

セラミックスで変化した水の構造はアクアポリン水透過性を測定することで解明できる。

(Water structure changed by ceramics can be studies by measurement of water permeability for aquaporin.)

小積 忠生^a・北川 良親^{b†}

^a (株) コズミック、広島 723-0015、日本

^b 秋田県立大学大学院、秋田 010-0195、日本 (名誉教授) および 合同会社
北川科学総合研究所、日田、877-0039、日本

欄外見出し：セラミックス水、アクアポリン、水の構造

† 対応する著者：秋田県立大学大学院、秋田、010-0195、日本：0973-28-5969, or
090-7170-1188. Fax: 020-4664-2259. メール：kitagawa@kitagawainst.com.

要約

アクアポリンは生体膜を横切る水やある種ミネラルを通す水チャンネル機能がある膜タンパク質である。この研究では、我々は、セラミックスが水の構造を変えることができるのか、そして、水の構造はアクアポリンの水透過性を測定して調べることができるのか、を明らかにするのが目的である。まず第一に、我々は、セラミックスが水道水をアクアポリン透過性の高い活性水道水に変えることを確かめた。セラミックスによる水透過性の変化は蒸留水を用いても起こることを確認した。興味深いことに、蒸留水の水透過性は蒸留水の元になった水道水の水透過性と同じであった。水のアクアポリン透過性は激しい物理的衝撃や超音波で変わった。アクアポリンを透過しやすいかどうかは水の構造と密接に関係している。セラミックスは水の構造に影響を与えたと考えられる。

もしそれが起こっているならば、水は記憶すると言うことが可能である。水が溶けている物の構造や機能を記憶できることを確認できる技術を我々は知らない。水の構造を研究するのがたとえ難しいとしても、アクアポリンによって水の構造変化を直接的に我々は研究できる。

キーワード: アクアポリン、水透過性、セラミックス、水の構造

1. 緒論

水は生きている細胞にとって基本的なものである。水を飲むことはヒトの健康に大きな影響を与える[1]。だんだん、科学が水と人々の健康にまつわる証明を行ってきている[2]。例えば、ある種ミネラルウォーターがヒトの免疫力やナチュラルキラー細胞活性を上げるマウスの抗ガン免疫を促進するなどである[3]。自然のミネラルウォーターはいろいろな溶質を含んでいるので、恐らく、それがヒトの健康に良いと信じられている。一方、特別なセラミックスや石で処理した水は、たとえそれからなんらのミネラルが溶出していないにも拘わらずヒトの健康や動物や植物の生育に良いことが個人的に報告されている[4]。もし、それが本当であるなら、水分子そのものが変化したと考えられる。水の構造を科学的に証明するのはまだ十分できない。さらに、水の構造がヒトの健康や動植物の生育に影響すると言う考えはまだ科学的に受け入れられていない。今回の研究で、我々はセラミックスで処理した水のヒトアクアポリンに対する水透過性を確認し、セラミックスで変化した水の構造を明らかにするのを試みた。アクアポリンはヒト血液細胞で初めて見出された水チャンネルである[5]。アクアポリンは細胞の原形質膜上にあり、約3 Åの水分子が直接通る狭い孔を持っており[6, 7]、細胞の水バランスの維持に寄与している[8, 9]。我々は、既に、水の種類によってアクアポリン透過性が違うことを明らかにしている[10]。アクアポリンの開口に影響する因子として、リン酸化、pH、Ca²⁺、圧力、浸透圧、温度、栄養成分が知られている[11]。もし、これらの因子が完全に除外されると、アクアポリン水透過性の違いは水分子それ自身の性質に依存している。

2. 材料および方法

2.1 水試料と処理

蒸留水は日田市の水道水から作成した。忠海セラミックス®と呼ばれるセラミックスは広島市三原 723-0015 にある (有) コズミックが作成したものである。このセラミックスは鉄と粘土を焼成して作ったものである。我々は、他に、粘土のみと焼成していない鉄と粘土の混合物も用意した。50 ml の水道水もしくは蒸留水に 4 g のセラミックスを入れ、室温で 24 時間処理した。水試料は電子レンジで処理する時は東芝製(ER-501S)を用い、最高パワーで 3~5 分処理した。また、超音波装置 (ブランソン 2510) では通常パワーで、室温で、3~5 分処理した。脱気は真空ポンプで 3 時間行った。加熱は沸騰水中で 10 分間行った。ベゴニアの花は寿命試験に用いた、即ち、花の茎を切り、水道水あるいはセラミックス処理水道水の入った瓶に入れた。

