

学術論文

生体分子の挙動解析研究を目標とした
マイクロ波照射システムの開発
～ペプチドのバイオミネラリゼーションにおける
マイクロ波影響解析をモデルとして～

(Microwave irradiation systems for analyses of biomolecular behaviors)

臼井 健二^{1,2,*#}、 富樫 浩行^{1,2,3#}、 圓東 那津実¹、 尾崎 誠¹、 有本 米次郎⁴、
裏鍛 武史⁴、 大沢 隆二⁵、 皆木 幸一³、 中西 伸浩^{2,3}、 梅谷 智弘^{2,6*}
K. Usui^{1,2,*#}, H. Togashi^{1,2,3#}, N. Endo¹, M. Ozaki¹, Y. Arimoto⁴, T. Uraka⁴, R. Osawa⁵, K. Minaki³,
N. Nakanishi^{2,3}, T. Umetani^{2,6*}

1. 甲南大学フロンティアサイエンス学部、 2. 非電離放射線生体環境総合研究所、 3. 株式会社ディーエスピーリサーチ、 4. ミナト医科学株式会社、 5. 株式会社精工技研、 6. 甲南大学知能情報学部

1., 2. 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 7-1-20、 3. 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 1-4-3、 4. 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 5-2-10、 5. 〒270-2214 千葉県松戸市松飛台 296-1、 6. 〒658-8501 兵庫県神戸市東灘区岡本 8-9-1

1. Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan Univ., 7-1-20, Minatojima Minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047 Japan
2. Research Institute for Nanobio-environment and Non-Ionizing Radiation (RINNIR), Konan Univ., 7-1-20, Minatojima Minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047 Japan
3. DSP Research, Inc., 1-4-3, Minatojima Minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047 Japan
4. Minato Medical Science Co., Ltd., 5-2-10, Minatojima Minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0047 Japan
5. Seikoh Giken Co, Ltd., 296-1, Matsuhidai, Matsudo, Chiba 270-2214 Japan
6. Faculty of Intelligence and Informatics, Konan Univ., 8-9-1, Okamoto, Higashinada-ku, Kobe, Hyogo 658-8501 Japan

corresponding author*, e-mail address : kusui@center.konan-u.ac.jp, umetani@konan-u.ac.jp

These authors equally contributed to this work.

キーワード：生体分子、マイクロ波、照射装置、偏波、ペプチド、バイオミネラリゼーション

Keywords: biomolecule, microwave, irradiator, polarized wave, peptide, biomineralization

Abstract

There are a lot of epidemiology studies focused on the effects of microwave in life phenomena; however, there are few studies about effects on biomolecular behaviors by microwave irradiation. We constructed microwave irradiation systems for detailed analyses of biomolecular behaviors in this study. We developed a one-direction linear-polarized microwave irradiator with a linear polarization antenna, and a two-direction linear-polarized microwave irradiator with two linear polarization antennas. Finally, a study about influence of microwave in biomineralization, an example of the effects on biomolecular behaviors in life phenomena, was conducted with a precipitating peptide using the developed microwave irradiation systems. Throughout this study, the linear-polarized microwave irradiation systems would be one of the most powerful tools for studies about life and biological phenomena as well as biomolecular behaviors.

1. 緒言

マイクロ波は携帯電話や電子レンジ、マイクロ波治療など身の回りの様々な技術に利用されている。これら機器から発射されるマイクロ波においては、人体への悪影響が懸念されており、国際的な規制の対象となっている。人体への悪影響に関する学術的な報告例としては、C. Robinette らによる強いマイクロ波に長期間暴露された人々のがん罹患率が高いという報告[1]、携帯電話を長時間利用する人々の脳腫瘍罹患率が高いという報告[2]などが挙げられる。その一方で、疫学研究論文 219 件を抽出し、若年者への脳腫瘍への影響について取りまとめた論文[3]からは、罹患率の上昇を認めず、携帯電話使用に伴う関連性も認められていないとの報告もある。医療や産業への応用も近年注目を集めており、マイクロ波の生体への透過性と加熱能から整形外科の加温治療や肺がんの治療[4]などにも用いられている。また、産業分野における応用例としては、無機材料及び有機材料の合成[5-9]、ペプチド合成[10]などにも用いられている。

