

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：54401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04759

研究課題名(和文)細胞培養液中における金属粒子と細胞間の物理化学的挙動の解析と徐放性制御技術の構築

研究課題名(英文) Analysis of physicochemical behavior between metal particles and cells in culture medium and development of sustained-release control method

研究代表者

倉橋 健介 (Kensuke, Kurahashi)

大阪公立大学工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：60516821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シリカコーティングを施した酸化亜鉛ナノ粒子を造粒し、膜圧により亜鉛イオンの溶解速度と溶出量を制御することができた。このコーティングナノ粒子をクラミドモナスへ投与したところ、コーティングによって亜鉛の吸収速度と細胞成長速度が合致させることで、クラミドモナスの成長を促進できることがわかった。一方、酸化マグネシウムについても同様の検討を行ったところ、細胞成長量はマグネシウムの溶解速度ではなく溶出したイオン濃度と相関を持つことがわかった。また、水耕栽培および露地栽培において酸化亜鉛ナノ粒子を投与し、どちらの場合でも酸化亜鉛ナノ粒子を投与することで成長量を促進させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、農業分野において肥料の過剰投与による周辺環境の汚染や生態系の攪乱が懸念されている。本研究では、植物成長における必須元素である亜鉛とマグネシウムにおいて、溶解性を制御したコーティングナノ粒子として投与することで、ミネラルの吸収を効率化し、植物成長を促進することができた。また、ナノ粒子による投与で水耕栽培や露地栽培の作物も成長を促進できることを明らかにした。この手法を実用化することができれば、肥料の使用量を抑え、環境への影響を低減させられるだけでなく、養液栽培における攪拌動力に要するエネルギーの削減や農業従事者の労力削減などの点から持続的な農業の発展に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：By applying a silica coating to zinc oxide nanoparticles and adjusting the film thickness, it was possible to control the dissolution rate and eluted amount of zinc ions. When coated zinc oxide nanoparticles were administered to Chlamydomonas, it was found that the growth of plant cells could be promoted by matching the absorption rate of zinc ion with the rate of cell growth. When silica coating of magnesium oxide was also investigated, it was found that the amount of cell growth in the administration of magnesium oxide was correlated with the concentration of eluted ions rather than the rate of magnesium dissolution. Moreover, in both hydroponic and outdoor cultivation, the promotion of the plant growth was succeeded by the administration of zinc oxide nanoparticles.

研究分野：化学工学

キーワード：ナノ粒子 溶解性制御 養液栽培 生育制御

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

粒径 100 nm 以下の酸化亜鉛ナノ粒子は工業製品として広く市販されており、同一質量と比較するとナノ粒子はバルク粒子より反応面積が劇的に増加する。先行研究において、金属酸化物ナノ粒子を投与した状態で、植物の不定胚であるカルス細胞を培養したところ、対照に比べ、酸化亜鉛ナノ粒子を投与したものでは鮮やかな緑色を示し、生重量に加え、クロロフィル含有量が著しく増加することを見出した[1]。一般に、微細粒子は強い凝集性を持ち、粒子と粒子、あるいは細胞との間に凝集力が働く。この凝集力により接近した微細粒子と植物細胞の間で、必須元素としてタンパク合成に関与する亜鉛の局所的なやり取りが起こった結果、生重量とクロロフィル生産量の増加が起こったと考えられる。このような、粒子間に働く凝集力を物質輸送のドライビングフォースとすることができれば、攪拌や流動操作なしに植物細胞へミネラルを供給することができ、微細粒子製造にかかる小エネルギー投入で、攪拌動力に伴う大きなエネルギー消費を削減できるほか、既存の農法では過剰投与になりがちな肥料の使用量削減につながり、持続的な農業の発展に資することができる。しかし、多様な共存物質が存在する植物投与の環境では、ナノ粒子溶解の局所的な挙動を理解することは難しく、ナノ粒子から溶解したミネラルがどのように吸収され、それが植物の成長にどのように関わるかの相関について知見が不足していた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、表面修飾や構造制御で金属ナノ粒子の凝集力と溶解性を操作し、金属ナノ粒子を採用した植物へのミネラル供給システムを創出することである。植物培養液中での金属ナノ粒子の細胞表面への吸着と取り込みに関する物質収支モデルを構築し、凝集力が溶解性に与える影響を理解するとともに、植物にとって最適な取り込み速度となる徐放性ナノ粒子の粒子特性を決定するとともに、その造粒法を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) コーティングナノ粒子の調製

