

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360475

研究課題名（和文） バイオ技術を用いたナノコロイド生成と放射性核種との動的相互作用機構の解明

研究課題名（英文） Study on biological nano-colloids formation and its interaction with radionuclides

研究代表者

大貫 敏彦（OHNUKI TOSHIHIKO）

独立行政法人日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究主席

研究者番号：20354904

研究成果の概要（和文）：

廃棄物に含まれるアクチノイドの移行性を高める可能性があるナノコロイドの生成と安定性及び微生物、鉱物との相互作用を調べた。その結果、3 価アクチノイド（代替として希土類元素を使用）のナノコロイドが細胞表面から直接生成し、細胞が分解した後も安定に存在することを明らかにした。さらに、ナノコロイド中のアクチノイドは微生物に吸着することが示唆されるとともに、鉱物中の元素との配位子交換などの現象も生じ得る可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Nano sized colloids in groundwater have a potential to enhance the migration of actinides. In this study the nano-colloids generation process, its stability, and the interaction with microorganisms or minerals have been studied. We have found that trivalent actinides (REEs are used as alternative) formed nano-colloids on the cell of microorganisms, and they are stable after the cells are lysed. In addition, actinides in the nano-colloids are adsorbed on microbial cell surface and cause legand exchange with elements in the minerals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・原子力学

キーワード：バックエンド

## 1. 研究開始当初の背景

放射性廃棄物地層処分において、廃棄体から環境中に漏出した放射性核種（以下、核種）は周囲に存在する様々な地下環境構成成分と相互作用し、その化学状態を変えながら地下環境中を移行する。地下環境中での核種の

化学状態は、有機・無機の様々な配位子との錯体形成、鉱物表面、微生物細胞及びコロイドへの結合によって複雑な分布を呈する。特に、ナノサイズのコロイドは地下環境中に安定に存在し地下水と同等の速度で移行することから、核種がナノコロイドと強固に結合

することにより、核種の移行が促進されることが懸念されている。本研究の分担者は地下環境中の Pu を含む nm サイズのコロイドの分離に成功し、鉄含有コロイド内に Pu が取り込まれていることを明らかにした。一方、実験室においては核種とコロイドとの相互作用を解明するために、市販の Fe 酸化物等を用いて核種との相互作用を調べてきたが、地下環境で生じているコロイドが関与する核種の移行現象を理解するまでには至っていない。この理由は、実験室では Fe 酸化物の鉱物相は変化しない、いわゆる静的な条件であるのに対して、地下環境ではコロイドの生成、成長、核種との相互作用、移行の現象が同時に進行する、すなわち動的な系で起こっているためである。動的な系での相互作用による核種の化学状態は、静的な系でのコロイド表面への吸着とは異なる。我々は、数十ミクロンサイズの Fe 酸化物、あるいは Mn 酸化物生成過程における U(VI) 及び Ce(III) の化学状態を調べた結果、静的な条件で得られる表面への吸着とは異なり、U(VI) が鉱物化したり、Ce(III) が Ce(IV) に酸化されることを明らかにした。これらの結果は、コロイドと相互作用した核種の地下環境中の挙動を理解するためには、コロイド生成過程における核種の化学状態変化を動的な系での実験により検討する必要があることを示している。

一方、地下環境中の核種の移行へのコロイドの影響については 1980 年代から指摘されていた。米国の放射性廃棄物処分場では限外濾過法などにより 0.2 ミクロン以下の可溶性ではあるが例えば 4nm 以上のサイズのコロイドに Pu 等が存在することが明らかにされた。最近の研究ではネバタ核実験場(米国)、マヤック(ロシア)でコロイドに Pu が付着していることが報告された。特にマヤックでは Nano-SIMS により Pu が Fe コロイドに取り込まれている直接のデータが示された。さらに、環境中に微生物起源の Fe 含有コロイドが存在することが示された。国内においては、ベントナイトコロイド、腐植物質へのアクチノイドなどの吸着及び錯形成の研究が精力的に行われ、静的な系における分配係数の算出や錯生成を表すモデルなどが提案されている。このように、コロイド態の核種移行挙動の解明は世界的にも非常に関心が高く、重要性が指摘されている。しかし、Fe, Mn などを含むコロイドを生成し、その特性の評価、溶液中に共存する核種の動的な系での挙動を検討する研究はこれまでなされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、地層処分安全評価モデルの信頼性向上に貢献するため、微生物による生物起源(以下、BG)コロイドの生成と核種移行への影響の理解をベースとして、動的な系で生成するコロイド態核種の化学状態の解明を図ることを最終目標とする。コロイド態の核種移行解明には、

