

総合研究所研究チーム研究

生体への影響解析のための電波照射装置の開発と 開発研究におけるアウトリーチ活動

甲南大学総合研究所

叢書 142

目次

第1章 緒言 (白井健二・梅谷智弘)

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
(白井健二)

第3章 電波影響解析における情報科学解析
～沈殿現象の顕微鏡画像を題材に～
(梅谷智弘)

第4章 開発研究におけるアウトリーチ活動
(梅谷智弘・白井健二)

第5章 結言 (白井健二・梅谷智弘)

第1章 緒言 (白井健二・梅谷智弘)

1-1. 目的

電磁波の生体への影響に関する研究は近年盛んに行われつつある。しかしながら、分子レベルでの詳細な計測・解析は、そのための装置が存在せず、ほとんど行われていない。そこで、本研究では、生体分子や生体サンプルなどへの電波影響解析に必要な電磁波照射装置を開発すること、そしてそれを用いた電磁波影響をミネラルゼーションという現象を題材に解析することを目的とした。また、本研究はいまだに広く世間には認知されていない。したがって、どのような活動を行えば、甲南発のプロジェクトとして認知されるのか、また「甲南といえば本研究のようなフロンティア研究」と、より効果的に認知されるのかといった、アウトリーチ活動の検討・実践も課題とした。本活動を通して、本研究が本学の代表的なフロンティア・学際研究となるよう、総合研究所研究チーム制度をうまく活用して進めてきた。その成果報告を本叢書にまとめた。

1-2. 概要

我々はすでに、生体分子や生体サンプルなどへの電磁波影響のメカニズム解析に必要な電磁波を照射する装置の開発を始めておりプロトタイプは完成している。しかしながら、このプロトタイプは電波を発生させる装置が旧式タイプのマグネトロン発生装置というものであり、これを新型の半導体発生装置に変更することをまずは試みた。この二つの電波の発生機構はまったく異なるため、今一度、半導体発生装置では、どのような波形、位相、出力の電波が発生するか、また、マグネトロンと比べて、物体への加熱具合などの特性はどう違うかなどを調べた。次にその半導体装置を用いて、実際の生命現象を題材に電磁波影響の解析研究を行った。題材の一例として、歯や骨の形成に代表されるようなカルシウム化合物の沈殿現象（ミネラルゼーション）を選択した。またその影響解析に欠かせない解析技術の一つに、ナノレベル観察用顕微鏡画像の解析技術がある。この解析技術を情報科学を駆使して確立するとともに、実際のミネラルゼーションにおけるナノ沈殿物の形状変化解析を試みた。また以上の研

2 生体への影響解析のための電波照射装置の開発と開発研究におけるアウトリーチ活動

究を中心に、そのアウトリーチ活動を行い、講演会・勉強会開催、異分野交流、学会・論文発表活動を精力的に行った。

本研究は、学際的かつフロンティアである、情報・生物・化学・物理の融合分野研究であり、理系の全ての分野の研究者が加わってはじめて行うことのできる研究テーマである。また、アウトリーチ活動においても、研究者各人での個別ノウハウは存在していても、それを総合的、有機的に結び付け、より効果的かつ効率的に進める研究はこれまで、なかなかされてこなかった。本研究を行うことで、様々なバックグラウンドを持った研究者が集まり、様々な考え方、意見を集約できた。その一端を報告する。

以上より、第2章では代表研究員である臼井が執筆して、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について述べる。第3章では研究員である梅谷が執筆して、第2章で得られた電波影響解析結果における情報科学解析について述べる。第4章では、梅谷と臼井が共同で執筆し、開発研究におけるアウトリーチ活動報告を中心に今後の在り方について考察したことを述べる。第5章では結言として、今後の展望などを述べたい。

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 (白井健二)

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、CaCO₃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]。CaCO₃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CaCO₃沈殿ペプチドを合成し、CaCO₃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CaCO₃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CaCO₃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CaCO₃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

4 生体への影響解析のための電波照射装置の開発と開発研究におけるアウトリーチ活動

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。

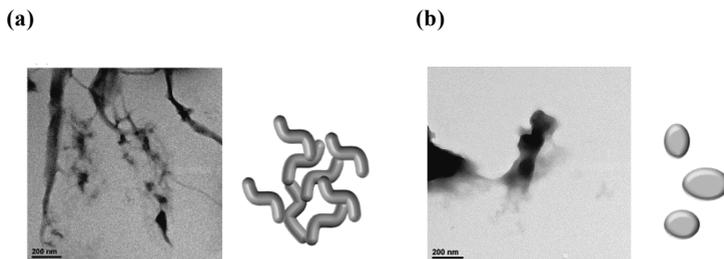


図 2.1 (a) マグネトロン電波発生装置 200W 出力における CaCO_3 沈殿の透過型電子顕微鏡画像^[10]。(b) 単純に 90°C に加熱した条件での CaCO_3 沈殿の透過型電子顕微鏡画像^[10]。

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。

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. CaCO₃の沈殿条件、電界強度・温度測定条件

CaCO₃沈殿ペプチド未添加条件では、Ca(HCO₃)₂の終濃度が150 μMとなるように調製し、3時間反応させた。CaCO₃沈殿ペプチド添加条件では、終濃度がペプチド1 μM - 100 μM、Ca(HCO₃)₂が0.15 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 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CaCO₃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 ± 5 MHz
マイクロ波出力	: 10 W ~ 60 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 ± 50 MHz
マイクロ波出力	: 10 W ~ 200 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-OH	Total charge -7
Ac-S peptide	Ac-S-S-E-D-D-D-D-D-OH	Total charge -8
pS peptide	H-pS-S-E-D-D-D-D-D-OH	Total charge -9
Ac-pS peptide	Ac-pS-S-E-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クラ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

マイクロ波非照射条件サンプルの TEM 観察を行った結果、37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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°C) 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°C と 90°C) 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 のミネラルリゼーションに与える影響

CaCO_3 のミネラルリ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 のミネラルリ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リ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。