2.2 アクアポリン遺伝子の試験管内転写、アフリカツメガエル卵母細胞への注射および水透過性の測定

ヒトのアクアポリン遺伝子(AQP1, AQP2, AQP3 and AQP5)を組み込んだ pXβG-ev1 ベクターは石橋賢二博士、安井正人博士、佐々木成博士より分与された。キャップのついた相補的 RNA(cRNA)はアクアポリン pXβG-ev1 ベクターを直線化した後、アンビオン社の mMESSAG EmMACHINE キットの T3 RNA ポリメラーゼを用いて合成した(9)。合成した RNA は精製し、濃度を測定した。ステージ V-VI の卵母細胞 (1~1.2mm) はコラゲナーゼ溶液 (シグマタイプ II、溶液 : 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 5 mM Hepes-Tris pH 7.5) で 20°C、2 時間処理された。外膜が除かれた卵母細胞は改良バース培地 (MBS, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 0.4 mM Ca(NO₃)₂, 0.4 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 100 μg ml⁻¹ Na-penicillin, and 100 μg ml⁻¹ Streptomycin, 15 mM Tris-HCl pH 7.4) で洗浄した。ナノ量注射装置 (ナリシゲ社製、東京) で cRNA を 50 ナノリットル (10-50 ナノグラム) 注射した。注射された卵母細胞は MBS(200 mOsm_{in})で培養された。水透過性を測定するために、注射して培養された卵母細胞をテストの水 (0 mOsm_{out})に入れ、デジタルカメラ (島津社製、京都) で卵母細胞の膨張を測定し、モーティクイメージプラス 21S(島津社製、京都)で膨張率を計算した (9)。水透過性 (Pf) は、膨張率の大きさ ($V/V_0 (d(V/V_0)/dt)$)、最初の大きさ ($V_0=9 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$)、最初の卵母細胞の表面積 ($S = 0.045 \text{ cm}^2$)、および水

の分子量($V_w = 18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$)から次式で計算できる (1)。

$$Pf = V_0 [d(V/V_0)/dt] / [S \times V_w (Osm_{in} - Osm_{out})]$$

2.3. 培養細胞の増殖

正常皮膚細胞は当方独自にヒトの皮膚から分離した。ダルベッコ培地 (DMEM) は和光純薬から購入した。DMEM 培地に 10% 牛胎児血清を加えたものを対照培地とした。セラミックス処理培地は、対照培地を忠海セラミックス®で 24 時間室温で処理して作成した。この培地はフィルター殺菌をして用いた。ヒト皮膚細胞は対照培地で生育させた。十分生育したところで、トリプシン処理で分散し、 1.0×10^5 細胞 / ml の細胞濃度で使用した。対照培地およびセラミックス処理培地で 48 時間培養した細胞はセル測定キット-8 で染色し、450nm の吸光度で細胞数を測定した。

3. 結果

3.1 ベゴニアの生育に対するセラミックス処理水の効果

ベゴニアの花を水道水およびセラミックス処理水道水で育て、花の状態を比較した (結果は補足の図で示した。) 水道水で育てたベゴニアの花は 7 日目に萎れた。しかし、セラミックス処理水道水で育てたベゴニアの花は元の形を維持していた。我々は、セラミックスからなんらの鉍物が溶け出していないことを確認している。この結果はセラミックスで水道水の性質が変わったことを示している。

3.2 培養細胞の生育に対するセラミックス処理水の影響

セラミックス処理した水は物理的および化学的に違った特徴を持つので、培養細胞の活性に影響を与えるであろう。ここで、我々はヒト皮膚培養細胞の活性におけるセラミックス処理水の効果を調べた。セラミックス処理水の培養液での細胞の増殖が対照の培養液より 12% 高いことが分った (図 1)。このことは、培養液の中のセラミックスで処理した水が細胞の増殖を