しかしながら、生命科学分野の学術的な報告においては、がん以外の他の多くの疾患及び生命現象に対する影響についての詳細報告は少ないのが現状である。また、それら多くの報告は、医療応用などへの根拠ともなるが、統計学的知見に基づくものが多く、例えば分子レベルにおける影響まで詳細に解析している報告はさらに少ない。

そこで、我々は、疾患あるいは生命現象に対するマイクロ波照射による影響の詳細解析研究を目指すことにした。疾患あるいは生命現象は生命体の最小単位で

ある細胞の生理的活動や応答によって成り立っている。それら生理的活動や応答は、タンパク質を中心とした生体分子がさまざまに働くことによって発現している。よって、詳細解析を行うためには、関与する種々の生体分子の挙動を様々な角度から解析研究することが必要となる。このような研究を行う重要な第一歩あるいは大前提として、生体分子試料に定量的にマイクロ波を照射する必要が生じてくる。このような観点のもと、我々はまず、生体分子試料解析用のマイクロ波照射システムの開発を行うことにした。

ここで、代表的な汎用装置としては、いわゆる電子レンジのようなマイクロ波照射装置が挙げられる。しかしながら、高出力のマイクロ波を反射・散乱させ試料に照射させる原理であるため、マイクロ波の高周波出力は制御できても、試料に実際に照射されたマイクロ波のエネルギー量や方向の制御は非常に難しく、生体分子に与える影響を詳細に考察するには不向きである。そこで、マイクロ波の出力を調整でき、それによって、照射量や照射方向を細かく制御できる照射装置の開発を新たに行うことにした。マイクロ波発生源としては、マイクロ波治療に用いられるマグネトロン発振器を採用し、一定の方向に照射できるよう直線偏波アンテナを組み合わせることを考えた (Fig. 1a)。マイクロ波を特定の方向からのみ照射すれば、生体分子の挙動に特定の方向性が生じることが考えられ、これによりマイクロ波特性と生体分子挙動の相関が比較的観察しやすい条件となることが期待できる。さらに、その相関をより明確に、より詳細に解析する目的で高周