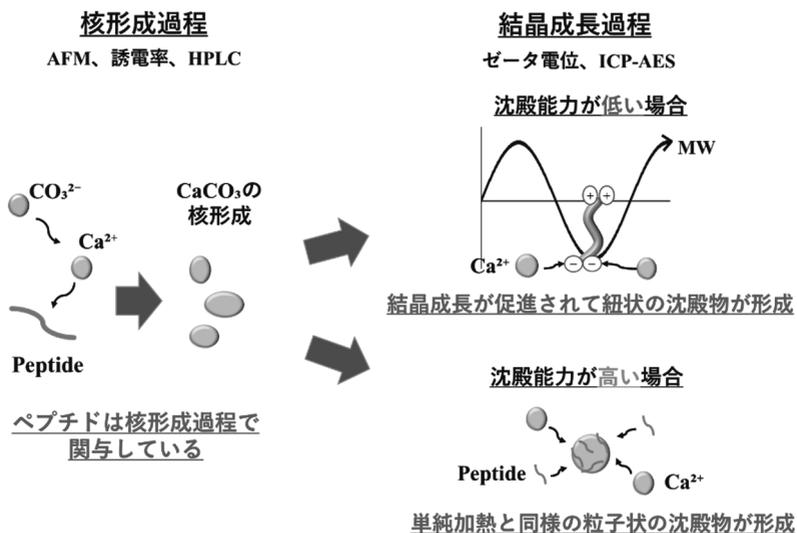


図 2.4 ミネラルゼーションにおける電磁波影響のまとめ

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・提供を下されたミナト医科学株式会社の裏鍛武史氏、有本米次郎氏、電界強度測定を下され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)

第3章 電波影響解析における情報科学解析 ～沈殿現象の顕微鏡画像を題材に～ (梅谷智弘)

3-1. はじめに

近年、電磁波による生体や生命現象への影響を詳細に解析する研究が行われている。その研究の一つとしてバイオミネラリゼーションという化学反応において生成物の形状や沈殿量などをナノレベルで制御を試みる研究が行われている。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は加熱することにより炭酸カルシウムを沈殿させる化学反応である。この反応において、加熱条件により炭酸カルシウム沈殿物の形状が異なることが生成物の電子顕微鏡画像より読み取れる。

通常加熱では粒子状の沈殿物が見られ、電磁波照射による加熱では網目状の形状が見られる。さらに二方向からの電磁波照射による加熱においても他の条件と形状が異なっている。ところで、この判断は顕微鏡画像を扱う研究者の視覚による主観的判断であり、加熱条件による沈殿の形状の違いを客観的に示す方法は確立できていない。詳細解析を行うにあたり客観的に加熱条件による分類を行うことが必要であり課題として挙げられている。一方ナノ材料分野において、電子顕微鏡画像の定量解析の手法として画像の周波数解析や特徴抽出があり^[2]、また、ウェーブレット解析などの信号処理や統計解析による手法が行われている^[3]。

本章では、顕微鏡画像に対する2次元フーリエ変換を用いて得られたパワースペクトルの特定の角度・特定の周期パワーに着目し、周期パワーの散布図により加熱条件の分類を客観的に行う方法を検討する。本稿での検討では同じ条件でも形状にはばらつきがあるため解析対象は目視による判断で典型例と思われる顕微鏡画像に限定する。パワースペクトルの組み合わせにより反応条件からの生成物の違いを識別できる可能性を実験により示す。

3-2. 方法

本章では、化学反応として、炭酸カルシウムのミネラリゼーション反応をとりあげ、各条件下における透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像を解析する。

3-2-1. 顕微鏡画像と反応条件

顕微鏡画像の条件を以下に示す。スケールは 1302.34 nm × 1302.34 nm、2048 × 2048 ピクセル、分解能は約 0.636 nm である。データ形式は 32 bit グレイスケール画像でファイル形式は電子顕微鏡画像のフォーマットである DM3 形式である。

反応条件を表 3.1 に示す。通常加熱は容器の表面を外部から加熱し熱伝導で内部を加熱する方法であり、電磁波照射による加熱は電磁波が容器を透過し物質の内部へ浸透・吸収され加熱する方法である^[4]。電磁波照射による加熱においては電界強度と電磁波照射装置の出力の間に線形性があるため^[1]、10 W、30 W、200 W を採用する。基準として室温で反応させた場合を用い、通常加熱による反応、電磁波照射による反応条件での生成物の電子顕微鏡画像を用いて分類する。なお、電磁波照射による反応時の温度変化は 10 W の電磁波照射時で 30°C、200W の電磁波照射時で 60°Cまで上昇する。対照群として、30°C、60°C の通常加熱、さらに、極端な温度変化の例として 90°Cで加熱反応させた条件を採用する。

表 3.1 : 反応生成物の加熱条件

反応条件	条件
室温	r. t. (room temperature)
通常加熱	30°C、60°C、90°C
電磁波照射 (1 方向)	10 W、30W、200W
電磁波照射 (2 方向)	200 × 200 W

3-2-2. 顕微鏡画像の周波数解析

分類の方法を図 3.1 に示す。顕微鏡画像に 2 次元フーリエ変換を求め、各角度 (0 deg, 15 deg, 30 deg,..., 90 deg) の低周波領域の周期パワーを求め、生成物の性質を調べるために角度ごとの周期パワーを比較する。この方法をもとに分類を行う。