促進したことを示している。

3.3 アクアポリンの水透過性に対するセラミックスの効果

もし、セラミックスで水の性質が変わるならば、それはアクアポリンによって検出されると思われる。セラミックスで処理した水がアクアポリンの透過性にどのように影響を及ぼすか明らかにするため、ヒトアクアポリンを発現している卵母細胞を水道水もしくはセラミックス処理した水道水に直接入れた。アクアポリンとして、AQP2、AQP3 および AQP5 を用いた。各々のアクアポリンを発現した卵母細胞を2種類の水に入れ、膨らむ率を記録し、透過性 (Pf) を計算した。図2に示したように、AQP2、AQP3 および AQP5 は無処理の水道水よりセラミックスで処理した水道水に対して高い透過性を示した。AQP2 に対するセラミックス処理水の Pf は水道水に比べ 26% 増加した (水道水に対する Pf は $305 \mu\text{m}/\text{秒}$ 、セラミックス処理水に対する Pf は $386 \mu\text{m}/\text{秒}$ であった)。AQP3 に対するセラミックス処理水の Pf は水道水に比べ 26% 増加した (水道水に対する Pf は $97 \mu\text{m}/\text{秒}$ 、セラミックス処理水に対する Pf は $144 \mu\text{m}/\text{秒}$ であった)。AQP5 に対するセラミックス処理水の Pf は水道水に比べ 21% 増加した (水道水に対する Pf は $1258 \mu\text{m}/\text{秒}$ 、セラミックス処理水に対する Pf は $1523 \mu\text{m}/\text{秒}$ であった)。統計学的に見ても、セラミックス処理水は水道水より AQP2、AQP3 および AQP5 に対し有意に高い透過性を示した ($p < 0.05$)。

3.4 セラミックスで処理した蒸留水はアクアポリンに対する透過性を高める。

セラミックスで処理した水は花の保存性や細胞の生育を高めた。そのような効果はセラミックスで変化した水によるものである。水の変化した性質はアクアポリンで検出することができる。我々は、セラミックスで処理した蒸留水のアクアポリン透過性を示す必要がある。と言うのは、水道水はいろいろなミネラルを含んでいるからである。AQP1、AQP2、AQP3 および AQP5 を用いた結果を図3-Aに示した。いずれのアクアポリンにたいしても、セラミックスで処理した蒸留水は無処理の蒸留水に比べ高い透過

性を示した。無処理蒸留水に対するセラミックス処理蒸留水の透過性の相対値は AQP1 では 2.2 倍、AQP2 では 1.2 倍、AQP3 では 1.3 倍、AQP5 では 1.6 倍であった（透過性の Pf 値は AQP1 では $1074 \mu\text{m/s}$ 、AQP2 では $351 \mu\text{m/s}$ 、AQP3 では $467 \mu\text{m/s}$ 、そして AQP5 では $1714 \mu\text{m/s}$ であった）。これらの結果から、蒸留水は水の構造に影響を与えるミネラルをほとんど含んでいないので、水分子そのものがセラミックスで変化したと推定される。

3.5. セラミックと粘土のアクアポリン水透過性の比較

使用したセラミックスは「忠海セラミックス®」と呼ばれ、有限会社コズミックが製造した登録商品である。セラミックスは砂鉄と粘土を混ぜ、焼成して作られる。粘土のみおよび砂鉄と粘土を単純に混合したものを用意し、乾燥した。「忠海セラミックス®」は砂鉄と粘土の混合物を焼成して作成された。それらの写真を図 3-B に示した。これらのものを蒸留水に 24 時間入れた。これらの水の AQP1 に対する透過性の結果を図 3-C に示した。AQP1 の水透過性は粘土、砂鉄+粘土、忠海セラミックス®の順に高くなった。それぞれの Pf の相対値は 1.2、1.4 および 1.9 倍であった（それぞれの Pf 値は 660 、 766 および $984 \mu\text{m/s}$ であった）。砂鉄+粘土は焼成によってアクアポリン水透過性の高い活性を持つことが解った。

3.6. 異なる地域の水のアクアポリン透過性

蒸留水が水道水から作られた時、両者の水のアクアポリン透過性に違いがあるかどうか調べた。AQP1 に対する蒸留水の水透過性は元の水道水の水透過性と同じであった（結果は不表示）。蒸留水は製造元の水道水によって異なる水透過性を示した（結果は不表示）。蒸留水を作成するための水道水のアクアポリン透過性は場所によって違う。例えば、東京と大阪の水道水は異なるアクアポリン透過性を示した（東京 1、東京 2、大阪 1 および大阪 2 の水道水の水透過性はそれぞれ 156 、 719 、 511 および $723 \mu\text{m/s}$ であった）。蒸留水のアクアポリン透過性は元の水が生産される場所や生産方法によって影響を受ける。これらの結果はアクアポリン水透過性は水分子その

ものの性質であって、水に含まれるミネラルの性質ではないことを示唆している。

3.7. 超音波処理した水のアクアポリン透過性の減少

もし、アクアポリン透過性が水分子の性質であるならば、水に対して物理的な力を与えた時、水のアクアポリン透過性が変化することが考えられる。図3-Dに示したように、アクアポリン1に対する蒸留水の水透過性は超音波で40%減少した、しかしながら、電子レンジ、脱気および加熱では変化しなかった。図3-Eに示したように、同じような結果はセラミックスで処理した水を用いても得られた。セラミックスで処理した蒸留水のアクアポリン透過性は無処理の蒸留水に比べ1.9倍高くなった（水透過性は無処理蒸留水で $529 \mu\text{m/s}$ であるが、セラミックスで処理した蒸留水は $984 \mu\text{m/s}$ であった）。セラミックスで処理した蒸留水のアクアポリン透過性は超音波でも減少した（超音波されたセラミックス処理蒸留水の水透過性は $574 \mu\text{m/s}$ であった）。これらの結果から、水はある種の固有の構造を持っており、その構造は超音波で壊れる。