(1) BG コロイドの生成条件と特性を明らかにすること、

(2) アクチノイドナノコロイドと微生物あるいは鉱物との相互作用を明らかにすること、及び

(3) 地下環境でのコロイド態核種の安定性を明らかにすること、が必要である。

そのため、微生物により Mn や希土類元素を含む BG コロイドを生成し、その粒度、結晶性、構成元素の酸化数、配位環境などの特性と生成条件との関係を明らかにするとともに、アクチノイドコロイドと微生物あるいは鉱物との相互作用によるアクチノイドの化学状態変化を明らかにすること、模擬地下水を用いた溶解実験を行い、ナノコロイドの状態を調べてコロイド態核種の安定性を評価する。

## 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため、以下の2つ研究を実施した。

(1) 酵母細胞表面での希土類元素のナノコロイド形成機構の解明研究

(2) アクチノイドナノコロイドと微生物、鉱物との相互作用解明

酵母細胞表面での希土類元素のナノコロイド形成機構の解明研究では、酵母細胞(X-2180)を、YPD ブロス培地で生育して遠心分離により回収した。細胞は 0.1M NaCl 溶液により水洗いをしたのち、ナノコロイド生成実験に用いた。酵母をポリカーボネート遠沈管内で、 $18 \times 10^{-4}$  M  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$  を溶解させた水溶液(30mL)に添加して、溶液の pH は 3, 4, 5 に調整し、室温で 120 時間静置した。水溶液中の Ce 濃度変化は、溶液中の Cs 濃度を ICP-AES による測定から、pH の変化もモニターした。

酵母細胞については、水溶液と遠心分離により分離後、イオン交換水で洗浄して、細胞表面を電子顕微鏡により分析した。さらに、細胞表面に濃集した Ce の化学状態を XANES により分析した。

さらに、Ce 溶液中での酵母の生存能を調べるため、pH3, 4, あるいは 5 で Ce 濃度  $18 \times 10^{-4}$  M の水溶液に酵母細胞を添加し、接触時間と細胞の生存率の関係を調べた。細胞の生存の判別にはメチレンブルーによる染色法を用いた。顕微鏡下で死滅細胞が青く染色することから、生存細胞と区別して計測した。

また、生成した BG ナノコロイドの長期安定性を調べるため、Ce と同じ実験を Yb を用いて行い、静置期間を 2 ヶ月にしてナノコロイドの安定性を電子顕微鏡による解析により調べた。

水溶液中に溶解するアクチノイドナノコロイドと微生物、鉱物との相互作用を解明実験では、アクチノイドナノコロイドとして希土類-シデロフォア錯体を用いた。実験では、シデロフォア (Desferrioxamine B, 以下 DFO) を、微生物としては *Pseudomonas fluorescens* を、鉱物としては  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  を用いた。

実験では、11 の希土類元素 (La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho 及び Er) を水溶液中に溶解して、微生物あるいは鉱物と接触させた。溶液の pH は 4-9 に調整して Tris 緩衝液により pH の変化を避けた。30 分間接触させた後、水溶液を  $0.2\mu\text{m}$  のフィルターにより分離し、水溶液中の希土類元素濃度を ICP-AES により測定した。微生物あるいは鉱物への希土類元素の吸着は、次式表される分配係数により評価した。

$$K_d(\text{REE}) = c(\text{REE}_{\text{init}} - \text{REE}_{\text{filt}}) / \text{REE}_{\text{filt}}$$

ここで、 $[\text{REE}]_{\text{filt}}$  及び  $[\text{REE}]_{\text{init}}$  は反応後及び初期の希土類元素濃度であり、 $c$  は固液比である。 $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  の溶解を調べるため、水溶液中の Al-DFO 錯体を HPLC-ESI-MS により測定した。Ce の酸化状態を調べるため、水溶液及び希土類元素水溶液と接触した微生物、鉱物試料を XANES により分析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 酵母細胞表面での希土類元素のナノコロイド形成機構の解明研究