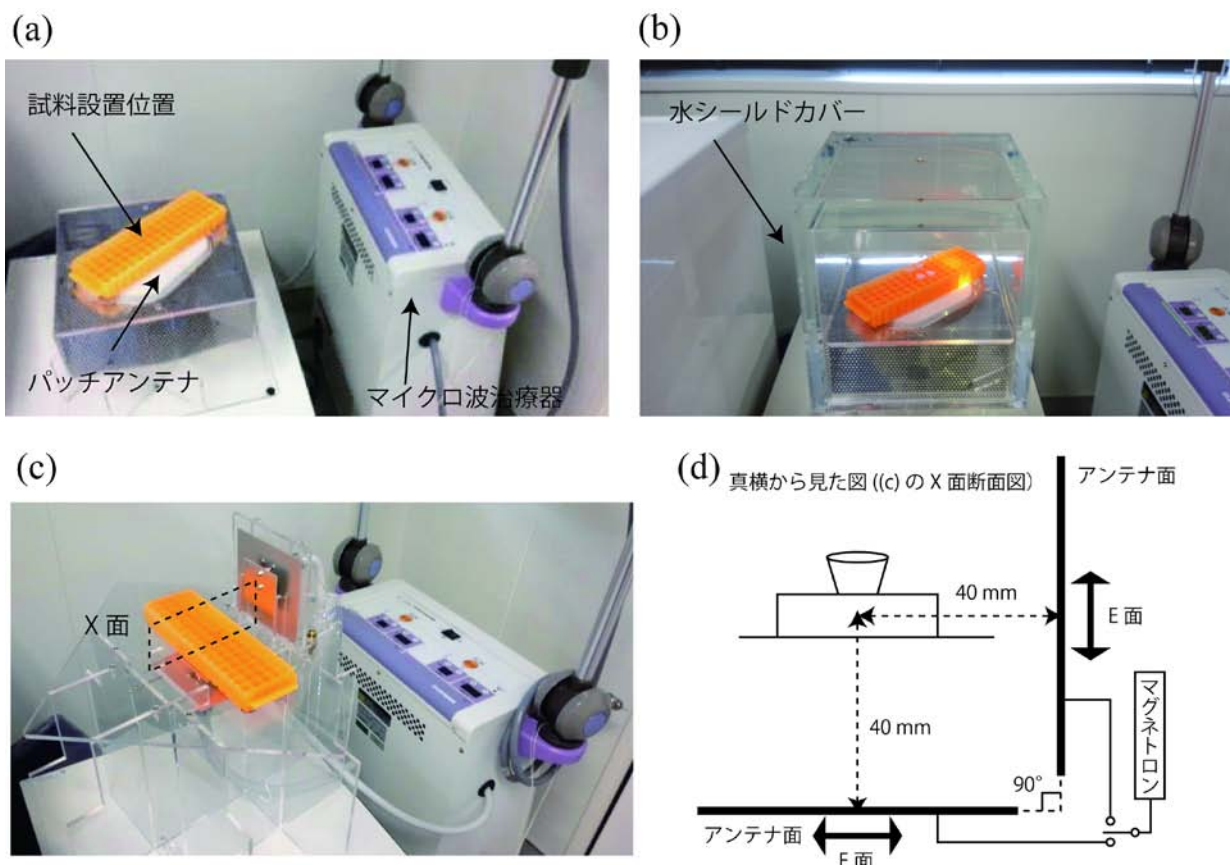


Fig. 1: Microwave irradiation systems in this study, (a) a one-direction linear-polarized irradiation system, (b) the system and a water-shield cover and (c) a two-direction linear-polarized irradiation system. (d) a cross-section view of a two-direction linear-polarized irradiation system along the plane X in (c).

波出力を変え試料に照射できるようにした。次に、マイクロ波を一方向から照射した際の生体分子の挙動が、マイクロ波照射によるものであると裏付けるために、複数方向からマイクロ波を試料に照射する装置の開発を試みた。具体的には、前述の一方向からの直線偏波照射が可能な装置にもう1台の直線偏波アンテナを配置した二方向から直線偏波を照射する装置を作製した (Fig. 1cd)。さらに実際にこれら2種類の装置を用いた生命現象への影響研究のモデル実験として、ペプチドのバイオミネラルゼーション[11-14]における、マイクロ波の影響に関する解析研究を行うことにした。

本研究を通して、マイクロ波照射装置および試料への照射方法などが確立できれば、バイオミネラルゼーションのみならず、様々な生命現象に関与する生体分子への影響の詳細研究が可能となる。こうした知見を集積していけば、電波がもたらす生体への影響とその

メカニズムの解明が可能になると考えられる。また本研究で開発した装置は、研究分野にとどまらず、医療分野をはじめ様々な用途に用いられると考えられる。

2. 方法

2-1. 一方向直線偏波照射システムの開発

2-1-1. 一方向直線偏波照射システム

マイクロ波治療器のマグネトロンをマイクロ波発振源とし、直線偏波アンテナを組み合わせた照射装置の仕様は次のとおりである。

- ・出力：10 - 200 W (10 W ステップ)
- ・周波数：2450 MHz \pm 50 MHz
- ・照射アンテナ：直線偏波パッチアンテナ
- ・シールド装置：水シールドカバー

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

る構造とした (Fig. 1a)。なお、マイクロ波は交流電源周波数に合わせて、60Hz の周期で照射を on/off させる仕様となっている。

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、1面は開口、残りの5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を構成する (Fig. 1b)。

2-1-2. 電界強度計測機器

マイクロ波照射装置から照射されるマイクロ波の試料近傍における電界強度を測定するために用いた電界強度計測装置の仕様は次のとおりである。

- ・測定周波数範囲：100 kHz ~ 10 GHz
- ・測定電界強度範囲：0.5 ~ 25 kV/m

この電界強度計測装置は、1軸のセンサヘッド、コントローラ及び光ファイバによって構成されている。それぞれの仕様は次のとおりである。

- ・センサヘッド

型番：CS-1403 (精工技研製)

筐体寸法：6 x 6 x 23 mm

導波部：Mach-Zehnder 型

素子材料：LiNbO₃ 結晶

アンテナ部寸法：

アンテナ長：2.5 mm

電極長：1.5 mm

- ・コントローラ

型番：C3-1055 (精工技研製)