分類の方法の流れを図 3.2 に示す。顕微鏡画像全体の輝度の平均値を求め減算し、輝度の平均値がゼロの画像を作成する。その画像に対して 2 次元フーリ

エ変換を行い、パワースペクトルを求める。パワースペクトルから特定の角度の長周期・中周期・短周期のパワーに着目しその散布図を求める。

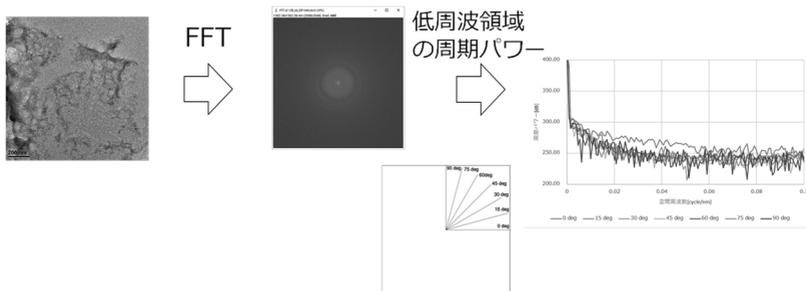


図 3.1 周波数解析の概略

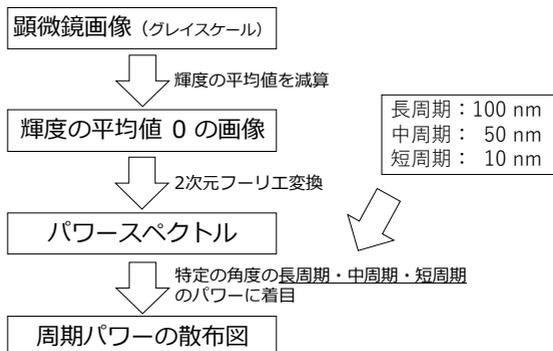


図 3.2 分類方法の概略

まず、前処理としてノイズの除去を行うため顕微鏡画像全体の輝度の平均値を求め、各輝度の値から求めた平均値を減算し輝度の平均値 0 の画像を取得する。作成した画像に対して 2 次元フーリエ変換を行い、対象画像の 2 次元パワースペクトルを得る。

次に、角度ごと（0 deg, 15 deg, 30 deg, ..., 90 deg）の周期 100 nm、50 nm、10 nm の周期パワーに着目し散布図を求める。周期パワーについては、各反応条件における各々の角度におけるパワースペクトルを求め比較し、特徴的であった目視可能な 100 nm、50 nm 成分（以下、長周期、中周期）、目視が困難である 10

nm のパワー成分（短周期）を選択した。反応条件による弁別特徴的な周期の自動検出は今後の課題である。また、1 条件のサンプルで 7 点得られることに注意する。顕微鏡画像によっては網目状の生成物が生じたり、生成物が等方ではなかったりするため角度ごとの周波数成分は異なる。また、同じ条件でも形状にばらつきがあり、反応生成物を捉えられていない場合もあるため、各条件における顕微鏡画像は事前に研究者によって典型例であると判断した画像を解析対象とし、通常加熱（60°C）は 1 枚、他の条件はそれぞれ 3 枚使用する。

3-3. 実験の結果

本節では解析実験の結果を説明する。全加熱条件を散布図で解釈するのは困難なため、全加熱条件での解釈も行うが通常加熱、電磁波照射による加熱、同じ温度変化での加熱といったようにわけて解釈も行う。

3-3-1. 全加熱条件

長周期と中周期のパワーの散布図（全加熱条件）を図 3.3 に示す。室温条件を挟んで電磁波照射（10 W）、電磁波照射（200 W）の分布が両側に広がっている。90°Cには極端に高いパワーが存在する。

長周期と短周期のパワーの散布図（全加熱条件）を図 3.4 に示す。室温条件

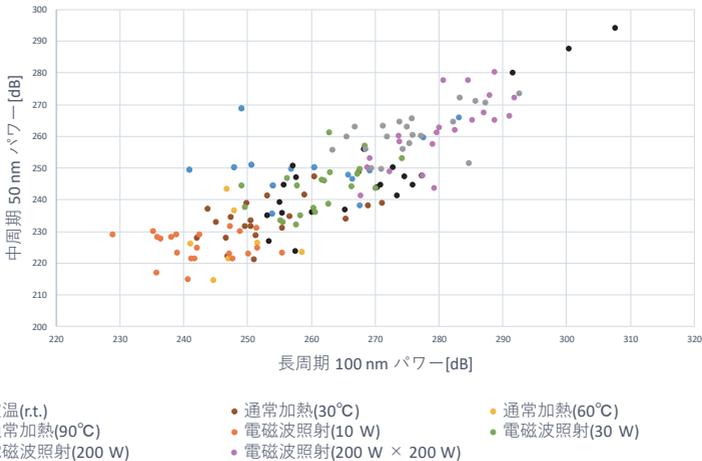


図 3.3 長周期と中周期のパワーの散布図（全加熱条件）

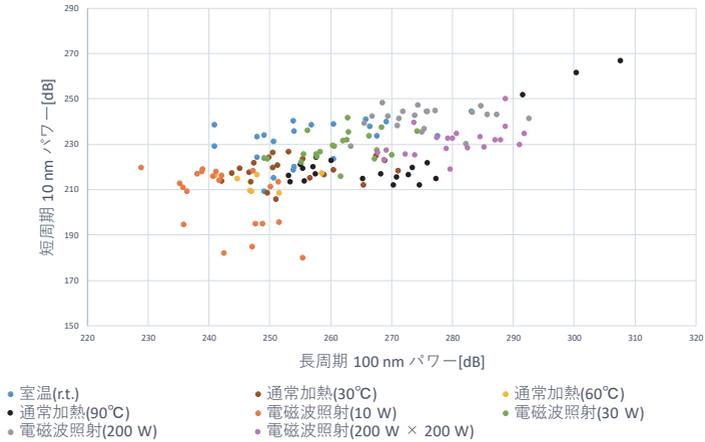


図 3.4 長周期と短周期のパワーの散布図（全加熱条件）

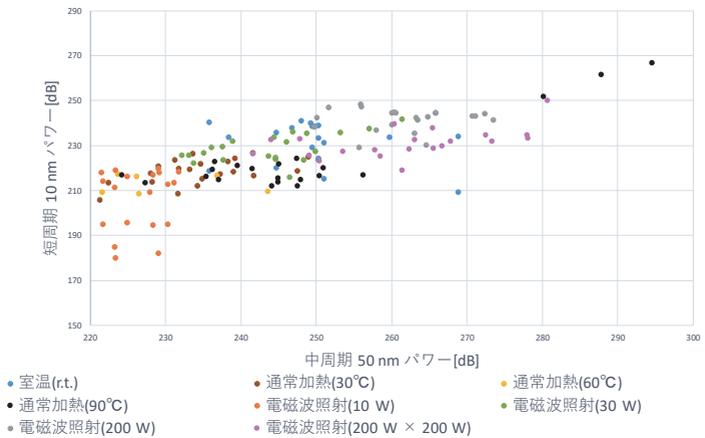


図 3.5 中周期と短周期のパワーの散布図（全加熱条件）

を電磁波照射（10 W）と電磁波照射（200 W）が挟むような分布となっている。室温はほぼ同じパワーで電磁波照射については中周期のパワーのほうが大きい。90°C加熱では極端の高いパワーが存在する。