エタノールと水の混合溶媒にアンモニアとナノ粒子を加え、粒子懸濁液を作製した。懸濁液は、超音波洗浄機で 30 分間超音波を照射し、脱凝集を行ったのち、設定温度 30 で予熱したホットスターラーで攪拌しながら、オルトケイ酸テトラエチル(TEOS)を添加し、数時間反応させた。反応後の懸濁液、遠心分離機で分離し、回収した沈殿を、蒸留水で 2 回洗浄した。得られた沈殿を 80°C で一日乾燥させ、コーティングナノ粒子を得た。得られた粒子は、透過型電子顕微鏡(TEM)により、各試料の形状観察を行った。また、同一視野の TEM-EDS マッピングによって膜組成を分析した。観察用の試料は、コーティングナノ粒子の懸濁液を約 1 mm 角の白金基板上に滴下して乾燥させることで観察した。

#### (2) コーティングナノ粒子の溶出速度の測定

調製したコーティングナノ粒子を純水 100 mL に懸濁し、超音波洗浄機により 30 分間超音波照射をすることで分散させた。分散液を純水で希釈し、藻類に曝露する際と同濃度の分散液とした。添加してから任意の時間が経過した分散液を 8~10 mL 回収し、限外濾過フィルター(分画分子量: 50kDa)により限外濾過を行った。限外濾過後の溶液を、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターに通過後、ICP-OES により、溶液中の金属イオン濃度を測定し、溶出速度を算出した。

#### (3) 藻類へのコーティングナノ粒子の投与試験

人工気象室内で通常の TAP 培地を用いて前培養を行った *Chlamydomonas reinhardtii* を遠心分離により回収し、培地中の金属イオンと同濃度となるよう金属酸化物ナノ粒子で置き換えた培地を加え、培養を開始した。増殖挙動は、細胞数をセルカウンターで測定することで評価した。また、生物の個体差を考慮し、細胞数は 3 回の実験結果の平均値を採用した。

培養した *C. reinhardtii* の培養液 9 mL を分取し、4000 rpm で 10 分間遠心分離することで、培地(細胞外成分とする)と沈殿を分画した。沈殿に 2 M 酢酸を 1 mL 加えて懸濁した後に、15000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液と沈殿をそれぞれ回収した。沈殿は、純水を 1 mL 加えて同様の操作で遠心分離を行い、上澄み液と細胞をそれぞれ回収した。この 2 回の洗浄操作により細胞表面に付着している化合物と細胞を分離し、上澄み液(細胞表面成分とする)と沈殿物(細胞内成分とする)を分画した。細胞外成分と細胞表面成分は 100 で一日乾燥させ、乾燥後の残渣に 1 M 硝酸を 1 mL 添加して、溶解させた後、純水を 9 mL 添加して、0.1 M 硝酸酸性のサンプルとした。細胞内成分は 13 M 硝酸を 1 mL 添加し、100 まで加熱し溶解させた後、乾燥させて、上記と同様の操作で 0.1 M 硝酸酸性のサンプルを調製した。これらのサンプルを孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターにより濾過し、ICP-OE で測定することにより、細胞外成分、細胞表面成分、細胞内成分の 3 画分に同存在する金属イオンの量を定量した。

#### (4) 褐虫藻を用いた栄養成分ナノ粒子化のスクリーニング

スクリーニングに使用した褐虫藻は、大阪公立大学から分継した褐虫藻 *Breviolum minutum* Mf 1.05b を、ダイゴ IMK 培地と人工海水 SP の両方を含む培地で継代して用いた。スクリーニングに使用した培地は、継代に使用している培地から、目的とした金属元素を取り除いた培地を別途調製し、任意の量の金属化合物ナノ粒子を加え、超音波照射 15 分で分散させた培地を使用した。継代した培地に含まれる目的の元素を除くため、培養している褐虫藻を分取し、遠心分離で上澄み液を除去し、目的の元素を除いた培地で洗浄した。洗浄操作を 2 回行ったのち、目的の元素を除いた培地に懸濁させた。洗浄した褐虫藻 1 mL を、スクリーニング用の培地 9 mL に加え、25 ℃ のインキュベーター内で静置培養し、細胞数の経時変化をセルカウンターで測定した。