筐体寸法：W 430 x L 450 x H 130 mm

出射レーザー光：波長 1.55 μm、20 mW (レーザー光漏れ防止プロテクション付き)

- ・光ファイバ

直径 3 mm シングルモード (石英ガラス)

なお、本論文での計測結果の数値はすべて実効値で表している。

2-2. 二方向直線偏波照射システムの開発

2-2-1. 二方向直線偏波照射システム

マイクロ波治療器のマグネトロンをマイクロ波発振源とした二方向からの直線偏波照射が可能となるようア

ンテナを2台使用した照射システムの仕様は次のとおりである。

- ・出力：10 - 200 W (10 W ステップ)
- ・周波数：2450 MHz ± 50 MHz
- ・照射アンテナ：直線偏波パッチアンテナ (2対を 90度の挟角で設置)
- ・照射方法：60 Hz 周期で交互にマイクロ波を照射
- ・シールド装置：水シールドカバー

基本仕様は 2-1-1. で示したマイクロ波照射装置と同様であるが、試料へのマイクロ波の照射方法を一方向からの直線偏波照射から二方向からの直線偏波照射へ変更した点が異なる。すなわち、2対の直線偏波パッチアンテナを使用し、それらを 90度の挟角で固定した。また、試料を入れたマイクロチューブは、各アンテナの給電点からの距離が等しく、かつ主輻射軸が交差する位置に設置した (Fig. 1cd)。なお、マイクロ波は交流電源周波数に合わせて、60Hz の周期で照射を on/off させ、二方向の場合は、干渉を防ぐためにそれぞれを 180° 位相をずらした形で、交互に照射される仕様となっている。さらに、シールド装置は一方向直線偏波実験と同様の装置を使用した。

2-2-2. 電界強度計測機器

開発した二方向直線偏波照射システムから照射されるマイクロ波の試料近傍における電界強度を測定するために用いた電界強度計測装置は、2-1-2. で挙げた装置を使用した。

3. 結果と考察

3-1. 一方向直線偏波照射システム

3-1-1. 一方向直線偏波照射システムの開発

ミナト医科学製のマイクロ波治療器に着目し、そのマイクロ波発生装置及び直線偏波パッチアンテナを組み合わせた照射システムの開発を行った。この治療器のマグネトロンは、実装されている2つのアンテナ (2チャンネル) に対して、商用電源の周波数で交互に切替わる仕様となっている。そこで、作製する一方向直線偏波照射システムにおいては、1チャンネルのみにマイクロ波を出力するようにプログラミングを行った。また、直線偏波アンテナは、マイクロ波治療器のアン

テナをそのまま用いた。アンテナの主輻射軸上にアンテナ給電点からマイクロチューブまでの距離が 35 mm となるようにマイクロチューブ立てを固定する置台を設置した。なお、マイクロチューブは通常の市販のもので使用可能であった。しかし、マイクロチューブ立てにおいては、一部、マイクロ波を吸収し、加熱、変形するものが見られた。そこで、このようなことが起こらないチューブ立てを実際にマイクロ波照射システムに設置して温度を測ることで選定した。

次に、水シールドカバーを作製した。これは、マイクロ波照射システムを設置する周辺環境によって、試料に照射されるマイクロ波の定量性が左右されないように開発を行ったものである。具体的には、放射される電波をある空間に閉じ込めることにより、外的要因を排除し、定量化を可能とした。シールドカバーとして反射型と吸収型が考えられるが、マイクロ波照射システムの高周波出力は最大 200 W であり、反射型では内壁での反射・散乱により試料への再照射への懸念があることから、吸収型を採用することとした。マイクロ波の吸収体としては、カーボン混合発泡材が入手しやすく加工性も良いためよく使われているが、今回の測定範囲である 200 W 付近においては発火の可能性があるため採用を見送った[15]。そこで我々はマイクロ波吸収体として、水を吸収体としたシールドカバーを採用することとした。水はマイクロ波に対しての反射もわずかであり、温度上昇においても水の対流により放熱性が大きく、限られた空間内での均一電界の再現性を得るための材料として非常に優れている。

