

平成 21 年 5 月 13 日

研究種目：特別研究促進費

研究期間：2008 年～2008 年（2004 年～2007 年 特定領域研究）

課題番号：20900118

研究課題名（和文） 希土類元素の生体影響

研究課題名（英文） Effects of rare earth elements on living matter

研究代表者

河合 啓一（KAWAI KEIICHI）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：00002064

研究成果の概要：

液晶テレビや携帯電話、CD 等に広く用いられている希土類元素の生体への影響に関する研究を行った。微生物では希土類元素存在下で特異な増殖を示す希土類元素応答菌として、セリウム応答菌 1 株、ユウロピウム応答菌 3 株およびスカンジウム応答菌 1 株の計 5 株を分離し、それらの培養特性等を明らかにした。また、マウスに様々な形態の希土類化合物を静脈内注射、経口および吸入曝露により投与した結果、希土類化合物の種類、形態および投与量により各臓器への取り込み量と蓄積性が異なることを認めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度 (特定領域研究)	11,700,000	0	11,700,000
2005 年度 (特定領域研究)	7,000,000	0	7,000,000
2006 年度 (特定領域研究)	7,300,000	0	7,300,000
2007 年度 (特定領域研究)	4,900,000	0	4,300,000
2008 年度 (特別研究促進費)	3,500,000	0	3,500,000
総計	34,400,000	0	34,400,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：希土類元素、微生物、メタノール脱水素酵素、哺乳類、マウス、希土類化合物

1. 研究開始当初の背景

希土類元素は発光材料、磁性材料として光学機器、情報機器、家電製品等に広く用いられるようになり、加えて廃棄機器等の環境への放出によりヒトのみならず様々な生物が希土類元素と接触するようになってきている。平成 10 年度の文部省（現文部科学省）重点領域研究「人間—地球系」の調査研究報告によると、21 世紀前半の予想される危機として 2030 年頃までに先端技術に多用された各種の有害元素による環境汚染が挙げられ

ている。現在までにヒトに対する希土類元素の毒性については、腐蝕写真製版業者、レンズ研磨業者、希土類元素粉塵曝露者など職業的な曝露を受けた人が塵肺になる可能性が指摘されている。一方、中国では、希土類元素と各種の作物や樹木との関わりが注目され、様々な植物を対象に希土類元素の施肥効果が研究されているが、検証不十分である。このように、希土類元素の生体への影響に関する研究は環境生態学分野あるいは環境衛生学分野において重要な研究課題であるに

もかわらず、ほとんど行われていない。

2. 研究の目的

本研究は、希土類元素の生体影響を明らかにするために、希土類元素により誘起される生体応答に関し、環境変化に敏感に応答する微生物および哺乳類の代表としてヒトの生理や代謝研究に用いられているマウス並びにヒト由来の試料を用いて、基礎的な知見を得るとともに、希土類元素による環境汚染のリスク評価を行うことを目的に行われた。これらの研究を通じて、希土類元素が生体に及ぼす様々な影響を明らかにすることにより、希土類元素特有の生理作用や新機能が発見される可能性があり、生物無機化学分野に新たな領域を開拓するもので、この分野に大きなインパクトを与えるものと期待される。さらに、本研究は、希土類元素の有害性や毒性を微生物および哺乳類を用いて評価するもので、環境保全や環境衛生の観点からも貴重な情報を提供するものである。

3. 研究の方法

(1) 微生物について

土壌、河川水、湖沼水等の試料を適宜滅菌水で希釈し、30 μ M 希土類元素含有 1/100 希釈肉汁寒天培地に塗布し、30°C で 7 日~10 日培養する。生じたコロニーを純化し、希土類元素の有無によりコロニー性状が異なる微生物を分離する。分離菌株を分子系統解析および菌学的特徴に基づいて同定する。これらの分離菌株について常法に従い、培養特性並びに酵素タンパク質および遺伝子のレベルで解析を進める。