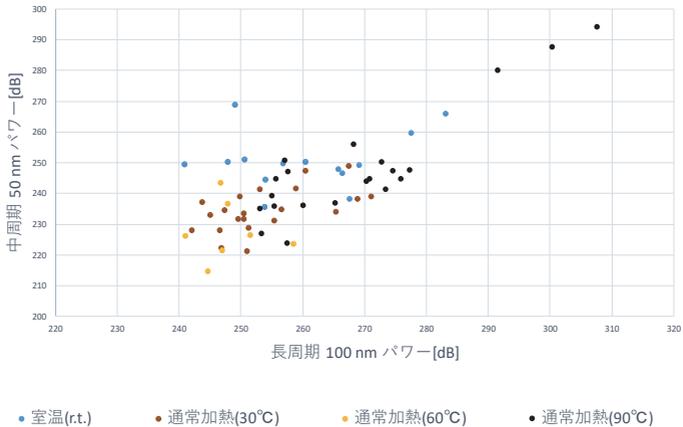


図 3.6 長周期と中周期のパワーの散布図（通常加熱）

中周期と短周期のパワーの散布図（全加熱条件）を図 3.5 に示す。室温条件を電磁波照射（10 W）と電磁波照射（200 W）が挟むような分布を示している。90°C加熱では極端に高いパワーが存在する。

3-3-2. 通常加熱の場合

長周期と中周期のパワーの散布図（通常加熱）を図 3.6 に示す。通常加熱（90°C）には極端に高い周期パワーが存在する。特定の領域に全条件ほとんどの周期パワーが分布しており、重なりがみられる。

長周期と短周期のパワーの散布図（通常加熱）を図 3.7 に示す。通常加熱（90°C）には極端に高い周期パワーが存在する。それらの周期パワーを除くと室温条件の短周期パワーは他の条件より大きいことがわかる。

中周期と短周期のパワーの散布図（通常加熱）を図 3.8 に示す。通常加熱（90°C）には極端に高い周期パワーが存在する。通常加熱（90°C）の極端に高い周期パワーと室温条件以外の周期パワーが室温条件を挟む分布となっている。そのため室温条件に比べ相対的に小さな物質が析出しているといえる。

3-3-3. 電磁波照射

長周期と中周期のパワーの散布図（電磁波照射による加熱）を図 3.9 に示す。

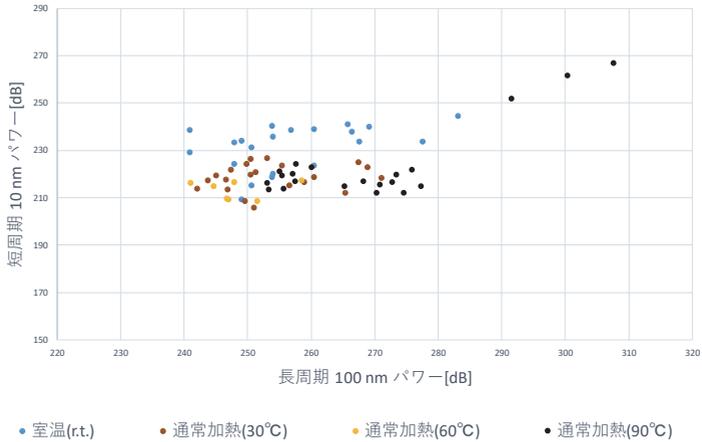


図 3.7 長周期と短周期のパワーの散布図（通常加熱）

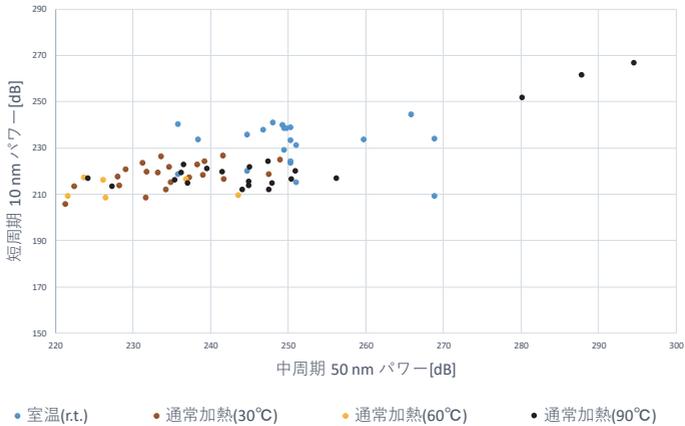


図 3.8 中周期と短周期のパワーの散布図（通常加熱）

室温条件を挟んで電磁波照射（10 W）、電磁波照射（200 W）の分布が両側に広がっている。また電磁波の出力が大きいかほど周期パワーも大きくなることが読み取れる。通常加熱の場合と比べると周期パワーの分布の違いが明らかにあら