3.8. 水のアクアポリン透過性は希釈で変わる

セラミックスで変化した水の性質はアクアポリンで検出できた。その性質は水分子そのものの変化であり、ミネラルの性質ではない、なぜなら、蒸留水の性質が変化するからである。この性質は1週間以上維持されるが、しかしながら、超音波で消える。水のこのような性質を説明する興味深い仮説がある。それは、水分子が水溶液中の溶質の機能を記憶できるとする考えである。我々は水の性質が希釈で変わるか調べた。まず最初に、10 ml 蒸留水が入っている試験管から $10 \mu\text{l}$ の蒸留水を分取し、次に、別の10 ml 蒸留水の入った試験管に移し、穏やかに混ぜた。最初の水試料は 10^{-2} に希釈された。この操作を4回繰り返した。図4-Aに、この希釈した蒸留水のアクアポリン1に対する水透過性の結果を示した。 10^{-8} まで希釈した蒸留水のアクアポリン透過性は希釈前の最初の試験管の中の蒸留水と同じであった。次に、蒸留水は各々の希釈の段階で机に試験管を激しく叩き付けて

混合した。図 4-B に示したように、 10^{-6} 希釈で、激しく叩き付けた蒸留水のアクアポリン透過性は元の蒸留水の 2.7 倍高く変化した。同様に、セラミックス処理した蒸留水でも 3 倍高くなった。高い希釈と叩き付けを行った蒸留水のアクアポリン透過性を図 4-C に示した。蒸留水のアクアポリン透過性は希釈と叩き付けの各々の段階で高低を繰り返した。この実験では、 10^{-6} 、 10^{-18} および 10^{-30} で水透過性は上昇し、 10^{-12} および 10^{-24} で下降した。蒸留水およびセラミックス処理蒸留水のアクアポリン透過性の上昇および下降の現象はアクアポリン 2 を用いた実験でもまた観察された（結果非表示）。

4. 論議

以前の論文で、ヒトおよび植物のアクアポリンが異なる種類の水の中で異なる水透過性を示すことを報告した[10]。今回の研究で、我々はセラミックス処理した蒸留水のアクアポリンに対する高い水透過性を実証した。この現象は水そのものがセラミックスで変化させられたことを意味している、なぜなら、ミネラルのようないかなる溶質も測定限界でも蒸留水には検出されない。蒸留水は水道水から作られた。我々は蒸留水のアクアポリン透過性は水道水の由来によって異なることを認識しなければならない。蒸留水の水透過性は加熱や電子レンジで処理しても変化しない、しかし、超音波で減少する。これらの結果から、水はある構造を持っていると推定される。蒸留水を同じ蒸留水で穏やかに希釈した場合、蒸留水のアクアポリン透過性は変化しない。しかしながら、叩き付ける操作で水透過性は変化した。そして、透過性の値は各々の希釈段階で大きく変化した。このことは、水の固有のアクアポリン透過性が激しい物理的衝撃、たとえば叩き付ける操作や超音波で変化することを示している。これらの結果から、水が物理的力で変化するある構造を持っていると推定される。アクアポリンは 1 個の水分子が通ることができる孔を持っている。アクアポリンを通過するのが容易かどうかは水の構造と密接に関係している。水がアクアポリンの孔を通る時、4～8 個の水分子で構成されるシングルファイル水構造がシュミレーションによって推定されている[13-14]。セラミックス処理した水の

高いアクアポリン透過性の結果から、我々はセラミックス処理した水はシングルファイル構造を形成するのが容易であると考えている。セラミックスに接触することで生じる電気的狀態がシングルファイル化に寄与していることが考えられる。このイメージを図5に示した。我々のデータは水分子がある状態下で構造を記憶できることを示している。ベンベニスト博士は、水が抗体のような物質の構造と機能を記憶できると主張した[15]。彼は高度希釈した抗体溶液が反応性を保持していることを実験的に示した。この場合、抗体溶液は希釈と共に叩き付けられることが必要であった。これはホメオパシー説によるレメディ―作成の技術である。彼の仮説は否定された、なぜなら、公開での実験の再現性が得られなかったからである。この報告で、我々は水の構造をアクアポリンを使って検出できることを示した。このテクノロジーは水の記憶に向けた挑戦的研究に役立つであろう。