(2) マウスについて

幼弱、成熟および老齢マウスを用い、可溶性形態および難溶性もしくは不溶性の粉塵形態の希土類化合物をそれぞれ静脈内注射および経口投与あるいは吸入曝露し、吸収、臓器内分布、排泄挙動を経時的に追跡し、肝や腎の機能、造血系、抗酸化系への影響を調べる。さらに、希土類元素の催奇性や遺伝毒性との関連を明らかにするために、生殖能への影響について血中性ホルモン濃度、精子数の変化、生殖器への取り込みと必須元素の濃度変化との関連から検討する。一方、骨については、大腿骨における投与元素の取り込みと骨塩量、骨強度、ハイドロキシアパタイトの構造変化等を調べる。

4. 研究成果

(1) 微生物に対する影響

図 1 に、分離菌株 5 株の希土類元素の有無におけるコロニー性状を示す。なお、これらの菌株は独立行政法人農業生物資源研究所 ジーンバンクに供託、登録済みである。

① Ce 応答菌 CE-3 株

CE-3 株は、Ce 存在下でコロニーの周辺に多糖類ラムナンを産生する細菌として分離された菌株で *Bradyrhizobium* sp. CE-3 と同定された (登録番号: MAFF 211645)。本菌株のラムナン生産は Ce のほか La や Nd などの

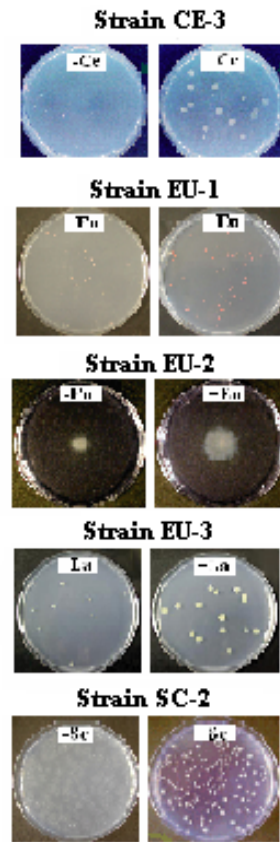


図1 希土類元素応答微生物

軽希土で認められ、その他の希土類元素や生体関連の金属元素では認められなかった。次に、CE-3 株のラムナン生産における Ce の効果を明らかにするために、プロテオーム解析を行った。その結果、Ce 存在下で培養した菌体には非存在下で培養した菌体に比べ 50 倍以上生成量が増加したタンパク質が見出された。N-末端アミノ酸配列の相同性検索を行ったところ、本タンパク質は *B. japonicum* USDA110 のメタノール脱水素酵素大サブユニットと 86.6% の相同性を有していた (表 1)。さらに、メタノールおよび Ce

表1 *Bradyrhizobium* sp. CE-3メタノール脱水素酵素のホモログ

Spot No.	Protein match	Identity (%)	Sequence
1871			NDELHKMAQNPQDWV ::: :: :::: :::
	MDH MXAF*	86.6	NDELTKMSQNPQDWV (<i>B.japonicum</i> USDA110)

MDH:メタノール脱水素酵素

共存下で旺盛な増殖が観察されたことから、

本菌株のメタノール代謝が Ce により活性化されることが窺われた。そこで、粗酵素液中のメタノール脱水素酵素活性を調べたところ、メタノールおよび Ce 共存下で活性の著しい上昇が観察された。これらの結果は、Ce がメタノール脱水素酵素合成の調節、あるいは酵素自身の構成元素として活性発現に深く関わっていることを示唆している。

