

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 5 月 31 日現在

機関番号：12102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22656188
 研究課題名（和文） 細胞バンク登録株（ヒト）から分離したナノバクテリアの効率的培養法の開発とその利用
 研究課題名（英文） Development of efficient cultivation method for nanobacteria isolated from human leukemia cell line.
 研究代表者
 青柳 秀紀 (AOYAGI HIDEKI)
 筑波大学・生命環境系・教授
 研究者番号：00251025

研究成果の概要（和文）：細胞バンクに純粋株として登録されている、ヒト由来急性骨髄性白血病細胞からナノバクテリアを分離した。分離したナノバクテリアの培養諸特性を解析し、最適な培地を設定した。最適培地を用いてナノバクテリアを模擬微小重力培養し、最適化した結果、ナノバクテリアを高濃度に培養することが可能となった。本法はナノバクテリアの迅速検出法としても活用可能であった。本研究で用いたナノバクテリアはナノバクテリア様結晶と異なる諸特性を示した。

研究成果の概要（英文）：Nanobacteria were originally isolated from the human leukemia cell line. After various investigations, the optimal component of the medium for culturing nanobacteria was determined. The nanobacteria could be cultivated at high density under low-shear modeled microgravity with optimal medium (this culture method could be used for detecting nanobacteria quickly). The various characteristics of nanobacteria used in this study were different from the nanobacteria-like crystal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：ナノバクテリア、模擬微小重力培養、ヒト血清、動物培養細胞、最適培養条件、微粒子結晶

1. 研究開始当初の背景

1998年にKajanderとCiftcioglu¹⁾は動物細胞内でバクテリアに似た20～200 nmのサイズの微粒子が増殖している状態を見出し、“ナノバクテリア”と名付けた。また、ナノバクテリアは周囲にリン酸カルシウム（あるいはヒドロキシアパタイト）の殻を形成することから腎結石の形成に関与している可能性を示

唆した（実際に腎結石の内部でナノバクテリアが観察された）。

これに対し、(a) KajanderとCiftciogluの報告には実験ミスが含まれている、(b) ナノバクテリアが抗菌剤や加熱処理に対して著しく強い耐性を示す、(c) 直径が20～200 nmのサイズの微粒子では生命維持に必要な構成成分を保持することは困難である、等の点が指

摘され、「ナノバクテリアは生物ではなく微粒子結晶である」という反論が2000年にCisarら²⁾により出された。これ以降、現在に至るまで世界中で“ナノバクテリアは生物であるか無生物であるか?”という論争が医学分野を中心に続いてきている。さらにヒトの様々な組織でナノバクテリアが観察されており、各種の疾患（腎結石、動脈瘤、卵巣癌など）との関連や感染の可能性が数多く報告されている。

近年、MartelとYoung³⁾により、ナノバクテリアはタンパク質と無機物の相互作用により生成した結晶であるという無生物説（結晶説）が報告され、現在、世界のナノバクテリアをめぐる見解は無生物説に大きく傾いている。

このような現状の中、申請者は細胞バンクに純粋株として登録されている、ヒト由来急性骨髄性白血病細胞の培養過程でナノバクテリアを見出し、分離培養を試みた結果、ナノバクテリアは増殖し、継代培養も可能であった。また、医学分野で話題になっているナノバクテリアと複数の共通性が認められた。そこで、このナノバクテリアを用いて本研究を実施した。

1) Kajander, E.O., Ciftcioglu, N.: Nanobacteria: An alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *PNAS*, 95, 8274-8279 (1998).

2) Cisar, J.O., Xu, D., Thompson, J., Swaim, W., Hu, L., Kopecko, D.: An alternative interpretation of nanobacteria-induced biomineralization. *PNAS*, 97, 11511-11515 (2000).

3) Martel, J., Young, J.D.: Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles. *PNAS*, 105, 5549-5554 (2008).

2. 研究の目的

医学分野でナノバクテリアは各種疾患との関連が示唆され注目されているが、生物であるか無生物であるか確定されていない等、未解明な部分が多い。

本研究ではナノバクテリアの研究を高度に推進させることを目指し、申請者が実験を通して見出した、細胞バンク登録株中に共存している数百 nm のサイズを有するナノバクテリアを研究対象に、培養特性の解析（未解明なナノバクテリアの諸性質の解明）および高濃度大量培養法の開発を行った。さらに、本研究で得られた知見を活かし、ナノバクテリアの迅速検出法（分離法）の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) ナノバクテリア培養特性の解析と高濃度大量培養法の開発

申請者が見出した、細胞バンク登録株中に共存している数百 nm のサイズを有するナノ

バクテリアを研究対象に、効率的培養を実現するために、培地成分（各種の培地、各種の血清など）および培養条件がナノバクテリアの増殖に及ぼす影響の解析を行った。得られた知見に基づき最適培地を設定した。