#### (5) 水耕栽培レタスへの酸化亜鉛ナノ粒子の投与

播種 4 日目のレタスの栽培機中へ、任意の質量の ZnO NP を含むハイポニカ液体肥料を調製し、各条件につき 8 株のレタスを播種した。これを曝露 1 日目とし、曝露 50 日目に葉緑素計を用いて葉の SPAD 値および葉面積の測定を行った。採取したサンプルを 60 ℃ の乾燥機で 4 日間乾燥させた後、電子天秤で乾燥重量を測定した。乾燥重量を測定後、乳鉢で粉末状にしたサンプルを 0.1 g 量り取り、1 M 硝酸を 1 mL 加え、100 ℃ に加熱することで完全に溶解させた。純水で希釈して全量を 10 mL とし、孔径 0.2 μm のフィルターでろ過した後、Zn 含量を ICP-OES で測定した。

#### (6) 露地栽培コマツナへの酸化亜鉛ナノ粒子の投与

堆肥は大阪公立大学馬術部より排出された馬糞を 3~4 ヶ月間、好気条件下で堆肥化処理を施した馬糞堆肥を使用した。馬糞堆肥を赤玉土と 50% の割合で混合し、任意の質量の ZnO NP を加えたものを栽培土壌とし、セルトレイにて発芽のち育成したコマツナの苗を、ポット内の栽培土壌に植え替えた。サンプル数は、土壌にナノ粒子を含まないブランク試験では 20 ポットとし、その他の条件では各 10 ポットとした。これを曝露 1 日目とし、曝露 40 日目に葉の SPAD 値を測定した。また、採取したサンプルは、レタスと同じ手法で乾燥重量と Zn 含有量の測定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 表面修飾による酸化亜鉛ナノ粒子の溶解性制御の検討

公称径 34 nm の酸化亜鉛ナノ粒子に対して、アンモニア水と TEOS を反応させることで、ゾル-ゲル法によりコーティングナノ粒子(CNPs)を得た。図 1(A)に 0.4 M のアンモニア水に 0.02 M の TEOS を添加し 0.5 時間反応させた試料の透過電子顕微鏡観察の結果を示す。各粒子中央の黒色部分が ZnO NPs であり、周辺部がコーティング層を示す。ZnO ナノ粒子周辺に均一なアモルファス層が確認された。また、図 1(B)の TEM-EDS マッピングから、Si 元素はコーティング層に分布することを確認した。

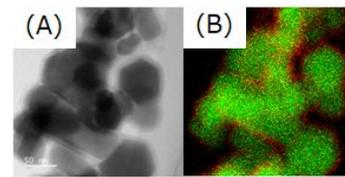


図1 (A) CNPsのTEM像、(B) CNPsのTEM-EDSマッピング

以上から、ZnO NPs をコア粒子、SiO<sub>2</sub> 膜をシェル層としたコアシェル粒子が作製できた。このとき、同一条件の複数の CNPs に対して TEM 増から膜厚を測定したところ約 6.5 nm であった。

0.4 M のアンモニア水に、0.02, 0.04 M の TEOS を添加して CNPs を調製し、TEM 像から膜厚を測定した。反応時間と膜厚の関係を図 2 に示す。いずれの TEOS 添加量でも、膜厚は Langmuir 型の近似式で表現できた。得られた CNPs より、6.5, 12, 24 nm のコーティング層を有する 3 種の ZnO ナノ粒子(以下、CNP6.5, CNP12, CNP24 とする)を 10 mg/L の水に暴露した際の溶解速度 [(mg/L)/h] を測定した。SiO<sub>2</sub> コーティング層を有する ZnO ナノ粒子は SiO<sub>2</sub> 層の分、1 粒子の重量が増加する。そのため、以下の式を元に、ZnO NPs の実質量濃度が 10 mg/L となる添加濃度で暴露し、溶解速度の測定を行った。