22 生体への影響解析のための電波照射装置の開発と開発研究におけるアウトリーチ活動

われている。

長周期と短周期のパワーの散布図（電磁波照射による加熱）を図 3.10 に示す。室温条件を挟んで電磁波照射（10 W）、電磁波照射（200 W）の分布が両側に広

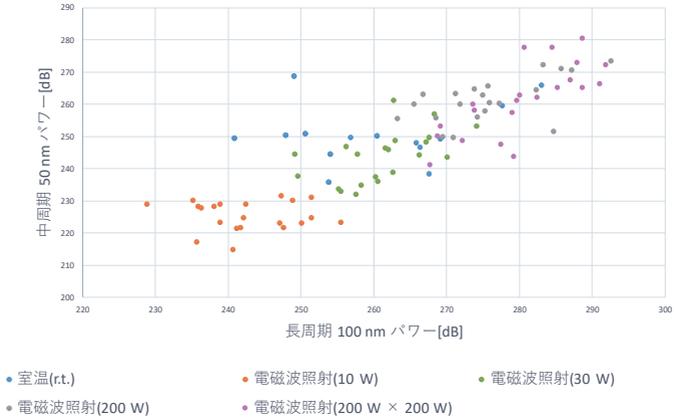


図 3.9 長周期と中周期のパワーの散布図（電磁波照射）

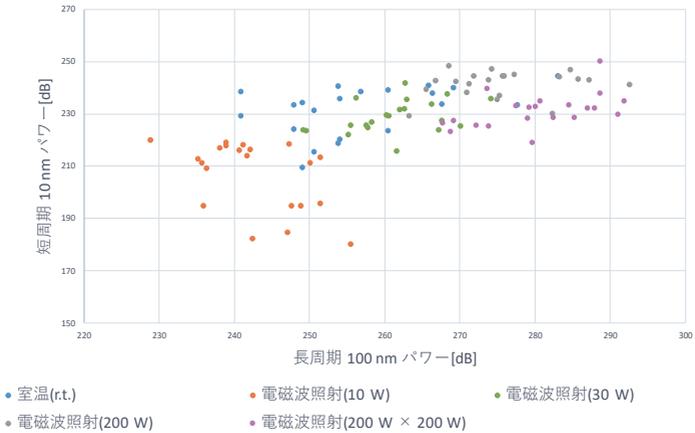


図 3.10 長周期と短周期のパワーの散布図（電磁波照射）

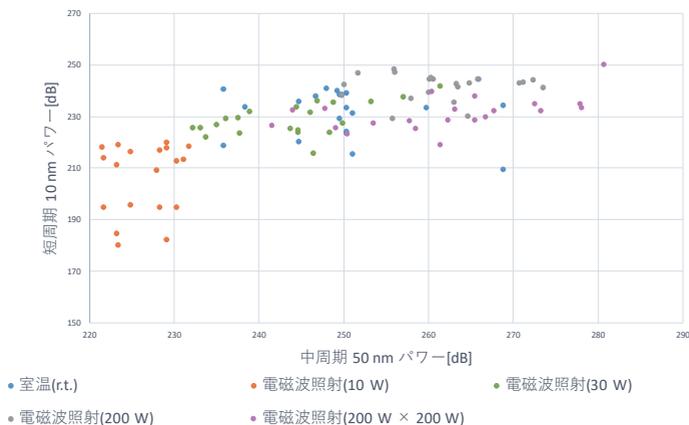


図 3.11 中周期と短周期のパワーの散布図（電磁波照射）

がっている。また電磁波の出力が大きいかほど周期パワーも大きくなることが読み取れる。通常加熱の場合と比べると周期パワーの分布の違いが明白にあらわれている。

中周期と短周期のパワーの散布図(電磁波照射による加熱)を図 3.11 に示す。室温条件を挟んで電磁波照射（10 W）、電磁波照射（200 W）の分布が両側に広がっている。また電磁波の出力が大きいかほど周期パワーも大きくなることが読み取れる。通常加熱の場合と比べると周期パワーの分布の違いが明白にあらわれている。

今後、二方向からの電磁波照射については出力を変えた条件を追加し検証することが課題である。

3-3-4. 同じ温度変化の加熱

電磁波照射による反応時の温度変化は 10 W の電磁波照射時で 30℃、200W の電磁波照射時で 60℃まで上昇する。対照群として、通常加熱（30℃）、通常加熱（60℃）を用いる。

長周期と中周期のパワーの散布図（温度変化 60℃）を図 3.12 に示す。通常加熱（60℃）の周期パワーより電磁波照射（200 W）の周期パワーの方が大きいこ

24 生体への影響解析のための電波照射装置の開発と開発研究におけるアウトリーチ活動

とがわかる。通常加熱（30°C）と電磁波照射（10 W）では通常加熱（30°C）の方が周期パワーは大きい。

長周期と短周期のパワーの散布図（温度変化 60°C）を図 3.13 に示す。通常加

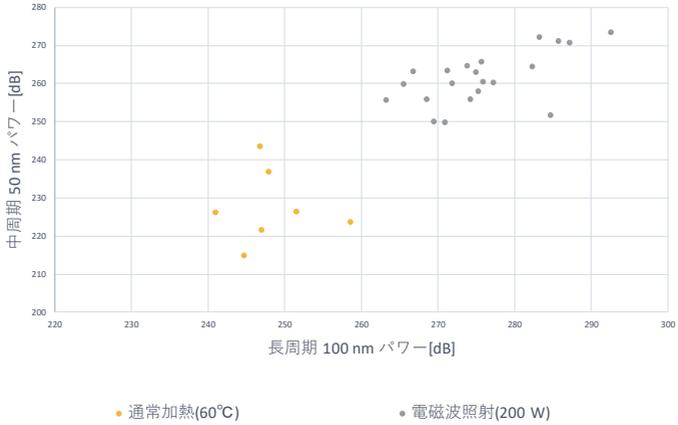


図 3.12 長周期と中周期のパワーの散布図（温度変化 60°C）

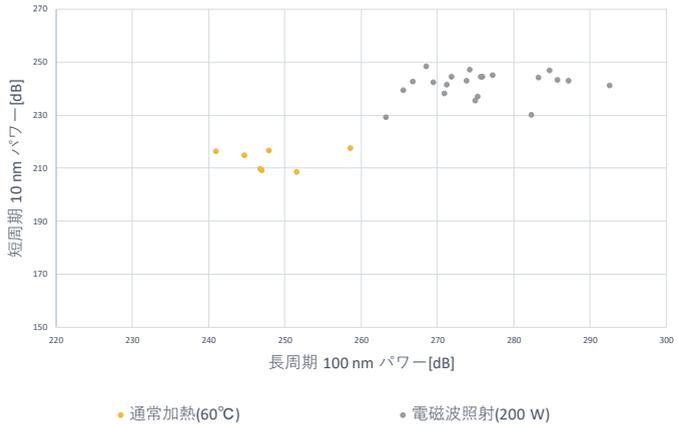


図 3.13 長周期と短周期のパワーの散布図（温度変化 60°C）

熱（60℃）の周期パワーより電磁波照射（200 W）の周期パワーの方が大きいことがわかる。通常加熱（30℃）と電磁波照射（10 W）では通常加熱（30℃）の方が周期パワーは大きい。