水溶液中の Ce 濃度の経時変化から、酵母との接触により Ce 濃度は減少した。水溶液の pH の影響としては、高い pH の場合が Ce 濃度の減少が大きかった。Ce を濃集した酵母細胞の Ce、 $L_{\text{III}}$  吸収端における XANES スペクトル (図 1) から、細胞に濃集した Ce のスペクトルでは 1 本のピークが  $5.730\text{keV}$  に観察された。スペクトルのピークは水溶液の pH により変わらなかった。Ce (III) 及び Ce (IV) の標準物質のスペクトルでは、1 本あるいは 2 本の鋭いピークが観察された。これらの結果から、Ce の酸化数は III であることが分かり、細胞表面での酸化による  $\text{CeO}_2$  の生成による濃集ではないことが分かった。

Ce と接触した酵母細胞を電子顕微鏡で分析した結果 (図 2) から、細胞表面に  $100\text{-}200\text{nm}$  の沈殿物が生成していること、EDS の分析から、Ce の他に P のピークが検出された。これらの結果から、細胞表面には、Ce と P を含むナノサイズのコロイドが生成したことが明らかとなった。さらに、細胞を透過電子顕微鏡で観察して、電子線解析パターンを解析した結果、モナザイト構造であることが分かり、

生成したナノコロイドは Ce リン酸塩鉱物 (モナザイト) であることが分かった。また、高分解能の透過電子顕微鏡による解析から、ナノコロイドが細胞表面から直接成長している証拠も得られた。

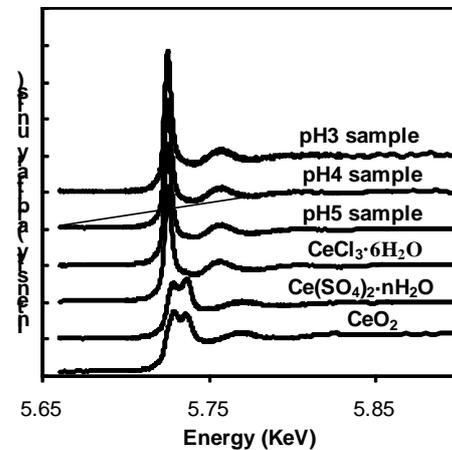


図 1 Ce を濃集した酵母細胞の Ce、 $L_{\text{III}}$  吸収端における XANES スペクトル。3 価 Ce では 1 本のピークが 4 価では 2 本現れる。

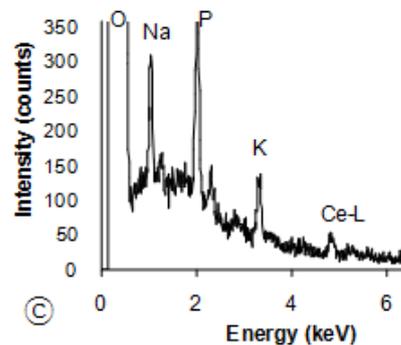
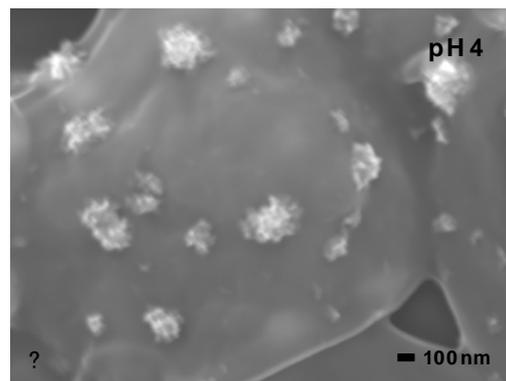


図 2 Ce 水溶液と接触した酵母細胞の電子顕微鏡写真 (上)、EDS スペクトル (下)。写真中の白色の粒子が Ce を含むナノコロイドであり、Ce 及び P を含むことが分かる。

Ce 溶液中における酵母生存率については、

70-80%の酵母が120時間接触後生存していた。この結果は、Ceを含まない溶液中での生存率である60%(pH3)、86%(pH4)、67%(pH5)と比較するとpH4及び5において若干低い。このことから、pH3においては、H<sup>+</sup>イオンの影響が、pH4及び5においては、Ce<sup>3+</sup>イオンの影響により酵母生存率が低下したと考えられた。

生成した希土類リン酸塩ナノコロイドの長期的安定性を調べた結果、2ヶ月後においてもナノコロイドは安定に水溶液中に存在していることを、電子顕微鏡による観察から明らかにした。一方、細胞はほとんど観察されなかった。この結果から、細胞が分解した後でも希土類元素を含むナノコロイドは安定に存在することが明らかとなった。