②Sm 応答菌 EU-1 株

本菌株は、Eu あるいは Sm 添加培地でコロニー径が大きくなる細菌で *Methylobacterium* sp. EU-1 と同定された（登録番号：MAFF211642）。本菌株は Sm 含有メタノール液体培地にて増殖が促進された。そこで、本菌株のメタノール脱水素酵素活性を測定したところ、高い比活性（対照の 5.4 倍）を示した。ところが、Sm の代わりに La や Ce を培地に添加すると、本酵素の比活性が 140 倍～150 倍も上昇することが分かった。この活性上昇はメタノール脱水素酵素タンパク質が大量に生成されたためであることが分かった。次に、メタノール脱水素酵素を精製、N-末端アミノ酸配列の解析を行った。その結果、本酵素は *Methylobacterium* 属の PQQ 依存性脱水素酵素ファミリーの一員であることが明らかとなった（表 2）。

表 2 *Methylobacterium* sp. EU-1 のメタノール脱水素酵素タンパク質

Protein	Identity	Sequence
Methanol dehydrogenase (CE=3)		NESVMKGLANPAEQVLQIVDYAN
PQQ (<i>M. populi</i> BJ001)	95%	NESVLKGLANPAEQVLQIVDYAN
Methanol dehydrogenase large subunit homolog (<i>M. extorquens</i>)	91%	NESVLKGVANPAEQVLQIVDYAN
PQQ-dependent dehydrogenase (<i>M. extorquens</i> PA1)	91%	NESVLKGVANPAEQVLQIVDYAN

③Eu 応答菌 EU-2 株

EU-2 株は、Eu 含有軟寒天培地上でコロニー径の拡大が観察され、鞭毛運動が Eu により活発化されることが窺われた菌株で *Nevskia ramosa* EU-2 と同定された（登録番号：MAFF211643）。本菌株は、液体培養において Eu 非存在下で生菌数に大きなバラツキが観察された。そこで、顕微鏡観察したところ、Eu 存在下では細胞がそれぞれ遊走細胞として単独で存在していたのに対し、Eu 非存在下では培養時間が長くなるに伴い、細胞同士が凝集し 5 個～10 個の細胞からなる菌塊を形成した。さらに、トルイジンブルー染色により菌体周辺に細胞同士を接着させているバイオフィームが観察された。*N. ramosa* はバイオフィームを形成し菌塊を形成することが知られている。従って、本菌株においては、Eu 存在下では、Eu がこのバイオフィームの生成を阻害するために、ほとん

ど遊離細胞として存在していたのであろう。

④La 応答菌 EU-3 株

本菌株も、Eu 存在下でコロニー径が大きくなる細菌として分離されたもので、*Sphingomonas* sp. EU-3 と同定された（登録番号：MAFF211644）。Eu よりも、La, Ce, Pr, Nd などの軽希土が顕著なコロニー径の拡大を引き起こし、これらの元素が増殖促進効果を有していることが分かった。そこで、液体培養にて、La および Ce に加えて、コロニー径の拡大を引き起こさなかった Yb の添加効果を調べた。その結果、対数増殖期まではほぼ同様の増殖経過を示したが、定常期以降の挙動に大きな違いが観察された。すなわち、無添加および Yb を添加した培地では、定常期がほとんど見られず、直ちに死滅期に入り急激に生菌数が減少したが、La または Ce を添加した培地では定常期が長く続くことが分かり、La や Ce が EU-3 株のコロニー形成能を延長させることが分かった。La 無添加の場合でも、培地の NaCl 濃度を上げるとコロニー形成能が延長されることから、本菌株の浸透圧調節に La や Ce などの軽希土が関与している可能性が示唆された。

⑤Sc 応答菌 SC-2 株および *Streptomyces* 属

SC-2 株は、Sc 存在下で特異的に赤紫色の色素を生産する真菌類（カビ）で、*Fusarium solani* と同定された（登録番号：MAFF239849）。また、Sc のみが色素生産を誘発させ、他の希土類元素や生体関連金属元素では誘発されなかった。微生物による色素生産は典型的な二次代謝である。そこで、*Streptomyces* 属による抗生物質生産に及ぼす Sc の影響について検討を加えた。その結果、供試菌株の増殖が阻害を受ける濃度の Sc によって、抗生物質生産が著しく促進されることが判明した。さらに、Sc が *S. lividans* による抗生物質アクチノロジンの生産を誘発することが判明した。以上の結果から、Sc は微生物の 2 次代謝に密接に関わっていることが明らかとなった。