以上のような装置を開発し、これらを組み合わせることによって Fig. 1a のような照射システムを構築した。

3-1-2. 一方向直線偏波照射システムの電界強度計測

次に、作製したマイクロ波照射システムの出力と試料近傍の電界強度との相関などのシステムの特性を調べることにした。本研究のような分子挙動解析においては、mm 単位の微小領域での 3 軸方向全ての電界強度測定が求められる。そこで、このような条件で正確に電界強度を測定する機器として、光電界センサを採用することにした。光電界センサは、ポッケルス効果により小型ダイポールアンテナで受信した電界を E/O 変

換し、強度変調光として出力する。こうすることで、センサの金属部分は、小型ダイポールアンテナ金属薄膜 (Au : 0.2 μm 厚) のみとなる。また、センサからの出力後は、石英ガラス製光ファイバにより信号伝送を行なう。以上より、マイクロ波に暴露される金属部分の面積は非常に小さくなり、電界を乱す要因は極めて限定的となり、電界強度測定の安定性や再現性につながる。

この装置を用いて、一方向直線偏波照射システムの出力と電界強度との相関を解析したところ、Fig. 2 のようになった。作製したシステムの出力をそれぞれ 10 W、30 W、100 W 及び 200 W に設定したときの、試料近傍の電界強度をそれぞれ測定した。その結果、作製したシステムの出力に応じて電界強度が線形的に増加していた。このことより、本システムを用いれば、生体分子挙動の影響の定量的解析が行えることが示唆された。さらに、各測定点での誤差も比較的小さかったことから、本システムによるマイクロ波照射の再現性は高いと言える。以上より、本研究では、一方向直線偏波照射システムの作製に成功した。本システムは、生体分子のマイクロ波に対する詳細な挙動解析を実施するために必要な定量性と安定性・再現性を備えていると言える。

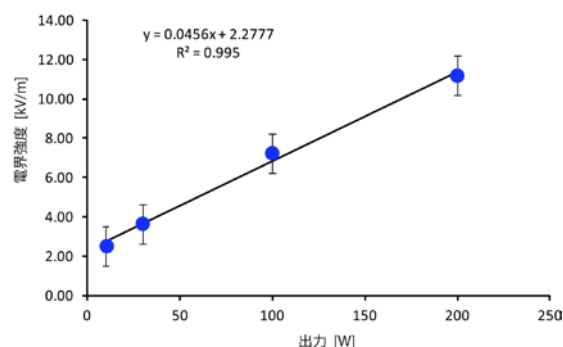


Fig. 2: Relationships between output power of the one-direction liner-polarized irradiation system and electric field strength around the sample.

3-2. 二方向直線偏波照射システム

3-2-1. 二方向直線偏波照射システムの開発

次に、マイクロ波を一方から照射した際の生体分子の挙動が、マイクロ波照射によるものであると裏付

けるために、複数方向からマイクロ波を試料に照射する二方向直線偏波照射システムの開発を試みた。二方向からの直線偏波を照射する際に問題となるのは2対のアンテナ同士による干渉である。当初はマグネトロンからのマイクロ波を2分配し、2つのアンテナから同時に電波を放射することで、試料に同時に二方向から照射させる計画であった。しかしながら、この仕様では、同時放射する2アンテナの側面から漏れる電波により、マグネトロンが飽和し、想定した電力を出力できなかった。そこで、本システム開発では、一方向直線偏波照射システムと同様に、ミナト医科学製のマイクロ波治療器を採用し、2チャンネルに出力される仕様となっている既存のプログラムをそのまま使用することにした。アンテナの設置については、直線偏波の偏波面を直角に交差させるよう、直線偏波パッチアンテナ2対を90度の挟角をもって設置した。これらを用いて交互に電波を出力させることでマグネトロンの飽和を抑えることにした。

また、試料を入れたマイクロチューブは、各アンテナの給電点からの距離が40 mmと等しく、かつ主放射軸が交差する位置に設置した。さらに、シールド装置は一方向直線偏波実験と同様の水シールドカバーを使用した。水シールドは、前述の通り、反射・散乱を最小限に抑えることが可能なので、マイクロ波を二方向からの直線偏波で照射している際の、アンテナ間のアイソレーションを確保でき、干渉を軽減できる。