謝辞

我々は、pXβG-ev1をご提供戴いた東京医科歯科大学の佐々木博士、慶応大学の安井博士、明治薬科大学の石橋博士に謝意を表します。

文献

- [1] L. Petraccia, G. Liberati, S. Giuseppe Masciullo, M. Grassi, A. Fraioli, Water, mineral waters and health, Clin. Nutr. 25 (2006) 377-385.
- [2] P. Agre, D. Kozono, Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases, FEBS Lett. 555 (2003) 72-78.
- [3] J. Wada, T. Hou, S. Fujii, Increasing of Immune activity by Kirishima City Makizonochō Seki-Daira mineral water (brand name: Seki-Daira mineral water) - enhancing immune activity in humans and anti-cancer immunity in mice, Food Style 21 (2008) 48-52.
- [4] Y. Niwa, K. Kawahira, K. Matsumoto, K. Matsumoto, Effect of far infrared ray emitting products and stones on human leukocyte functions, lipid peroxidation, the growth of tumor on mice, drug-induced hepatitis rat, and clinical course and serum lipid peroxide levels of rheumatoid arthritis patients, J. Inflammation

Original Article 16 (1996) 425-436.

- [5] G.M. Preston, T.P. Carroll, W.B. Guggino, P. Agre, Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein, *Science* 256 (1992), 385-387.
- [6] K. Murata, K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J. B. Heymann, A. Engel, Y. Fujiyoshi, Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407(2000), 599-605.
- [7] D. Kozono, X. Ding, I. Iwasaki, X. Meng, Y. Kamagata, P. Agre, Y. Kitagawa, Functional expression and characterization of an archaeal aquaporin, AqpM from *Methanothermobacter marburgensis*, *J. Biol. Chem.* 278(2003), 10649-10656.
- [8] A.S. Verkman, Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potential clinical significance, *Mol. Med.* 10 (2008) e13.
- [9] C. Maurel, L. Verdoucq, D-T. Luu, V. Santoni, Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions, *Plant Biol.* 59 (2008) 595-624.
- [10] Y. Kitagawa, C. Liu, X. Ding, The influence of Natural mineral water on aquaporin water permeability and human natural killer cell activity, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 409 (2010) 40-45.
- [11] Y. Yukutake, M. Yasui, Regulation of water permeability through aquaporin-4, *Neuroscience* 168 (2010) 885-891.
- [12] M.D. Cramer, H.J. Hawkins, G.A. Verboom, The importance of nutritional regulation of plant water flux, *Oecologia* 161 (2009) 15-24.
- [13] Y. Cui, D. A. Bastien, Water transport in human aquaporin-4: molecular dynamics (MD) simulations *Biochem Biophys Res Commun* 412(2011) 654-9.
- [14] A. Horner, F. Zocher, J. Preiner, N. Ollinger, C. Siligan, S. A. Akimov, P. Pohl, The mobility of single-file water molecules is governed by the number of H-bonds they may form with channel-lining residues, *Sci. Adv.* 1(2015)e1400083.
- [15] E. Davenas, F. Beauvais, J. Amara, M. Oberbaum, B. Robinzon, A. Miadonnai, A. Tedeschi, B. Pomeranz, P. Fortner, P. Belon, J. Sainte-laudy, B. Poitevin, J. Benveniste, Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE, *Nature* 333(1988) 816 - 818.

図の説明

図 1. ヒト皮膚細胞のセラミックス処理培地での増殖

図 2. セラミックスで処理した水道水のアクアポリン透過性

A: AQP2、B: AQP3、C: AQP5。

図 3. セラミックスで処理した蒸留水のアクアポリン透過性

A: セラミックスで処理した蒸留水での AQP1、2、3 および 5 透過性。
B: セラミックスとその成分。C: 粘土のみ、鉄+粘土、忠海セラミックス®（鉄+粘土の焼成物）で処理した蒸留水での AQP1 透過性の相対値。D: 超音波、電子レンジ、脱気および加熱処理した蒸留水での AQP1 透過性の相対値。E: 忠海セラミックス®で処理した蒸留水およびその超音波処理した蒸留水での AQP1 透過性の相対値。

図 4. 希釈および叩き付けした蒸留水のアクアポリン透過性。

A: 同じ蒸留水で希釈した蒸留水の AQP1 透過性の相対値。B: 希釈および叩き付けした蒸留水および忠海セラミックス®処理蒸留水での AQP1 透過性の相対値。C: 高度希釈および叩き付けされた蒸留水の AQP1 透過性の相対値の変化