Synthecon 社 (TX, USA) 製の細胞回転培養装置を用いてナノバクテリアの模擬微小重力培養を実施し、諸特性の解析を行った。得られた結果に基づき高濃度大量培養法の開発を試みた。

(2) ナノバクテリアと NBC（ナノバクテリア様結晶）との諸特性の比較

MartelとYoung³⁾の方法に従ってNBCを作成し、様々な培養特性や抗生物質や抗菌剤に対する応答性をナノバクテリアと比較解析した。

4. 研究成果

(1) ナノバクテリアの培養特性の解析と最適培地の設定

ナノバクテリアは 10% FBS (Fetal bovine serum) を含む RPMI 1640 培地において緩やかに増殖し、継代培養が可能であった。図 1 に申請者が分離培養したナノバクテリアの電子顕微鏡写真を示す。

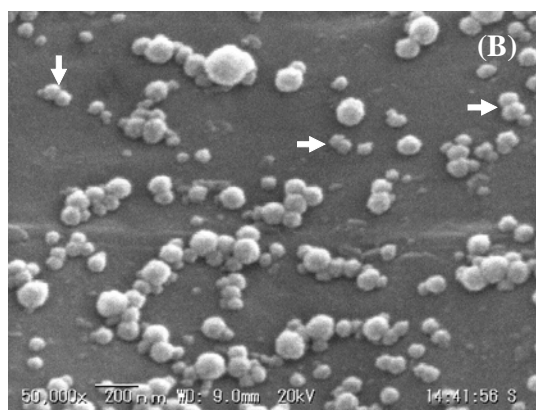
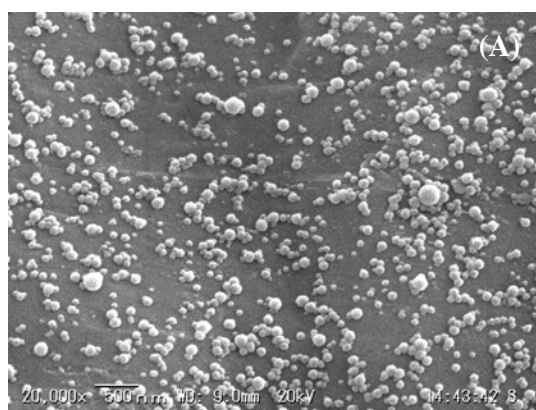


図 1. ナノバクテリアの SEM 写真

ナノバクテリアは直径数百 nm の球桿菌状

の粒子であり、その表層はハイドロキシアパタイト(Hydroxyapatite)を主成分としていることが明らかとなった。

次に、培地成分と血清成分に注目し、ナノバクテリアを効率的に増殖させるための培地組成の検討を行った。15種類の動物細胞用培地、昆虫細胞用培地、微生物用培地および植物細胞用培地を用いてナノバクテリアの培養を試みた結果、昆虫細胞用のSchneider's培地でナノバクテリアの増殖が最も促進された。また、哺乳類、鳥類、魚類を含む10種類の血清を用いてナノバクテリアの培養を行った結果、ヒト血清を使用した場合、ナノバクテリアの増殖が最も促進された。さらに、ナノバクテリアの表層がハイドロキシアパタイトを主成分としているという点に注目し、ハイドロキシアパタイトの合成成分の不足がナノバクテリアの増殖の律速因子となっているのではないかと考え、常温常圧でのハイドロキシアパタイト生産に用いられている擬体液(SBF)がナノバクテリアの増殖に与える影響を評価した。その結果、培地中にSBFを20%の濃度で加えた場合に最もナノバクテリアの増殖促進効果が認められた。

得られた知見を基に、ナノバクテリアの最適培地(Schneider's培地 + 10%ヒト血清 + 20%SBF)を設定し、ナノバクテリアの培養を行った結果、通常使用している[RPMI 1640培地 + 10%FBS]の約5倍の増殖量を示し、ナノバクテリアの効率的な培養が可能となった(図2)。