中周期と短周期のパワーの散布図（温度変化 60℃）を図 3.14 に示す。通常加

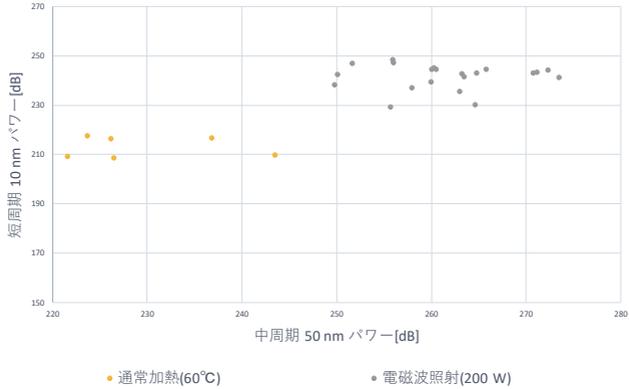


図 3.14 中周期と短周期のパワーの散布図（温度変化 60℃）

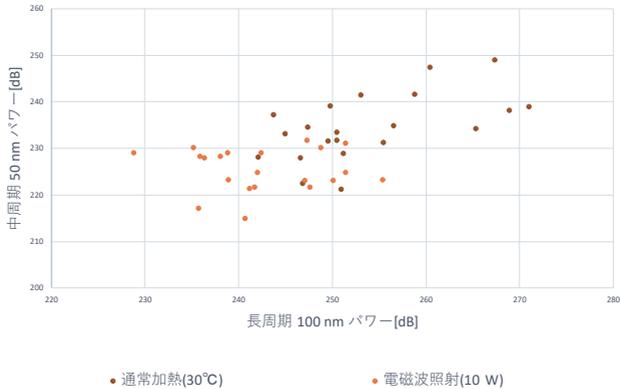


図 3.15 長周期と中周期のパワーの散布図（温度変化 30℃）

26 生体への影響解析のための電波照射装置の開発と開発研究におけるアウトリーチ活動

熱 (60°C) の周期パワーより電磁波照射 (200 W) の周期パワーの方が大きいことがわかる。通常加熱 (30°C) と電磁波照射 (10 W) では通常加熱 (30°C) の方が周期パワーは大きい。

また、温度変化が 30°C となる長周期と中周期のパワーの散布図を図 3.15、長

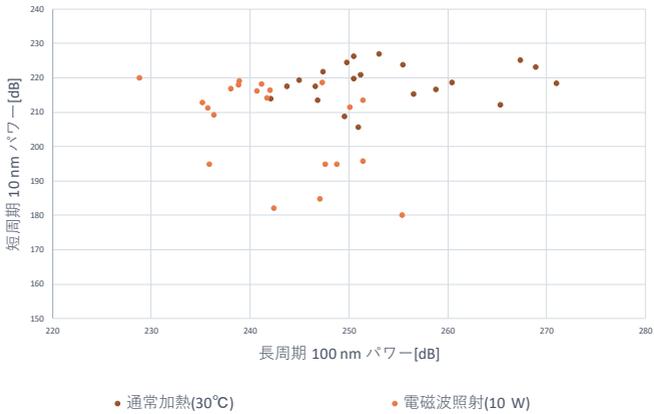


図 3.16 長周期と短周期のパワーの散布図 (温度変化 30°C)

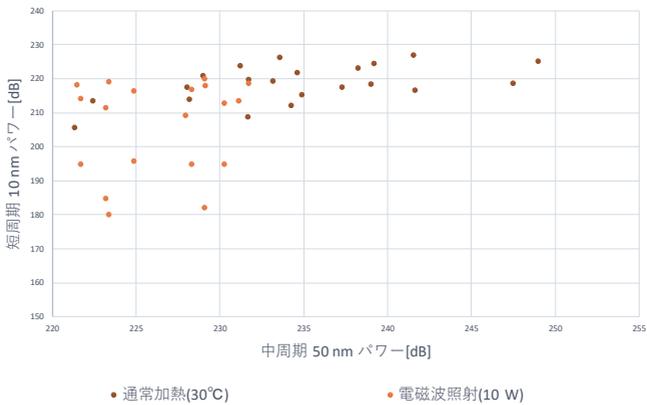


図 3.17 中周期と短周期のパワーの散布図 (温度変化 30°C)

周期と短周期のパワーの散布図を図 3.16、中周期と短周期のパワーの散布図を図 3.17 にそれぞれ示す。いずれの場合でも、電磁波照射（10 W）より通常加熱（30°C）の方が周期パワーは大きくなっていることが図より読み取れる。

3-4 実験の考察

今回の実験では、目視による分類の判断と各条件の散布図の分布の違いが一致することから定量的な分類が行えており、目視での定評評価と類似の議論ができる可能性が示された。また、パワーの分布は妥当であると考えられる。

通常加熱についてはほぼ変化しないものの、散布図内で片方の軸は変化せず、もう片方の軸が変化する動きがある。電磁波照射による加熱では電磁波の強さに応じて画像のパワーが変化しており画像においても各成分での大きい物質が析出している可能性が示された電磁波の強度で生成の制御が行える可能性が示唆された。

以上より、各々の成分の比較や周期成分の比などを指標に分類できると思われる。たとえば、図 3.5 の中周期と短周期のパワーの比較において、室温条件と他の条件の分布を比較すると、中周期のパワーが短周期のパワーより大きく異なっていることから他の条件のほうが相対的に大きな物質が析出しているといえる。

今後は分類が困難なものについては着目する周期を変えて分類できるかどうかを検証する。また、別の周波数解析による分類方法の検討や機械学習の導入、顕微鏡画像のサンプル数の増加による本手法の有効性の検証、他の反応系での手法の適応などが課題である。