(2) マウスに対する影響

①尾静脈内投与

TbCl₃ の投与量を 10, 25 または 50 mg/Kg とし単回尾静脈内投与したところ、50 mg/Kg 投与では翌日までに約半数が死亡した。取り込まれた Tb はほとんど血漿中に存在し、短時間のうちに低下し、20 時間後に検出限界以下になった。投与量と血漿中の濃度には逆相関が見られた。Tb は主に肝、肺、脾に分布しており、3 臓器中の回収率は 83%～90%であった。腎、心臓、膵、精囊、精巣にも低濃度ながら Tb が検出され、骨と骨髄にも比較的高濃度で検出された。他の希土類元素を用いて同様の実験(25 mg/Kg)を行った結果、投与した元素濃度は脾と肺で高く、

次いで肝であった。肺と脾における濃度は投与した希土類元素の種類により異なり、YおよびEu~Dyは肺>脾、La, Ce, Ybは脾>肺、その他の元素は肺=脾であった。ただし、肝は大きい臓器であるため、いずれの元素とも取り込み総量はもっとも多かった。投与量の違いによる各臓器への分布状況について調べたところ、投与量を1 mg/Kgと少なくすると10 mg/Kg投与時に比べ、各臓器への分布パターンに差が見られたが、元素による違いは少なかった。また、25 mg/Kgおよび50 mg/Kg投与群で、肺におけるTb濃度とCa濃度には高い正の相関が認められたが、この相関は10 mg/Kg投与では見られなかった。投与量を1 mg/Kgと10 mg/Kgとしたときに体内に取り込まれたTb, SmおよびYbの尿中への排泄量は数%以下であったが、1 mg/Kg投与でYb (5.7%)がTb (2.1%)とSm (1%)に比べかなり高かったことから、尿中への排泄のされやすさは元素の種類によって異なっていることが分かった。またTbとYbを投与した場合、糞への排泄量は尿に比べ多く、投与量の10%~10数%であった。

②経口投与

可溶性塩化物 $\text{SmCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、酸化物 Sm_2O_3 、合金 $\text{Sm}_2\text{Co}_{17}$ 、 $\text{Sm}_2\text{Fe}_{17}$ および $\text{Sm}_2\text{Fe}_{17}\text{N}_3$ の5種のSm化合物を胃ゾンデにて強制経口投与した。投与後、経時変化を調べたが、体重、臓器重量への影響は認められず、また肉眼的観察によっても変化は認められなかった。肝のSm濃度は、7日目で SmCl_3 群 > Sm_2O_3 群 >> $\text{Sm}_2\text{Fe}_{17}$ 群 = $\text{Sm}_2\text{Fe}_{17}\text{N}_3$ 群 > $\text{Sm}_2\text{Co}_{17}$ 群 = 対照群 ($\leq 1 \text{ ng/g}$) であり、4週間後には SmCl_3 群と Sm_2O_3 群では半減した。また、どの群のマウスにおいても骨には数十 ng/g オーダーのSmが検出されたが、骨髄は検出不可であった。経口投与による肝、腎、脾、肺の4臓器のSmの合計量はもっとも高かった SmCl_3 投与群でも投与量の0.002%にすぎず、肝における検出量は静脈内投与の1/100程度で消化管における吸収率は極めて低いことが分かった。供試したSm化合物の取り込み量の差は、HCl溶液(人工胃液)への溶解性の違いによるものと推察された。いずれの化合物の形態でも、経口摂取によるSmの体内蓄積は起こりにくい。

