図 2.1 (a) マグネトロン電波発生装置 200W 出力における CaCO_3 沈殿の透過型電子顕微鏡画像^[10]。(b) 単純に 90℃に加熱した条件での CaCO_3 沈殿の透過型電子顕微鏡画像^[10]。

2-2. 方法

2-2-1. 実験材料および装置

マイクロ波照射装置はミナト医科学製のマグネトロン型電波発生装置と半導体型電波発生装置を使用した。マイクロ波の電界強度測定には精工技研製の光電界センサ(小型一軸光電界センサヘッド(型番:CS-1403)、コントローラ(型番:C3-1055))を使用し、波形分析はアドバンテスト製のスペクトラムアナライザー(型番:U3751)を用いた。

2-2-2. CaCO_3 沈殿ペプチドの設計・合成

本研究で使用する CaCO_3 沈殿ペプチドは、Fmoc (Fluorenylmethyloxycarbonyl) 固相合成法^[11]により合成した。その後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製し、MALDI(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)-TOF(Time of Flight) MS(mass spectrometry)、アミノ酸分析で同定した。

2-2-3. 一方向直線偏波の照射が可能なマイクロ波照射装置

本装置の概要図を図 2.2 に示す。マイクロ波照射装置はマグネトロン型電波発生装置と半導体型電波発生装置をそれぞれ使用した。照射アンテナの主輻射軸上に試料を入れたマイクロチューブを設置し、一方向からマイクロ波を照射できるように、アクリル板でマイクロチューブ立てを固定する構造となってい

る。また、照射されるマイクロ波が周囲に与える影響を軽減するためにシールド装置を用いる。シールド装置は、一面は開口、残りの五面が二重構造のアクリルの直方体容器を使用し、二重構造部分に水を封入することで吸収体の役割を果たす。

2-2-4. CaCO_3 の沈殿条件、電界強度・温度測定条件

CaCO_3 沈殿ペプチド未添加条件では、 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の終濃度が $150\ \mu\text{M}$ となるように調製し、3 時間反応させた。 CaCO_3 沈殿ペプチド添加条件では、終濃度がペプチド $1\ \mu\text{M}$ - $100\ \mu\text{M}$ 、 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ が $0.15\ \text{mM}$ となるように調製し、3 時間反応させた。マイクロ波は $2.45\ \text{GHz}$ の一方向直線偏波を使用し、80 min 照射、20 min 静置、80 min 照射というプロトコルで CaCO_3 沈殿を 3 時間行った。マイクロ波照射時のサンプル位置における電界強度は光電界センサを用いて測定した。



ミナト医科学(株)製半導体型発振器

マイクロ波照射部 : パッチアンテナ
マイクロ波周波数 : $2450 \pm 5\ \text{MHz}$
マイクロ波出力 : $10\ \text{W} \sim 60\ \text{W}$
マイクロ波偏波 : 直線偏波
電磁波シールド : 水シールドカバー



ミナト医科学（株）製マグネトロン型発振器

マイクロ波照射部 : パッチアンテナ
マイクロ波周波数 : $2450 \pm 50\ \text{MHz}$
マイクロ波出力 : $10\ \text{W} \sim 200\ \text{W}$
マイクロ波偏波 : 直線偏波
電磁波シールド : 水シールドカバー

図 2.2 半導体型発振器とマグネトロン発振器

また、マイクロ波照射時の温度変化を熱電対温度計（本体：CHINO Card Logger MR5300、センサ：MR930）を用いて測定し、その温度をもとにマイクロ波非照