図 5. アクアポリンの孔近くでシングルファイル水を容易に作るセラミックス処理水のイメージ

A: セラミックス処理水、B: 対照水

補足図 1. セラミックス処理した水道水でのベゴニアの生育。

左: セラミックス処理水道水、右: 水道水。

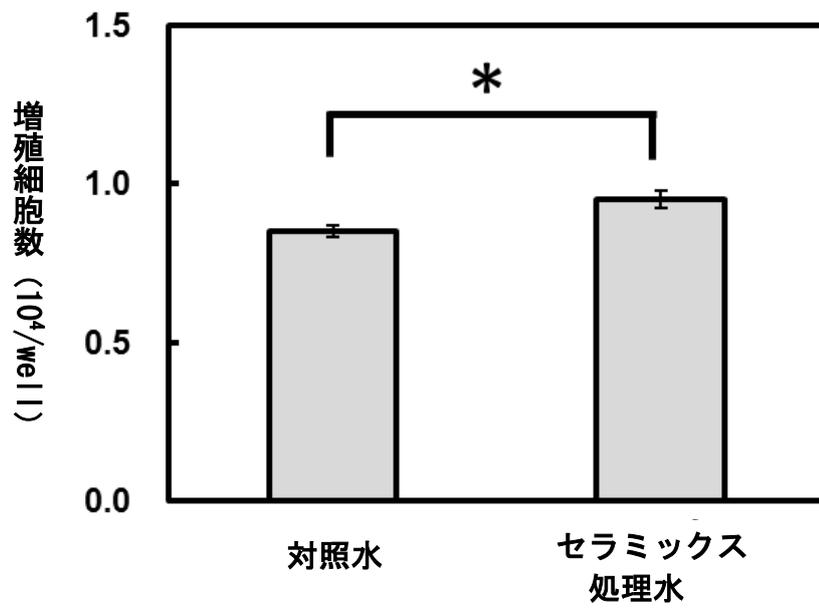