③酸化サマリウム粒子吸入曝露

酸化サマリウム(Sm_2O_3)粒子(平均粒径 $5 \mu\text{m}$)を用いて、吸入曝露装置内でマウスを飼育した。15 mg/m³の濃度で5日間/週、1日7時間の条件で、1週間又は4週間曝露した。また、二酸化ケイ素 SiO_2 (平均粒径 $4 \mu\text{m}$)を使用する実験も行った。1週間曝露では対照群と体重差は認められなかった。曝露終了翌日において、Sm投与群の臓器重量は腎、脾でやや増加し、心臓と精巣でやや減少した。曝露期間4週間では体重の抑制傾向が見られ

たが、その後回復し非曝露群と同程度になった。Si曝露群では体重増加が抑制され、その後低体重のまま推移した(図2)。肺中Sm濃度は1週間曝露で約50 $\mu\text{g/g}$ 、4週間で約120 $\mu\text{g/g}$ で曝露期間に応じて増加した。4週間曝露翌日の肺組織を調べたところ、マクロファ

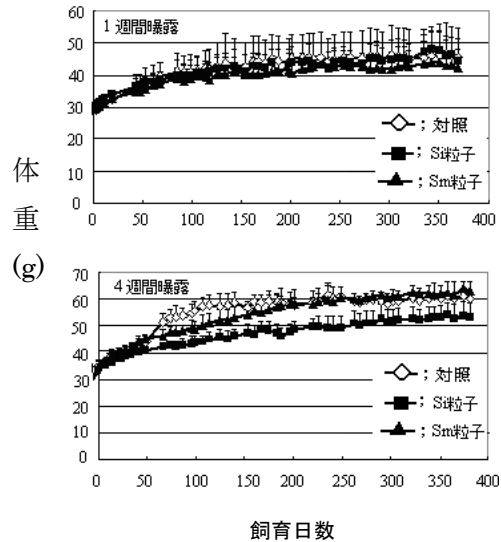


図2 Sm_2O_3 および SiO_2 粉塵曝露後の体重変化

ージがやや増加したが、急性の炎症は認められなかった。曝露終了後4週間経過するとSm

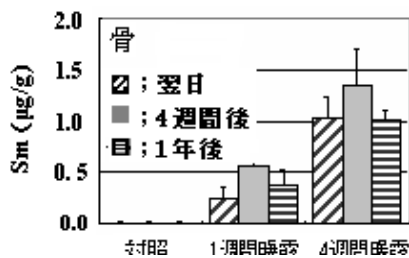
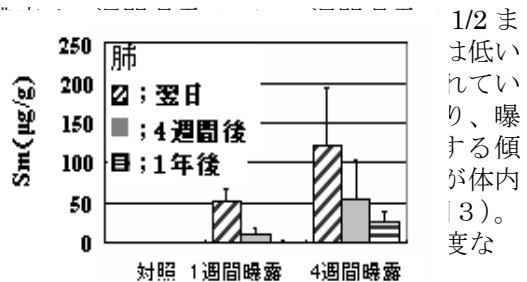


図3 吸入曝露したSmの肺および骨中濃度と経時変化

1/2 また低いれていり、曝する傾が体内(3)。変な

がら Sm が残存していたことから、いったん取り込まれた Sm は長期間体内に留まることが分かった (図 3)。

④セリア粒子曝露

セリア粒子は古くからレンズ研磨に用いられ、また最近では紫外線遮蔽効果を利用した化粧品に応用されている。そこで化粧品用に開発されたセリア粒子 (平均粒径 $0.95 \mu\text{m}$) と酸化セリウム (CeO_2) 粒子 (平均粒径 $1 \mu\text{m}$ と $5 \mu\text{m}$) を用いて曝露実験を行った。曝露期間および曝露開始 50 日間の体重変化を追跡したが、非曝露の対照群と有意な差はなかった。平均粒径 $5 \mu\text{m}$ の CeO_2 粒子曝露群に比べ、平均粒径 $0.95 \mu\text{m}$ のセリア曝露群では投与翌日において約 10 倍濃度の Ce が肺に取り込まれており、粒径が小さいと肺への取り込み率が明らかに高くなる。肝、腎、脾、精巣における Ce 濃度は $0.1 \mu\text{g/g}$ 以下であったので、肺からの移行はほとんど起こらないことが分かった。骨中の濃度も $0.1 \mu\text{g/g}$ 以下で、曝露期間、粒径等の影響については判断できなかった。