射単純加熱条件の温度を決定した。単純加熱条件におけるサンプルの加熱はサーマルサイクラー（Gene Atlas 482/485）を用いた。

2-2-5. 各測定装置について

CaCO₃ 沈殿物の形状は原子間力顕微鏡（AFM、Multi Mode Scanning Probe）および透過型電子顕微鏡（TEM）により測定した。DLS 測定においては、Zetasizer-ZEN3600（シスメックス）により粒子径分布を解析した。粒子表面の電位の解析は、Zetasizer-ZEN3600 によりゼータ電位を測定した。サンプル中のカルシウム沈殿量（Ca 元素の定量）は、クリーンケミカル（株）の SPECTRO BLUE を用いて、検出波長 396.847 nm における ICP-AES により測定した。各種ペプチドと Ca(HCO₃)₂ 水溶液の比誘電率測定は、兵庫県立工業技術センターの誘電率測定システム（SH2-Z 4 端子サンプルホルダー）を用いて測定し算出した。CaCO₃ 沈殿により消費されたペプチド量の測定は HPLC（日立ハイテクサイエンス）を用いて見積もった。

2-3. 実験の結果と考察

2-3-1. CaCO₃ 沈殿ペプチドの設計および合成

本研究で使用する 4 種類の異なる電荷を有するペプチドは、ザリガニの外骨格形成タンパク質の一部である CAP-1 ペプチドの C 末端 9 残基を参考にして設計した（図 2.3）^[12,13]。本研究で使用する 4 種類の異なる電荷を有するペプチドは Fmoc 固相合成法により合成した。

S peptide	H-S-S-E-D-D-D-D-D-D-OH	Total charge -7
Ac-S peptide	Ac-S-S-E-D-D-D-D-D-D-OH	Total charge -8
pS peptide	H-pS-S-E-D-D-D-D-D-D-OH	Total charge -9
Ac-pS peptide	Ac-pS-S-E-D-D-D-D-D-D-OH	Total charge -10

図 2.3 4 種のペプチドの配列
図中の Ac はアセチル基、S はセリン、E はグルタミン酸、D はアスパラギン酸、pS はリン酸化セリンを表す。

2-3-2. マイクロ波の電界強度測定比較

半導体装置における直線偏波照射時のサンプル位置における電界強度を、光電界センサを用いて測定し、マグネトロン装置と比較した。半導体装置は、マイクロ波照射装置の最小出力である 10 W では 0.4 kV/m、最大出力である 60 W では 1.5 kV/m となった。また、出力に応じて電界強度が線形的に増大していることが確認された。半導体の最大出力時の電界強度は、マグネトロンの最大電界強度 (200 W) の 6 分の 1 ほどと低いものであった。電磁波影響解析においては強度が高い方が、影響が出やすいため、今後、半導体の出力を上げる改良が必要になることが懸念される。以降の半導体を用いたミネラルゼーションの影響研究では、マイクロ波出力 10 W と 60 W で調査することとした。

2-3-3. マイクロ波照射条件でのサンプルの温度変化比較

出力 10 W と 60 W のマイクロ波照射条件におけるサンプルの温度変化を、熱電対温度計を用いて測定した。その結果、10 W では最高温度が 28.8°C、平均温度が 27.7°C、60 W では最高温度が 41.2°C、平均温度が 36.9°C であることが示された。実際、半導体の出力表示 60 W について温度測定結果は、マグネトロンの出力表示 100 W 程度に相当するものとなった。電界強度測定では半導体の 60 W はマグネトロンの 10 W 未満に相当したにもかかわらず温度上昇は大きいものとなった。半導体の周波数特性の方がサンプルへの影響が大きいことが原因と考えられるが、今後、熱電対温度センサの電磁波影響や半導体とマグネトロンの周波数特性の比較などを行うことで、この原因を詳細に考察する必要がある。以降の半導体を用いたミネラルゼーションの影響研究では、マイクロ波照射条件とサーマルサイ클ーによる単純加熱条件を比較することにした。なお、単純加熱条件における加熱温度はそれぞれの出力における平均温度と最高温度から 37°C と局所加熱の影響も考えて 90°C のそれぞれ 2 条件とした。