図1

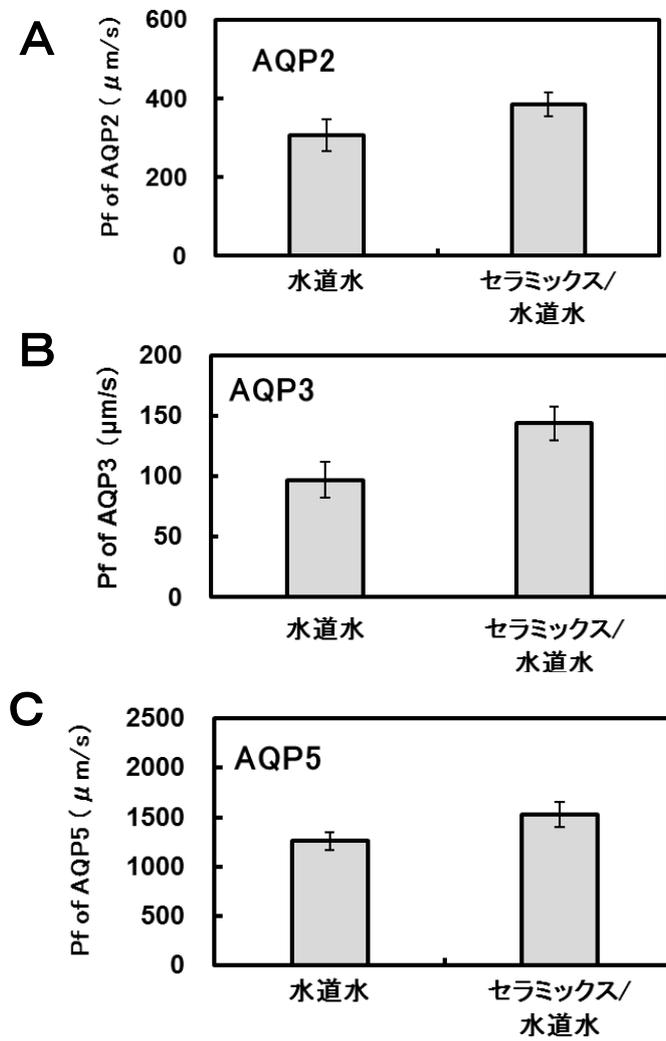


図2

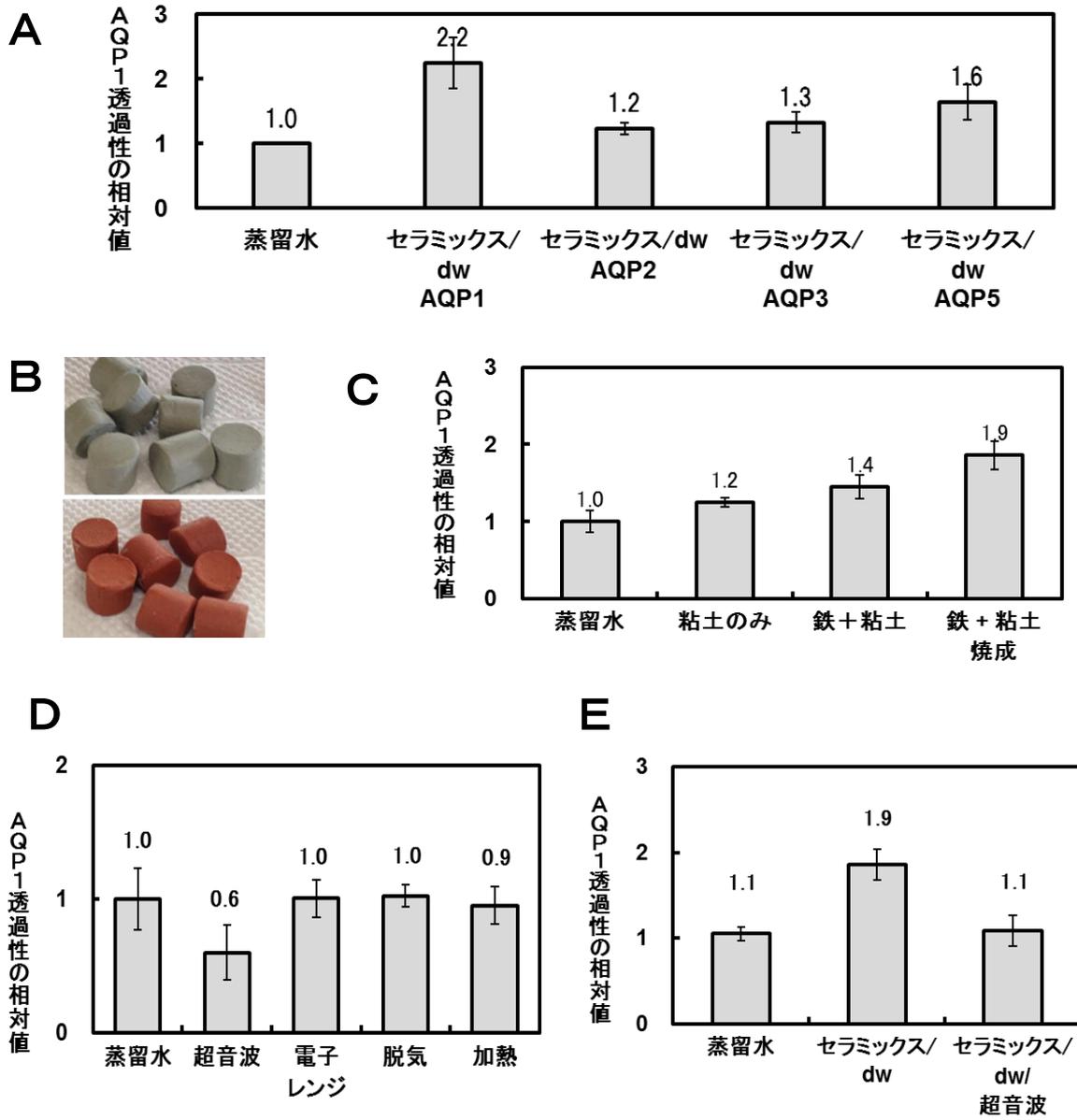


図3

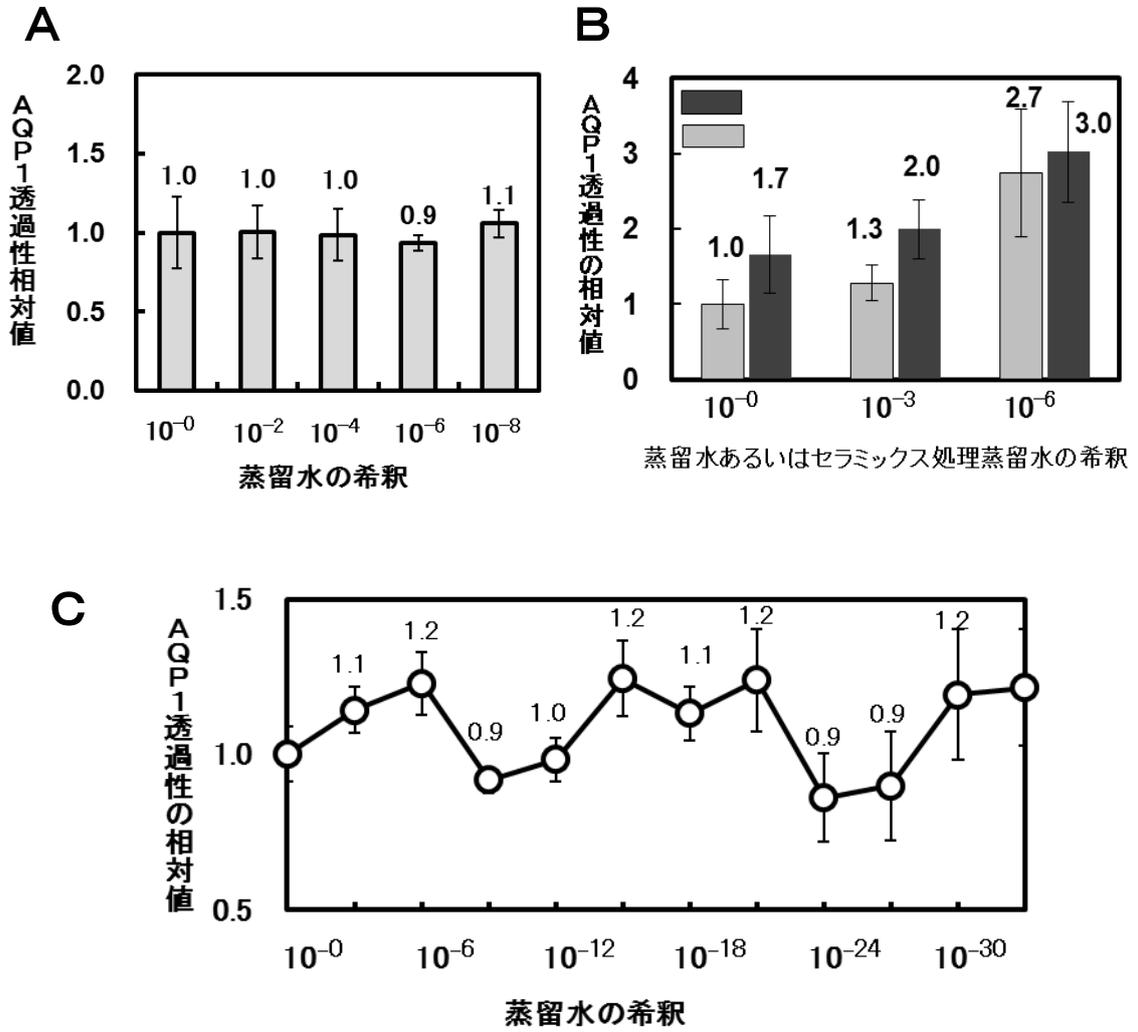