3-5. 結論

本章では、電子顕微鏡画像に対する 2 次元フーリエ変換を用いて得られたパワースペクトルの特定の角度・特定の周期パワーに着目した散布図により加熱条件の分類を客観的に行う方法について検討した。全加熱条件、通常加熱、電磁波照射による加熱、同じ温度変化での加熱の分類実験により、目視による観察と同様の検討が行える可能性を示した。

今後は分類が困難なものについて、着目する周期を変えて分類できるかどうかを検証する。別の周波数解析による分類方法の検討、機械学習の適応、顕微

鏡画像のサンプル数を増やすことなどにより本手法の有効性を検証することなどが課題である。さらに別の反応系での電子顕微鏡画像に適応し本分類手法の可能性を検証する。

3-6. 謝辞

本研究全般の遂行は、本学学生の中田圭祐氏が主に行った。ここに感謝の意を表明する。

3-7. 参考文献

- [1] 日本電磁波エネルギー応用学会論文誌, **1**, 17-24 (2017).
- [2] 顕微鏡, **44**, 47-51 (2009).
- [3] 顕微鏡, **46**, 24-29 (2011).
- [4] マイクロ波の化学プロセスへの応用, シーエムシー出版 (2011).

第4章 開発研究におけるアウトリーチ活動 (梅谷智弘・臼井健二)

4-1. はじめに

本章では、甲南発のプロジェクトとして、また「甲南といえば本研究のようなフロンティア研究」などと、より効果的に認知されることを目的とした、本研究課題に関連して行ったアウトリーチ活動について報告する。ナノバイオ交流会、勉強会、座談会の開催状況を説明し、直接的な研究成果だけでなく、あらたな研究テーマの開始など、次の課題につながる成果が得られたことを紹介する。

4-2. ナノバイオ交流会・勉強会・座談会開催報告

4-2-1. 2018年度の活動

2018年8月1日(水)、ナノバイオ交流会と題して、本テーマ共同研究者の梅谷の講演と、ナノバイオ工学、機械工学分野に幅広く精通しておられる、龍谷大学理工学部物質化学科の富崎欣也先生、東京農工大学生命工学専攻の川野竜司先生のご講演、そして学生たちによるポスター発表・交流会が行われた(図4.1)。梅谷は、「ロボット技術(RT)を利用したナノ材料反応システムの空間計測」というタイトルで、本テーマに関する報告を行い、アウトリーチ活動に努めた。次に、富崎欣也先生に、「ペプチド集合体が遺伝子を細胞内へ運ぶ」というタイトルで、川野竜司先生に「分子でロボットを造る!」というタイトルでそれぞれ講演していただき、学際的な総合研究・共同研究へ発展すべくディスカッションを行った。



図4.1 各講師の先生方(左から梅谷、富崎欣也先生、川野竜司先生)

講演の合間には、FIRST 学部 4 年生・大学院生の他、知能情報学部、東京農工大学の学生達が自分たちの研究成果を発表し、あうポスター発表会を行い、活発な意見交換を行っていただき、今後のテーマ遂行のヒントとなるトピックス、シーズの探索調査をその際に行わせていただいた(図 4.2)。



図 4.2 ポスター発表会

交流会終了後は、実際に先生方のアウトリーチ活動についての座談会を行わせていただいた(図 4.3)。今回は研究室の対外的な窓口となるホームページ作成について議論を交わした。研究室ホームページの充実は重要であるものの、その担い手は所属学生や共同研究者でウェブ作成に詳しい者に限られてしまうため、年ごとの



図 4.3 座談会

研究室体制に依存してしまう共通した懸念があることが分かった。各研究室で専門の人員をそろえるのは限界があるため、今後は大学全体でそのような専門の人員を確保して、複数の研究室のウェブサイトを一括して管理してもらうシステムの構築などが有用ではという結論に達した。

4-2-2. 2019 年度の活動

2019 年 9 月 20 日(金)、ナノバイオ交流会と題して、ナノバイオ工学、機械工学分野に幅広く精通しておられる、東京工業大学生命理工学院の堤浩先生、東京農工大学生命工学専攻の川野竜司先生のご講演、甲南大学フロンティアサイエンス学部の高嶋洋平講師の講演、そして学生たちによるポスター発表・交流会が行われた。堤先生は、「設計ペプチドライブラリ～ドラッグデリバリー材料からペプチド創薬まで～」というタイトルで、川野竜司先生に「人工細胞膜と膜ペプチド」というタイトルで、高嶋洋平講師に「イオン交換反応による多孔性金属錯体内への機能性物質の固定化と機能開拓」というタイトルでそれぞれ講演していただき、電磁波研究の応用研究が以上のようなテーマ内で遂行可

能かなどの調査を同時に行わせていただいた（図 4.4）。



図 4.4 各講師の先生方（左から堤浩先生、川野竜司先生、高嶋洋平講師）

講演の合間には、FIRST 学部 4 年生・大学院生の他、知能情報学部、東京農工大学の学生達が自分たちの研究成果を発表しあうポスター発表会を行い、活発な意見交換を行っていただいた。その際、本テーマ関連の発表も 2 件行い、実際のアウトリーチ活動を行った（図 4.5）。



図 4.5 ポスター発表会

交流会終了後は、2018 年度に引き続き、実際に先生方のアウトリーチ活動についての座談会を行わせていただいた。龍谷大富崎先生も加わり、今回は本交流会の評価を行っていただいた。このような比較的小規模で密に、多岐にわたる学際的な交流会は類を見ず、今後も続けていければ面白いという意見や、ここからさらに共同研究が発展していければという意見、様々な分野の研究者と



図 4.6 座談会

交流でき勉強になったという意見などが得られた。本テーマ終了後も引き続き同様の形態で行うことを考えていたが、2020 年 10 月現在、新型コロナウイルス感染拡大の影響で、コロナ禍での交流会の在り方が問われる形となってしまった。オンライン会議システムなどの活用が期待され、比較的遠隔でも簡単に会を開催できるようになった反面、未発表データの漏洩や既発表事項や画像などの著作権の問題なども考えられるようになり、今年度開催はどのようにする