2-3-4. AFM による形状観察

まず、4 種類のペプチドの濃度を 100 μM に固定し、マイクロ波照射条件およびマイクロ波非照射条件において形成した CaCO_3 沈殿物を AFM により観察した (表 2.1)。S peptide においては、加熱条件とは異なる紐状構造物の形成が確認された。一方、S peptide に比べて沈殿能が高いその他のペプチドでは、紐状・

網目状構造物の形成は確認されなかった。そこで、ペプチドの濃度を段階的に 100 μM ~1 μM まで低下させたところ、 CaCO_3 沈殿能の低いペプチドでは高濃度領域でも紐状構造物の形成が確認された。しかし、 CaCO_3 沈殿能の高いペプチドほど低濃度でしか紐状構造物の形成は確認できなかった。以上から、ペプチドの沈殿能力が低下すると、MW 波照射の影響により紐状・網目状構造へ誘起することが示唆された。

表 2.1 各ペプチドのミネラル化における、単純加熱条件と電磁波照射条件での沈殿物の形状変化

Peptide concentration	S peptide		Ac-S peptide		pS peptide		Ac-pS peptide	
	加熱	MW	加熱	MW	加熱	MW	加熱	MW
100 μM	粒子	紐状	粒子	粒子	粒子	粒子	粒子	粒子
10 μM	粒子	紐状	粒子	粒子	粒子	紐状	粒子	粒子
1 μM	未検出	未検出	粒子	紐状	粒子	紐状	粒子	紐状

2-3-5. TEM による形状観察

マイクロ波非照条件サンプルの TEM 観察を行った結果、37℃、60℃では形状、大きさが不均一な炭酸カルシウム沈殿物が見られた。また、90℃単純加熱条件では形状が不均一な数 μm の比較的大きな沈殿物が見られ、マイクロ波 (60 W) 照射時の温度変化を再現した単純加熱では形状及び大きさが不均一な炭酸カルシウム沈殿物が見られた。また、マイクロ波 60 W 照射条件では、線維状や網目状の炭酸カルシウム構造物が見られた。したがって、ペプチド添加マイクロ波照射条件下では単純加熱ではない、線維状及び網目状の炭酸カルシウム構造物が得られることが明らかとなり、AFM の結果と一致した。

2-3-6. DLS による粒子径測定

単純加熱条件では 800~300 nm 程度の沈殿物が見られた。一方、マイクロ波

60 W 照射条件では 400～ 600 nm 程度の沈殿物が確認されたことから、AFM 像と相関がある沈殿物が見られた。ゆえに、サンプル全体においてもマイクロ波照射によって網目状構造物が形成されたことが明らかとなった。

2-3-7. ゼータ電位測定による CaCO_3 表面の電位測定

マイクロ波照射により、紐状・網目状構造が確認されたペプチド濃度で CaCO_3 沈殿を行い、マイクロ波照射条件とマイクロ波非照射条件のゼータ電位を測定した。マイクロ波非照射条件 (37℃) のゼータ電位は 4 種類全てのペプチドで負であったが、マイクロ波照射条件のゼータ電位は 4 種類全てのペプチドで正にシフトしていることが確認された。次に、ペプチドの濃度を 10 μM に固定して CaCO_3 沈殿を行い、マイクロ波照射条件とマイクロ波非照射条件でゼータ電位を測定した。マイクロ波非照射条件 (37℃と 90℃) においては、上記の結果と同様に 4 種類全てのペプチドでゼータ電位は負であった。マイクロ波照射条件においては、紐状・網目状構造が確認された S peptide と pS peptide ではゼータ電位は正にシフトしていることが確認された。しかしながら、紐状・網目状構造ではなく粒子状の構造物が確認された Ac-S peptide と Ac-pS peptide においては、ゼータ電位は負であることが示された。