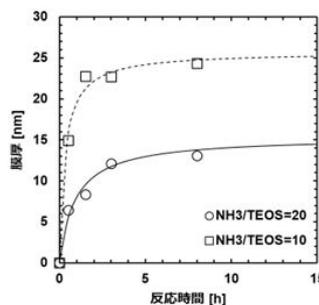


図2 反応時間と原料濃度・膜厚の関係

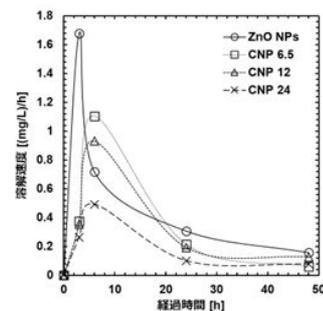


図3 各CNPsの溶解速度の経時変化

添加濃度 [mg/L]

$$= 10 \text{ [mg/L]} \times (\text{ZnO} + \text{SiO}_2 \text{ [g]}) / (\text{ZnO NPs [g]})$$

図 3 に各膜厚の CNPs の溶解速度の経時変化を示す。膜厚増加に伴い、最大溶解速度が減少することが分かった。これは膜厚増加による拡散抵抗の増大が原因と考えられる。また、CNPs は ZnO NPs より溶解速度が極大になる時間が遅く、コーティング層の導入で溶解速度が制御できることが分かった。

## (2) 溶解性を制御した酸化亜鉛ナノ粒子による成長促進の検討

藻類である *C. reinhardtii* を植物細胞のモデルとして CNPs を投与し、ナノ粒子からのミネラル吸収を観察した。前項で調製したコーティングナノ粒子(CNPs)を投与したところ、投与量 10 mg/L では全ての CNPs で ZnO NPs 未投与、あるいはコーティングなしの ZnO NPs を投与した場合より細胞数が増加することがわかり、NPs よりのミネラル溶解速度を制御することで、藻類への Zn 吸収量を調整し、植物細胞の増殖を制御できることがわかった

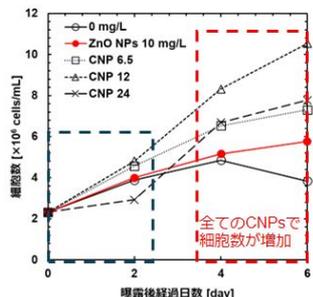


図4 藻類へのCNPsの投与試験

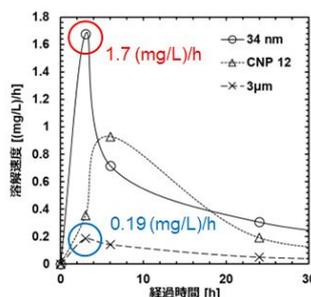


図5 粒径によるミネラル溶解速度制御

(図4) ZnO NPs よりの Zn イオン溶解速度は粒径によっても制御が可能である(図5)。そこで、最も細胞数が増加した膜厚 12 nm の粒子 (CNP 12) の溶解速度を最適値とし、溶解速度が一致する粒径を推算したところ、最適粒径 64 nm が得られた。

## (3) 酸化マグネシウムの溶解性制御による植物細胞成長促進の検討

マグネシウムは葉緑素の重要な構成元素であることから、亜鉛とは異なり植物が多量に必要とする多量元素として位置付けられる。そこで、酸化マグネシウムナノ粒子にコーティングによって徐放性を付与し、*C. reinhardtii* への投与を行うことで、ナノ粒子から

表1 培養期間全体の細胞増殖量とマグネシウムイオン溶出量・吸収率

試料名	細胞増殖量 [ $\times 10^6$ cells/mL]	吸収量 [mg/L]	溶出Mg <sup>2+</sup> 濃度 [mg/L]	吸収率 [-]
MgSO <sub>4</sub>	2.1	1.3	9.9	0.12
MgO	2.8	1.9	8.4	0.23
C-MgO_18	4.0	2.5	7.0	0.35

多量元素を吸収する際の挙動を観察した。公称径 100 nm の酸化マグネシウムナノ粒子に、酸化亜鉛と同様、TEOS を用いたゾル-ゲル法でシリカコーティングを行ったところ、SiO<sub>2</sub> 被膜を持つ酸化マグネシウムナノ粒子 (C-MgO) を TEM 観察によって確認することができ、その膜厚は TEOS 量と反応時間を変化させることで 9.4 ~ 25 nm まで変化させることができた。また、溶出速度を測定したところ、ZnO NPs と同様、膜厚の増加とともに溶解速度は低下し、シリカコーティングにより溶出マグネシウム量と溶解速度を制御できることが明らかとなった。