## (2) アクチノイドナノコロイドと微生物、鉱物との相互作用解明

希土類元素(代表としてSm)のK<sub>d</sub>と水溶液のpHの関係(図3)から、微生物細胞への吸着ではK<sub>d</sub>はpHの増加とともに減少した。一方、鉱物への吸着ではK<sub>d</sub>はpHの増加に伴い増加した。この結果は、水溶液中にDFOが溶解していることにより、希土類元素の吸着が影響を受け、微生物細胞と鉱物への吸着では影響の現れ方が全く異なることを示している。

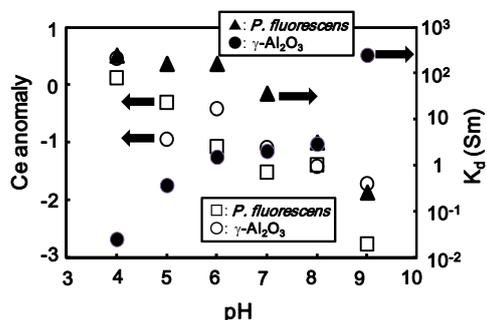


図3 DFOが溶解する水溶液中の希土類元素(図ではSmを示す)の微生物及び鉱物に対する分配係数(K<sub>d</sub>)及びCeの吸着異常のpH依存性。

鉱物と希土類-DFO錯体との反応では、反応後の水溶液中のAl濃度の増加とともにHPLC-ESI-MSによるAl-DFO錯体の存在が示された。Alの溶解は高いpHの水溶液ほど顕著であった。この結果は、鉱物からAlが溶解する配位子交換が起こったことを示唆している。したがって、Alの溶解により希土類元素の吸着が促進されたものと考えられる。

微生物及び鉱物への希土類元素のK<sub>d</sub>のパターンから、CeのK<sub>d</sub>が両隣のLa及びPrのK<sub>d</sub>よりも小さくなる、すなわち負のCe異常が観察された。水溶液中のCe-DFOのCe L<sub>III</sub>吸着端のXANESスペクトルから、溶液中のCe

の酸化状態は4価であることが分かり、希土類元素-DFO錯体の安定性が4価希土類元素の方が3価よりも大きなことから、吸着されにくくなったものと推察された。Cs異常(DA)を次式で表すことにより、

$$DA = \log K_d(\text{Ce}) - [\log K_d(\text{La}) + \log K_d(\text{Pr})]/2.$$

図3にプロットした。DAは水溶液のpHが上昇するに従い、減少した。興味深いことに、DAのpHの上昇に伴う減少は、微生物及び鉱物で同じであった。

これらの結果から、ナノコロイド中のアクチノイドは微生物に吸着することが示唆されるとともに、鉱物中の元素との配位子交換などの現象も生じ得る可能性が示された。

## 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 20件)

- ① T. Ohnuki, T. Yoshida, Interactions of the rare earth elements - desferrioxamine B complexes with *Pseudomonas fluorescens* and  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Chemistry Letters, 41, (2011) pp98-100. 査読有  
DOI:10.1246/cl.2012.98
- ② K. Tanaka, Y. Tani, T. Ohnuki, Specific Sorption Behavior of Actinoids on Biogenic Mn Oxide, Chemistry Letters, 40 (2011), pp.806-807. 査読有  
DOI: 10.1246/cl.2011.806
- ③ N. Kozai, T. Ohnuki, M. Koka, T. Sato, T. Kamiya, Behavior of Paramecium sp. in solutions containing Sr and Pb: Do Paramecium sp. alter chemical forms of those metals?, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 269 (2011) 2393-2398. 査読有  
DOI: 10.1016/j.nimb.2011.02.052
- ④ N. KOZAI, T. OHNUKI, F. SAKAMOTO, Y. SUZUKI, K. TANAKA, 他2名, Accumulation of Co in Yeast Cells under Metabolically Active Condition -Implication for Role of Yeast in Migration of Radioactive Co-, J. Nucl. Sci. Technol., 48, 1206-1213(2011). 査読有  
DOI: 10.1080/18811248.2011.9711808
- ⑤ T. Ohnuki, N. Kozai, T. Ozaki, F. Sakamoto, Y. Suzuki, T. Nankawa, T. Yoshida, Effects of Organic Acids on Biotransformation of Actinides, in Nuclear Energy and the Environment; edited by Wai, C., Mincher B. J., ACS symposium series 1046, 333-348(2010). 査読有  
DOI: 10.1021/bk-2010-1046.ch025
- ⑥ M. Jiang, T. Ohnuki, N. Kozai, K. Tanaka, Y.