2-3-8. ICP-AES による CaCO_3 沈殿により消費された Ca 元素の定量

CaCO_3 沈殿後の沈殿量を ICP-AES を用いて測定したところ、紐状、網目状構造物が確認された S peptide と pS peptide では、単純加熱と比較するとマイクロ波照射条件では沈殿量の増加が確認された。一方、粒子状の沈殿物が確認された Ac-S peptide と Ac-pS peptide では、単純加熱と MW 照射条件を比較しても沈殿量の増加は確認できなかった。

2-3-9. 各種ペプチドと $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 水溶液の比誘電率測定

各種ペプチドと $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 水溶液の比誘電率を誘電率測定により算出したところ、ペプチドの比誘電率は 20~40 であり、4 種類それぞれで差が見られなかった。 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の比誘電率はペプチドよりも非常に高い (5－6 倍程度) ことが示された。

2-3-10. HPLC による沈殿反応に消費されたペプチド量測定

反応時間 0 hour のペプチドピーク面積と各条件で 3 hour 沈殿反応を行った後

のピーク面積を比較することで、炭酸カルシウム沈殿反応に消費されたペプチド量を見積もった。その結果、マイクロ波非照射条件では温度の上昇に従ってペプチド消費量が増加した。一方、マイクロ波照射条件ではマイクロ波出力の増大に従ってサンプル温度が上昇するにも関わらず、消費されたペプチド量にほとんど差は見られなかった。ゆえに、ペプチドを用いた炭酸カルシウム沈殿反応において、マイクロ波は単純加熱だけではない影響を及ぼしていることが明らかとなった。

2-3-11. マイクロ波およびペプチドが CaCO_3 のミネラルゼーションに与える影響

CaCO_3 のミネラルゼーションは負電荷リッチなペプチドに Ca^{2+} イオンが静電相互作用により引き寄せられ、ペプチドにいくつかの Ca^{2+} イオンが集積する。その後、 CO_3^{2-} イオンがペプチド上に集積した Ca^{2+} イオンに集積することで CaCO_3 の核形成が起こる。AFM、ゼータ電位、ICP-AES の結果から、沈殿能の高いペプチドでは CaCO_3 の核形成および結晶成長が早くマイクロ波の影響をほとんど受けないため、粒子状の沈殿物が形成されたと考えられる。一方、沈殿能の低いペプチドでは核形成後の結晶成長が緩やかであるため、マイクロ波の影響を強く受け、マイクロ波の電場方向に沿って結晶成長が起こり、紐状の沈殿物を形成したと考えられる。このことから、マイクロ波は CaCO_3 の結晶成長反応に関与していることが示唆された。また、誘電率測定と HPLC の結果から、それぞれのペプチドの比誘電率の値に差が見られず、 CaCO_3 のミネラルゼーション後のペプチドの消費量においても差は見られなかった。このことから、ペプチドは核形成過程に関与していることが示唆された。したがって、ペプチドは核形成過程に関与しており、マイクロ波は結晶成長過程に関与していることが示唆された（図 2.4）。

2-4. 結論

2-4-1. 結論

沈殿能の異なる 4 種類のペプチドを用いた炭酸カルシウムのミネラルゼーションにマイクロ波が与える影響を調査した。それぞれのペプチドを用いて沈殿した炭酸カルシウムの構造を AFM により観察した結果、ペプチドの沈殿能が

低い場合にのみ紐状や網目状のナノ構造体の形成が確認された。また、DLS 測定においてもマイクロ波照射時と非照射時で粒子径に違いが見られた。ゼータ電位測定の結果、紐状・網目状構造の有無により表面電位の変化が示された。ICP-AES による定量分析の結果、紐状・網目状構造の有無により CaCO_3 の沈殿量の増加が確認された。誘電率測定により比誘電率を算出した結果、ペプチドよりも $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 水溶液の比誘電率が高いことが示された。HPLC による解析の結果、マイクロ波照射時と非照射時で消費されたペプチド量に差はほとんど見られなかった。以上より、ペプチドは核形成過程に関与しており、マイクロ波は結晶成長過程に関与していることが示唆された。