以上のような装置を開発し、これらを組み合わせることによって Fig. 1cd のような照射システムを構築した。

3-2-2. 二方向直線偏波照射システムの電界強度計測

次に、作製したマイクロ波照射システムにおける試料近傍の電界強度分布を調べることにした。

作製したシステムは、3-1-1. と同様のシステムであり、出力に応じて電界強度が線型的に変化する。そのため、本実験では、2つのアンテナの主放射軸の交差点を中心として、前後左右40 mm (80 mm 四方) の水平面の電界強度分布を、双方のアンテナの出力を200 Wに固定して測定することとした。3-1-2. と同様の計測装置を用いて、測定したところ、Fig. 3 のようになっ

た。まず、試料を設置する主放射軸の交差点付近での電界強度が、電界強度分布中最大に近い値となることを確認した。このことより、試料測定位置では、双方の電波が干渉することなく照射されていることが示唆された。さらに試料測定位置 (Fig. 3 の0 mm×0 mmの位置) から20 mm四方においては、10%程度の強度差であり、これは3-1-2. における一方向直線偏波照射システムでの電界強度の相対誤差とほぼ一致している結果となった。以上より本システムは、生体分子挙動の詳細解析を実施するために必要な定量性と安定性・再現性を備えていることが示唆された。

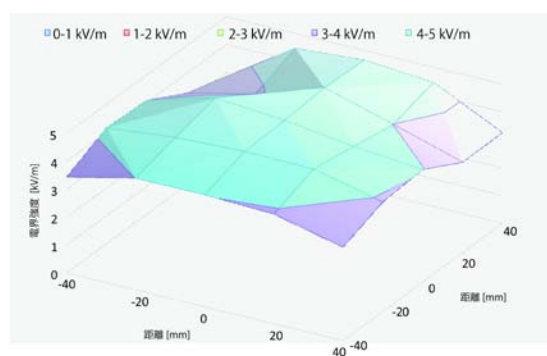


Fig. 3: Distribution of electric field strength in the two-direction linear-polarized irradiation system.

3-3. ペプチドのバイオミネラリゼーションにおけるマイクロ波影響解析

生体分子のマイクロ波照射における挙動解析研究の一例として、我々が最近研究を行っている、歯や骨などを構築する自己組織化メカニズムであるバイオミネラリゼーションへの影響研究を、実際に本システムを用いて行った。バイオミネラリゼーションは生体内でタンパク質・ペプチドがイオン状態の無機物を沈殿させ、組織を構築する分子レベルの反応であり、我々はペプチドを用いて、形状や沈殿量などのナノレベルでの制御を試みる研究を行っている[11-13]。

本システムを用いて、我々はまず、一方向からマイクロ波を直線的に照射しながらペプチドを用いた炭酸カルシウムのミネラリゼーションを行い、原子間力顕微鏡 (AFM)、透過型電子顕微鏡 (TEM)、動的光散乱

法 (DLS) などを用いて、ナノレベルでの構造観察を行った。その結果、微視的・局所的な測定法 (AFM, TEM) と巨視的な測定法 (DLS など) 両方による測定法において、一方向からのマイクロ波照射によるミネラル化への影響が示唆された。具体的には、単純加熱では粒子状の沈殿物が見られたのに対し、マイクロ波を照射した試料では、ひも状、網目状の形状といったマイクロ波の指向性が示唆される結果が得られた (Fig. 4)。

マイクロ波の偏波の影響を更に詳細に観測するために、高周波出力及び照射時間が単一方向照射と同条件となるように複数方向からマイクロ波を照射しその形状変化などを観測した結果、単一方向からのマイクロ波照射で見られた形状とは異なる沈殿物を観測した。

以上のように、今回開発を行ったシステムを用いたマイクロ波照射におけるミネラル化への影響については、単純加熱では見られない沈殿物がマイクロ波照射時では観測され、さらに、マイクロ波の偏波の違いでその形状も変化することが示唆された。よって、本システムを用いて、マイクロ波の照射偏波や出力などの条件を制御することで、バイオミネラル化のみならず、他の生体分子への影響解析研究が可能になると考えられる。

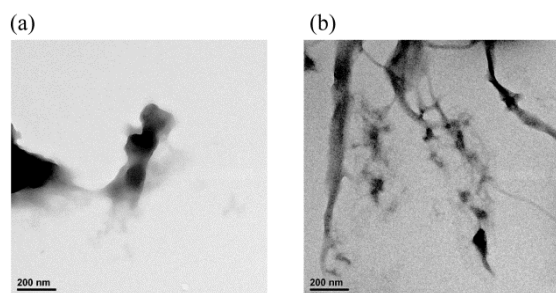


Fig. 4: TEM images of calcium carbonate precipitation using the peptide (a) at 90 °C without microwave irradiation and (b) at r.t. with 200 W microwave irradiation using the one-direction linear-polarized irradiation system.