培地中のマグネシウムを C-MgO NP に置き換えて *C. reinhardtii* に投与した際の細胞増殖量を表 1 に示す。マグネシウムを置き換えなかった場合や MgO NPs で投与した場合より、C-MgO NPs を投与することで細胞数の増加が見られた。ナノ粒子の溶解性と細胞成長量の相関を調べたところ、ZnO NPs とは異なり、ナノ粒子からの Mg 溶出速度は細胞増殖速度と相関を持たなかったが、溶出した Mg 濃度が低下するほど細胞増殖量が増加することがわかった。以上のように、ナノ粒子の溶解性を解析することで、Mg のような多量元素と、Zn のような微量元素では、細胞増殖に有益な効果を与えるための戦略が異なることを見出した。

## (4) 種々の栄養成分に対するナノ粒子化の影響のスクリーニング

上記実験と並行して、褐虫藻 (*Breviolum minutum*) へ各種ミネラルを投与し、Zn や Mg 以外の栄養成分に対して、ナノ粒子化により植物の成長を促進できる元素のスクリーニング試験を行った。その結果、主要ミネラルでは Ca や PO<sub>4</sub>、微量ミネラルでは Fe や Cu で成長促進が見られ、多くの栄養成分で微粒子化による成長促進が起こることを見出した。また、CuO、

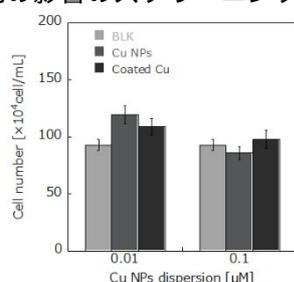


図6 CuO NPsへのコーティングの影響

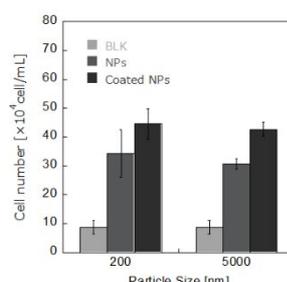


図7 CaCO<sub>3</sub> NPsへのコーティングの影響

CaCO<sub>3</sub> については、ナノ粒子へのシリカコーティングに対する影響を調べたところ、CuO NPs については微量投与時に見られた成長促進も、過剰投与時に見られる成長阻害も緩和されるなど、ZnO NPs と同様に吸収速度を制御することがわかった(図6)。また、CaCO<sub>3</sub> NPs では ZnO NPs のように吸収速度制御による増殖促進が観察された(図7)。

## (5) 水耕栽培および露地栽培におけるナノ粒子投与の影響

植物工場などでよく使用されるレタス水耕栽培において ZnO NPs を投与し、ナノ粒子による成長促進が肥料として転用できるかについての検討を行った。レタス水耕栽培においては ZnO NPs の投与量が 2 ppm のときに根長の伸長が見られるとともに可食部位である葉の乾燥重量が増加し、ZnO NPs による施肥効果を確認することができた。一方、2 ppm 以上 ZnO NPs を投与した場合、逆にレタスの成長を抑制することがわかった(図8)。レタスへ吸収された Zn 量を測定したところ、投与量 2 ppm では適量範囲となっていた植物中の Zn 量が、投与量 20 ppm では過剰量となっており、Zn の過剰吸収による成長阻害が起こったものと考えられる。そのため、水耕

栽培では、ZnO NPsの根への付着を制御することで、成長をコントロールできることがわかった。

一方、コマツナを対象として、土壌栽培におけるZnO NP投与試験を行ったところ、投与量5 mg/Lでは、Znの過剰な蓄積を起こすことなく乾燥重量とSPAD値が増加したが、それ以上の投与量ではZnの過剰吸収が起こり、50 mg/Lでは対照と同程度まで乾燥重量が減少した(図9)。