平均粒径 $5 \mu\text{m}$ の CeO_2 粒子を用いた 1 週間および 4 週間曝露群は終了翌日の肺中 Ce 濃度はそれぞれ約 $15 \mu\text{g/g}$ および $37 \mu\text{g/g}$ であった。 CeO_2 粒子は同じ粒径の Sm_2O_3 粒子に比べ、その肺中濃度は $1/3 \sim 1/4$ 程度と低かったため、取り込まれにくいことが分かった。粒径が $1/5$ 程度になると、肺における Ce 濃度が著しく増加した。しかし、Ce は Sm と異なり、他の臓器や骨などへの移行はほとんど認められなかった。体内において他の臓器への移行は、いったん溶解して血流を介していると考えられるので、体液への溶解性の違いによるものと解される。

以上の諸結果より、希土類化合物の生体影響は経口に比べて吸入で起こりやすいこと、吸入した化合物に含まれる希土類元素の種類と粒子径により、その生体内分布と蓄積性が異なることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① A. Shinohara, M. Chiba and T. Kumasaka, Behavior of samarium inhaled by mice-exposure length and time-dependent change. J. Radioanal. Nuclear Chem., 2009, 印刷中, 査読有
- ② 奥田雅代, 河合啓一, 鈴木徹, 岩間智徳, La (Ce) による *Methylobacterium* sp. EU-1 のメタノール脱水素酵素の過剰生産, 希土類, 52, 72-73, 2008. 査読無
- ③ 篠原厚子, 生体と希土類, 金属, 78, 779-785, 2008. 査読無
- ④ K. Kawai, G. Wang, S. Okamoto and K.

Ochi, The rare earth, scandium causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. FEMS Microbiol. Lett., 274, 311-317, 2007. 査読有

- ⑤ A. Shinohara, M. Chiba and Y. Inaba, Comparative study of the behavior of terbium, samarium, and ytterbium intravenously administered in mice, J. Alloys and Compounds, 408-412, 405-408, 2006. 査読有
- ⑥ 篠原厚子, 千葉百子, 稲葉裕, 吸入曝露したサマリウムの体内挙動, 希土類, 48, 94-95, 2006. 査読無
- ⑦ K. Kawai, T. Suzuki and T. Iwama, Microorganisms and Human Well-being, 174-177, 2005. 査読無
- ⑧ 篠原厚子, 希土類化合物の生体影響—ヒトおよび実験動物に関する知見—, 希土類, 47, 57-64, 2005. 査読無
- ⑨ A. Pertiwinigrum, Y. Ino, T. Suzuki and K. Kawai, Distribution of ytterbium (Yb) in cells of *Streptomyces* sp. YB-1 which can accumulate Yb, and reusability of cells and cell membrane as adsorbent for Yb, J. Bioeng. Biosci., 98, 214-216, 2004. 査読有
- ⑩ アンバル ペルチウィニングラム, 鈴木徹, 岩間智徳, 河合啓一, イッテルビウムを優先的に吸着する *Streptomyces* sp. の分離及びその吸着特性, 環境技術, 33, 50-56, 2004. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 松永美香, 小島弘照, 岩間智徳, 鈴木徹, 河合啓一, 希土類元素存在下における *Sphingomonas* sp. EU-3 の増殖挙動, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 82, 2008 年 3 月 27 日, 名古屋
- ② T. Matsukawa, A. Shinohara, M. Chiba T. Kumasaka, J. Kobayashi and Y. Inaba, Study of samarium on mice administered by inhalation or intravenous injection, Abstract of 2008 Third Asia-Pacific Winter Conference on Plasma Spectrometry, 170, 2008, Nov. 20, Tsukuba, Japan.
- ③ N. A. Fitriyanto, M. Fushimi, T. Iwama and K. Kawai, Methanol metabolism of *Bradyrhizobium* sp. CE-3, 日本生物工学会大会講演要旨集, 176, 2008 年 8 月 27 日, 仙台.
- ④ A. Shinohara, M. Chiba and Y. Inaba, Biological behavior of samarium compounds in mice Comparative studies of oral, intravenous, and inhalation routes, Abstract Book of International Symposium on Metallomics