4. 結言

本研究では、生体分子の挙動におけるマイクロ波の影響について、まず、照射方向や照射エネルギー量を制御できる新たな照射システムの開発を行った。その

結果、マイクロ波発振器および直線偏波アンテナを組み合わせた照射システムと、水シールドカバーから構成される生体分子照射システムの構築に成功した。次に、この照射システムを用いて、バイオミネラル化をモデルにマイクロ波の影響の分子レベルでの詳細解析研究を試みた。その結果、単純加熱では見られない沈殿物がマイクロ波照射時では観測でき、偏波の方向、電界強度を変化させると、沈殿物の形状も変化することが分かった。

今回題材として選んだバイオミネラル化におけるマイクロ波照射の影響については、歯や骨などの治療に役立つのみならず、無機材料開発や産業分野への応用などが考えられる。さらに、本システムを用いれば、マイクロ波の照射偏波や電力などの条件を制御することで、バイオミネラル化のみならず、他の生体分子への影響を解析したり、制御したりすることも可能であると考えられる。こうした知見を集積していけば、電波がもたらす生体への影響とそのメカニズムの解明が期待できる。

しかしながら、本システムはプロトタイプであり、改良の余地がある。具体的には、現状のマイクロ波の周波数成分の精度や、照射方向の精密さは今後、生体分子の精密・詳細解析を行う上で、不十分であると考えられる。今後はこれらを解決するために、これまでの知見を活かしながら、半導体型照射システムの開発を行っていききたい。

5. 謝辞

本研究は、甲南大学フロンティアサイエンス研究科の濱田芳男博士、龍谷大学理工学部の富崎欣也教授、今井崇人博士をはじめとする関係各位の協力により達成されたものです。これらの方々に感謝いたします。また、本研究の一部は、私立大学等経常費補助金特別補助「大学間連携等による共同研究」、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「分子ロボティクス」(15H00828)、カシオ科学振興財団「第30回(平成24年度)研究助成」、ひょうご科学技術協会「平成26年度学術研究助成」からの助成を受けたものであり、ここに感謝いたします。

引用文献

1. C. Robinette *et al.*, *Am. J. Epidemiol.*, **112**, (1980) 39-53.
2. M. Boniol *et al.*, *J. Neurooncol.*, **101**, (2011) 505-507.
3. 小島原典子 他, *保健医療科学*, **64**, (2015) 540-546.
4. 古川欣也 他, *肺癌*, **42**, (2002) 227-232.
5. C. Kappe, *Acc. Chem. Res.*, **46**, (2013) 1579-1587.
6. A. Sharma *et al.*, *Chem. Commun.*, **48**, (2012) 1623-1637.
7. S. Horikoshi *et al.*, *Nanoscale*, **3**, (2011) 1697-1702.
8. Y. Wada *et al.*, *Sci. Rep.*, **7**, (2017) 46512
doi: 10.1038/srep46512.
9. H. Goto *et al.*, *Materials*, **9**, (2016) pii: E169
doi: 10.3390/ma9030169.
10. S. Pedersen *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, (2012)
1826-1844.
11. M. Ozaki *et al.*, *Chem. Commun.*, **52**, (2016) 4010-4013.
12. K. Usui *et al.*, *Nanoscale*, **8**, (2016) 17081-17084.
13. 臼井健二 他, *化学工業*, **67**, (2016) 721-728.
14. M. B. Dickerson *et al.*, *Chem. Rev.*, **108**, (2008)
4935-4978.
15. 畠山賢一 他, “最新電波吸収体設計・応用技術”, シ
ーエムシー出版, (2008).

Manuscript received: October 13, 2017

Revised: November 27, 2017

Accepted: December 5, 2017