以上の結果から、ナノ粒子から溶出したZnイオンが土壌のイオン交換能を介して植物に吸収されることで、土壌においても施肥効果を示すことを見出した。

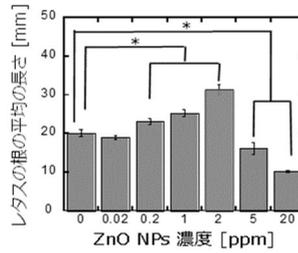


図8 レタス水耕栽培へZnO NPsを投与した際の平均根長の変化

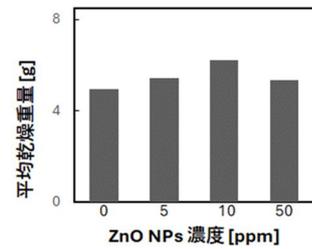


図9 堆肥50%区間へZnO NPを投与した際の小松菜の平均乾燥重量の変化

<引用文献>

[1] S. Yoshihara, et. al., *Plant Cell Tiss Organ Cult*, **138**, 377-385 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 昂星、金子 直毅、倉橋 健介、齊藤 丈靖、徳本 勇人
2. 発表標題 金属ナノ粒子が誘導する細胞増殖効果の検討と細胞周辺の金属イオン濃度解析
3. 学会等名 日本植物学会第88大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 倉橋 健介、松井 優和、黒山 和音、井上 昂星、池田 直哉、牛 冰、徳本 勇人
2. 発表標題 低溶解性ZnOナノ粒子による成長促進作用の評価による肥料転用の検証
3. 学会等名 日本植物学会第88大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 黒山 和音
2. 発表標題 ZnOナノ粒子の肥料転用検証と相関する成長促進作用の評価
3. 学会等名 第26回工業高等専門学校生化学研究発表会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 遠藤 悠衣、徳本 勇人、倉橋 健介
2. 発表標題 線虫の重金属保持能力に着目した土壌における金属汚染の水平拡散の解析
3. 学会等名 第34回廃棄物資源循環学会研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島 壮一郎、清水 翔太、倉橋 健介、徳本 勇人、齊藤 丈靖
2. 発表標題 細胞増殖を促進する酸化亜鉛ナノ粒子の粒径最適化技法の構築
3. 学会等名 化学工学会第54回秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田 奈穂、宮田 ひとみ、斎藤 範三、大江 真道、倉橋 健介、徳本 勇人
2. 発表標題 肥料転用した酸化亜鉛ナノ粒子によるレタスの生育検証
3. 学会等名 日本植物学会第87大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島 壮一郎、倉橋 健介、齊藤 丈靖、徳本 勇人
2. 発表標題 金属酸化物ナノ粒子を用いた緑藻に対する細胞増殖効果の解析
3. 学会等名 日本植物学会第87大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 倉橋 健介、中村 太郎、齊藤 丈靖、中島 壮一郎、岩崎 哲史、徳本 勇人
2. 発表標題 金属ナノ粒子の肥料転用における有効性の検証
3. 学会等名 日本植物学会第87大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大石 智也、小松 智葉、倉橋 健介、宗林 由樹
2. 発表標題 界面活性剤を含む溶媒含浸樹脂によるランタノイド分離における回収法の検討
3. 学会等名 第25回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久保 陽、北野 幸親、伊達 勝生、倉橋 健介、吉原 静恵、徳本 勇人
2. 発表標題 溶解性を制御した金属粒子を用いた緑藻の最適亜鉛吸収速度の検証
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉橋 健介、藤村 花凜、片山 魁人、山中 柊人、岩崎 哲史、吉原 静恵、徳本 勇人
2. 発表標題 酸化亜鉛ナノ粒子を褐虫藻が亜鉛源として利用する際の吸収機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉橋 健介、岩崎 哲史、齊藤丈靖、徳本勇人
2. 発表標題 ナノ粒子の溶解性制御による植物細胞の増殖促進
3. 学会等名 第57回植物工場研究センターコンソーシアム研修会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小笠原拓海、大石智也、倉橋健介、宗林由樹
2. 発表標題 界面活性剤を含む溶媒含浸樹脂の調製法の検討と希土類金属の抽出
3. 学会等名 第24回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊池祥一朗、倉橋健介、徳本勇人、齊藤丈靖
2. 発表標題 大腸菌体内で生成されるAuナノ粒子の物性評価
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	齊藤 丈靖  (Saito Takeyasu)  (70274503)	大阪公立大学・大学院工学研究科・教授   (24405)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	徳本 勇人  (Tokumoto Hayato)  (70405348)	大阪公立大学・大学院理学研究科・准教授   (24405)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------