- Suzuki, F. Sakamoto, E. Kamiishi, S. Utsunomiya, Biological nano-mineralization of Ce phosphate by *Saccharomyces cerevisiae*, Chemical Geology, 2010, 277, 61-69. 査読有  
DOI: 10.1016/j.chemgeo.2010.07.010
- ⑦ Y. Suzuki, T. Nankawa, A. J. Francis, T. Ohnuki, Redox behavior of Ce(IV)/Ce(III) in the presence of nitrilotriacetic acid: A surrogate study for An(IV)/An(III) redox behavior, Radiochimica Acta, 98, 397-402(2010). 査読有  
DOI: 10.1016/j.chemgeo.2010.07.010
- ⑧ T. Ohnuki, N. Kozai, F. Sakamoto, T. Ozaki, T. Nankawa, Y. Suzuki, A. J. Francis, Association of actinides with microorganisms and clay: Implications for radionuclide migration from waste-repository sites, Geomicrobiology J. 27, 225-230, 2010. 査読有  
DOI: 10.1080/01490450903456715
- ⑨ K. Tanaka, Y. Suzuki, T. Ohnuki, Sorption and Oxidation of Tetravalent Plutonium on Mn Oxide in the Presence of Citric Acid, Chem. Letters, 38, pp.1032-1033 (2009). 査読有  
DOI: 10.1246/cl.2009.1032
- ⑩ T. Ohnuki, T. Yoshida, T. Ozaki, N. Kozai, F. Sakamoto, T. Nankawa, Y. Suzuki, A. J. Francis, Modeling of the Interaction of Pu(VI) with the Mixture of Microorganism and Clay, J. Nucl. Sci. Technol., 46, 55-59, 2009. 査読有  
DOI: 10.1080/18811248.2007.9711507

[学会発表] (計 20 件)

- ① T. Ohnuki, Biotransformation of Rare Earth Elements, Goldschmidt Conference, Prague, Aug. 14-19 (2011)(招待講演)
- ② K. Tanaka Y. Suzuki, T. Ohnuki, Co oxidation by Mn oxide produced by a Mn-oxidizing bacterium, Goldschmidt Conference 2010, Knoxville, June 14-18, 2010, A1024
- ③ Y. Suzuki K. Tanaka, T. Ohnuki, Effect of iron on reduction of Se(IV) by *Shewanella putrefaciens*, Goldschmidt Conference 2010, Knoxville, June 14-18, 2010, A1011
- ④ Y. Suzuki, T. Ohnuki, Electrochemical studies on microbial U(VI) reduction Asia-Pacific Symposium of Radiochemistry '09 2009, Nov. 29-Dec. 4, Napa USA. (招待講演)
- ⑤ T. Ohnuki, Y. Suzuki, T. Nankawa, Effects of organic acids on microbial reduction of U(VI), 238th American Chemical Society Meeting 2009, Aug.

- 16-20, Washington DC USA.(招待講演)
- ⑥ K. Tanaka, Y. Tani, T. Ohnuki, Ce oxidation by Mn oxide produced by *Acremonium* sp. strain KR21-2, Goldschmidt conference 2009, June 22-26, Davos, Swiss (2009).
- ⑦ T. Ohnuki, T. Yoshida, T. Nankawa, Y. Suzuki, A.J. Francis, Effects of Organic Acids on Interaction of Actinides with Microorganisms, Goldschmidt conference 2009, June 22-26, Davos, Swiss (2009).

[その他]

ホームページ等

<http://asrc.jaea.go.jp/soshiki/gr/mysite3/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大貫 敏彦 (OHNUKI TOSHIHIKO)  
独立行政法人日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究主席  
研究者番号：20354904

### (2) 研究分担者

香西 直文 (KOZAI NAOFUMI)  
独立行政法人日本原子力研究開発機構・先端基礎研究センター・研究主幹  
研究者番号：80354877  
田中 万也 (TANAKA KAZUYA)  
広島大学・サステナブル・ディベロップメント実践研究センター・講師  
研究者番号：60377992  
宇都宮 聡 (UTSUNOMIYA SATOSHI)  
九州大学・理学研究科・准教授  
研究者番号：40452792  
鈴木 義規 (SUZUKI YOSHINORI)  
東京工科大学・応用生物学部・助教  
研究者番号：20455281

### (3) 連携研究者

南川 卓也 (NANKAWA TAKUYA)  
独立行政法人日本原子力研究開発機構・バックエンド技術部・研究員  
研究者番号：30370448