か、本テーマ研究員で検討中である。

2019年11月には、細胞における電磁波影響研究の第一人者である京都大学生存圏研究所の浅野麻実子先生に、「マイクロ波精密照射による癌細胞の死滅メカニズムの解析—新規癌治療法確立に向けて」というタイトルでご講演いただき、勉強会を行



図 4.7 勉強会

った。本講演にお招きしたのがきっかけで、今後、浅野先生とは共同で電磁波影響研究を行っていくことにし、共同で2020年度以降の外部資金獲得申請を行うなど、活発に研究活動を発展させている。

4-3. 2018年度、2019年度の業績一覧

以下に2018年度、2019年度に臼井と梅谷が行った論文発表、学会発表として行ったアウトリーチ活動の成果をまとめる。

4-3-1. 論文発表

1. Yusuke Sekiya, Shungo Sakashita Keisuke Shimizu, Kenji Usui, Ryuji Kawano, *Analyst*, 143, 3540-3543 (2018)
2. Yuki Tominaga, Kenji Usui, Akiyoshi Hirata, Hiro-O Ito, Kiyoshi Nokihara, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26, 3210-3216 (2018)
3. Kin-ya Tomizaki, Yoshio Hamada, Kenji Usui, *Protein & Peptide Letters*, 25, 2-3 (2018)
4. Yoshio Hamada, Kenji Usui, *Neuromethods*, 132, 207-228 (2018)
5. Shungo Sakashita, Tamaki Endoh, Arisa Okada, Kenji Usui, *Peptide Science 2019*, 2019, 107-108 (2020)
6. Makoto Ozaki, Takaaki Tsuruoka, Takahito Imai, Kin-ya Tomizaki, Kenji Usui, *Peptide Science 2019*, 2019, 111-112 (2020)

4-3-2. 学会発表（主なもの）

1. The 26th American Peptide Symposium, Monterey, CA, USA 2019/06
臼井、協力研究学生（尾崎誠氏）が参加。4件発表。
2. 第3回ナノバイオ交流会、甲南大学PIキャンパス、兵庫、2019/09
臼井、梅谷、協力研究学生（中田圭祐氏、高坂翼氏）が参加。4件発表。

3. 第 56 回ペプチド討論会、東京医科歯科大学鈴木章夫記念講堂、東京
2019/10
臼井、協力研究学生（尾崎誠氏）が参加。6 件発表。
4. 第 13 回日本電磁波エネルギー応用学会シンポジウム、
産業技術総合研究所つくば中央共用講堂、茨城、2019/10
臼井が参加。1 件発表。
5. 日本化学会第 100 春季年会 2020、東京理科大学野田キャンパス、千葉
2020/03
臼井、協力研究学生（尾崎誠氏）が参加予定。
コロナ禍による中止だが既発表扱い。2 件発表。

4-4. 結論

本章では、本研究課題に関連して行ったアウトリーチ活動について述べた。本研究課題では、研究活動、領域を広げるために活発なアウトリーチ活動を実施できた。アウトリーチ活動を通して本研究テーマのアピールも大に行え、本研究チーム発足前よりも、研究組織の認知度は向上したといえる。一方、2020 年度も研究のアウトリーチ活動を継続して行う予定であったが、2020 年 10 月現在、コロナ禍による影響で、学会発表は大半がオンライン開催となってしまった。その結果、アウトリーチ活動においては対面よりも学会参加者に個別に話したり、アピールしたりする機会を失っているため、効果が半減しているように考える。代わりに本研究成果に関する論文投稿を数多くするようになったので、論文発表を通して、アウトリーチ活動を継続させていきたい。

第5章 結言（臼井健二・梅谷智弘）

本研究は、学際的かつフロンティアである、情報・生物・化学・物理の融合分野研究であり、理系の全ての分野の研究者が加わって行うことが理想であった。本学発の研究開発を進めていくうえで、さらにさまざまな先生方に、認知、理解していただき、参画していただければと考え、アウトリーチ活動もテーマとし、精力的にナノバイオ交流会や勉強会を開催した。

今後の展望としては、電波の影響の解明をさらに様々な生命現象を題材に進めていき、最終的には文系学部との連携を検討していきたい。例えば、悪影響を及ぼす部分については、新たな環境問題の一つとして、本学を挙げて、警鐘、提言を行っていきたい。逆に、良好な影響を及ぼす部分については、本学発の目玉研究となる、医療・産業への応用展開を最終的な目標とする。このような際に、法整備などでは法学部、起業・新産業化などでは経済学部、経営学部、CUBE などとも連携できると考えている。以上のように本学内の様々な学部との連携の足がかりとして本テーマは総合研究として遂行できたと考えられる。またこの活動に積極的に学生の関与も促させていただいた。通常の授業や、卒業研究活動では得られない、アウトリーチ活動経験や産学連携活動経験をオンザジョブトレーニング形式で提供できたと考えている。

本研究が完了すれば、生体分子や生体サンプルなどの電磁波影響のメカニズム解析が可能となり、これまで研究されてこなかった学際的かつフロンティアである、情報・生物・化学・物理の融合分野の研究促進化に大きく貢献することになり、学術的な意義は高い。また本分野のイニシアチブを本学がとることになり、本学の学術的なプレゼンスが上がるのが期待できる。またこの研究を通じたアウトリーチ活動の検討を行うことで、本研究自体の認知度が上がることはもちろんのこと、今後の様々な研究テーマにおいてどのようにアウトリーチ活動を行えば効果的かつ効率的に行えるかといったノウハウを本研究チームが提供することで、本学の様々な研究テーマ・活動の参考に今後なっていければと考えている。

本研究の遂行にあたって、実質的な実験遂行はすべて本学学生によるもので

あり、ここに感謝の意を表す。以上のような研究活動はなかなか外部資金が得にくい中、研究資金を提供していただき、またノウハウを伝える場としてこのような叢書を作成する機会を与えてくださった、甲南大学総合研究所に厚く御礼申し上げます。ありがとうございました。

研究者紹介（執筆順）

臼井 健二（代表研究員）

梅谷 智弘（研究員）

2021年(令和3年)3月31日 発行

甲南大学総合研究所

神戸市東灘区岡本8丁目9番1号（〒658-8501）

（非売品）