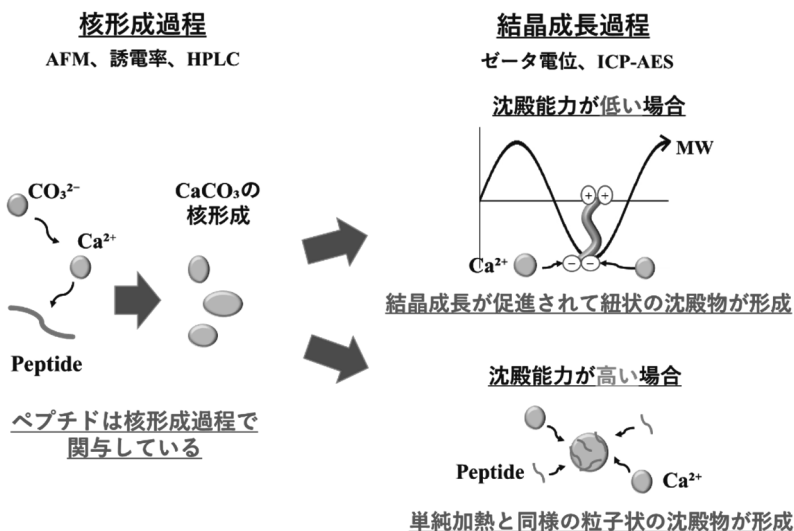


図 2.4 ミネラルゼーションにおける電磁波影響のまとめ

2-4-2. 今後の展開

実験の結果、ペプチドは核形成過程に関与しており、マイクロ波は結晶成長

過程に関与していることが示唆された。しかし、今回の実験のみではマイクロ波が単純な加熱だけではない影響を与えるメカニズムを解明するに至らなかった。したがって、今後沈殿物の結晶多形解析を行うとともに、直線偏波以外のマイクロ波照射条件と比較することで、マイクロ波の及ぼす効果のメカニズムを解明していきたい。マイクロ波の及ぼす効果が解明できれば、医学・工学など様々な分野へのマイクロ波の応用が期待できる。

2-5. 謝辞

本研究全般の遂行は、本学学生の尾崎誠氏、高坂翼氏が主に行った。ここに感謝の意を表明する。計画と研究のディスカッション・コーディネートをしてくださった株式会社ディーエスピーリサーチの中西伸浩氏、富樫浩行氏、皆木幸一氏、マイクロ波照射装置の作製・提供をして下さったミナト医科学株式会社の裏鍛武史氏、有本米次郎氏、電界強度測定をして下さった株式会社精工技研の大沢隆二氏、ならびに電子顕微鏡観察および御指導を頂きました龍谷大学理工学部 富崎欣也教授、龍谷大学理工学部 今井崇人実験助手に厚く御礼申し上げます。

2-6. 参考文献

- [1] *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **19**, 17904-17908 (2017).
- [2] *Chem. Commun.*, **48**, 1623-1637 (2012).
- [3] *RSC Adv.*, **6**, 48237-48244 (2016).
- [4] *Sci. Rep.*, **7**, 41244 (2017).
- [5] *Chem. Rev.*, **108**, 4754-4783 (2008).
- [6] *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 2876-2879 (2006).
- [7] *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6**, 3132-3140 (2014).
- [8] *Science*, **324** 1051-1055 (2009)
- [9] *Protein Pept. Lett.*, **25**, 42-47 (2018).
- [10] 日本電磁波エネルギー応用学会, **1**, 17-24 (2017).
- [11] *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University, Press: New. York, (2000).
- [12] *Faraday Discuss.*, **159**, 483-494 (2012).

- [13] ”バイオミネラルゼーションとそれに倣う新規能材料の創製”，
第2編 第1章 第2節，シーエムシー出版，p.110-117 (2007)