- 2007, 169, 2007, Dec. 1, Nagoya.
- ⑤ 奥田雅代, 河合啓一, 鈴木徹, 岩間智徳, 希土類元素と *Methylobacterium* sp. EU-1 のメタノール脱水素酵素, 日本生物工学会大会講演要旨集, 89, 2007年9月27日, 東広島.
- ⑥ K. Kawai, M. Okuda, T. Iwama and T. Suzuki, Growth behavior of *Methylobacterium* sp. EU-1 in the presence of Sm, Abstracts of The 5th International Conference on Rare Earth Development and Application, 43-44, 2007, Aug. 9, Baotou, China
- ⑦ A. Shinohara, M. Chiba and Y. Inaba, Biological Investigation after oral administration of samarium compounds in mice, Abstracts of The 5th International Conference on Rare Earth Development and Application, 35, 2007, Aug. 9, Baotou, China.
- ⑧ 河合啓一, 佐久間隆介, 岩間智徳, 鈴木徹, Sm存在下における *Methylobacterium* sp. EU-1 の培養特性, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 253, 2006年3月27日, 京都.
- ⑨ K. Kawai, T. Suzuki and T. Iwama, Bioseparation of rare earth elements using microorganisms, Proceedings of The 2nd Biannual Meeting on Bioprocess Engineering, 15-22, 2005, Nov. 20, Yogyakarta, Indonesia.
- ⑩ 平野朱音, 川澄剛士, 高野知子, 岩間智徳, 鈴木徹, 河合啓一, Eu存在下における *Nevskia ramosa* EU-2 の増殖挙動, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 219, 2005年3月30日, 札幌.
- ⑪ M. Chiba, and A. Shinohara, Utilization of mass spectrometry for trace element research. Part 1: Distribution of lanthanide elements, 5th International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives, 831-837, 2005, Oct. 8, Athens, Greece.
- ⑫ N. Ichigo, T. Suzuki, T. Iwama, K. Kawai and H. Murase, Production of purple pigment by *Fusarium solani* in the presence of scandium (Sc), Rare Earths '04 in Nara, 79, 2004, Nov. 8, Nara, Japan.
- ⑬ A. Shinohara, M. Chiba, Y. Inaba, Comparative study of the behavior of terbium, samarium, and ytterbium administered intravenously in mice, Rare Earths '04 in Nara, 80, 2004. Nov. 8, Nara, Japan.
- 〔図書〕 (計2件)
- ① 河合啓一, (株) エヌ・ティ・エス, 希土類の材料技術ハンドブック, (足立吟也監修), 37章 希土類の農業への応用, 2008, 896-904.
- ② 篠原厚子, (株) エヌ・ティ・エス, 希土類の材料技術ハンドブック, (足立吟也監修), 39章 希土類の生体への分布, 2008, 926-933.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
河合 啓一 (KAWAI KEIICHI)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号: 00002064
- (2) 研究分担者
篠原 厚子 (SHINOHARA ATSUKO)
順天堂大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 90157850
- (3) 連携研究者
なし