図4

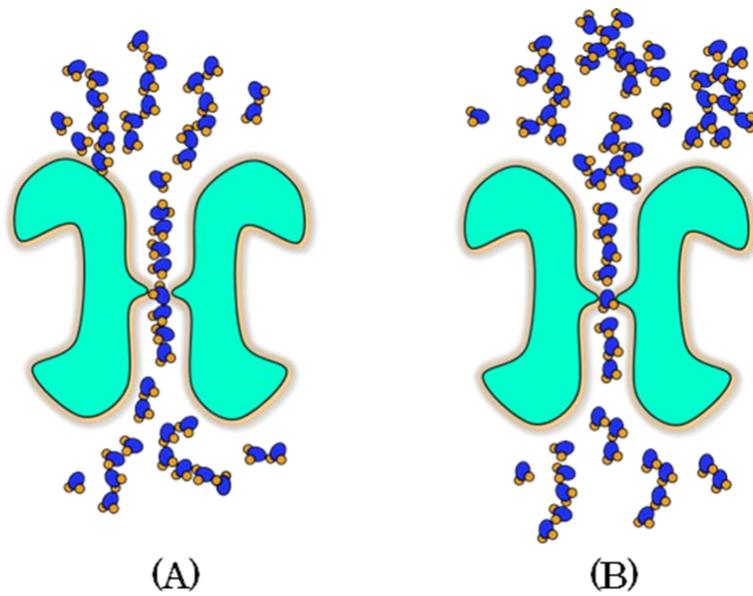


图5



コズミックウォーター 0日目



蒸留水 0日目



コズミックウォーター 4日目



蒸留水 4日目



コズミックウォーター 7日目



蒸留水 7日目

補足図1