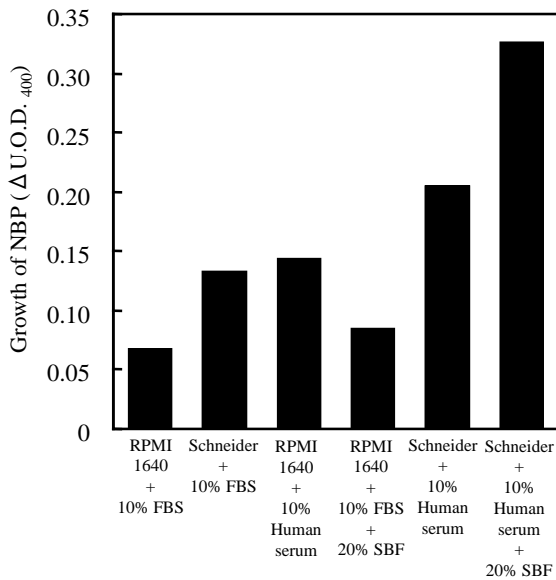


図2. 各種培地におけるナノバクテリアの増殖量の比較

(2) 模擬微小重力培養法を用いたナノバクテリアの効率的培養

[RPMI 1640 + 10% FBS]を用いてナノバ

クテリアを3日間、模擬微小重力培養した結果、静置培養と比較して約3倍の増殖量を示した。これは、静置培養を約20日間行った場合のO.D.₄₀₀値と同等であった。この結果より、ナノバクテリアを模擬微小重力培養することにより、効率的にナノバクテリアを得ることが可能になった。

次に、ナノバクテリアの最適培地を用いてナノバクテリアの微小重力培養を行った結果、ナノバクテリアは通常の培養の約15倍の増殖量を示した(図3)。

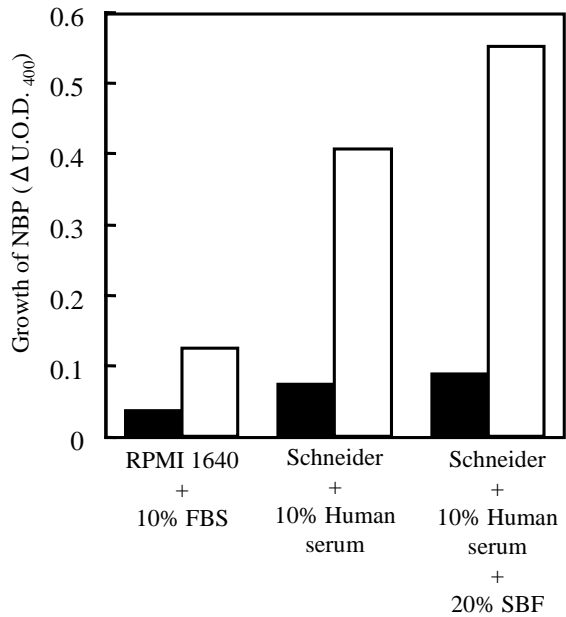


図3. 各種培地を用いた通常重力培養(Black bar)と模擬微小重力培養(White bar)におけるナノバクテリアの増殖量の比較

種々の培養条件で得られたナノバクテリアを回収し、接種濃度を合わせ、条件を統一して再培養した場合、ナノバクテリアの増殖量に有意差は見られなかった。この結果より、種々の条件で培養したナノバクテリアの培養特性は類似していることが示唆された。

さらに、模擬微小重力培養の過程で培地を交換することにより、ナノバクテリアの高密度培養を試みた結果、[Schneider's培地 + 10%ヒト血清 + 20%SBF]を使用した培養12日目の増殖量が、通常使用している[RPMI 1640培地 + 10%FBS]で静置培養を行った場合と比較して、約40倍の値を示した。また、微小重力培養に使用しているベッセルを50ml容にすることで、一度に回収できるナノバクテリアの量を増大させることができた。

なお、本研究で開発した効率的培養法は、ナノバクテリアの迅速検出法としても活用可能であった。また、ナノバクテリアの簡便な長期間保存法も確立することができた(保

存の妥当性はナノバクテリアの再培養により評価した)。

(3) ナノバクテリアと NBC (ナノバクテリア様結晶) との諸特性の比較

近年、MartelとYoung³⁾により、ナノバクテリアはタンパク質と無機物の相互作用により生成した結晶(NBC)であるという報告がなされ、現在、ナノバクテリアは生物ではなく結晶であるという説(結晶説)が有力視されている。そこで、MartelとYoungの方法³⁾に従い、NBCの作製を行い、ナノバクテリアと諸特性の比較を行った。作成したNBCは、ナノバクテリアと同様にリンとカルシウムを多く含む、直径数百nmの微粒子であった。また、NBCを10% FBSを含むRPMI1640培地で培養したところO.D.₄₀₀の増加が認められた。しかしながら、NBCの倍加時間はナノバクテリアの倍加時間(約3日間)と大幅に異なった。また、継代培養を繰り返すとナノバクテリアは常にサイズが一定なのに対し、NBCではサイズの大幅な増加や微粒子表面に花弁状の形態が観察され、両者の性質の違いが示された。さらに、切片を作成し、TEMを用いて観察を行った結果、ナノバクテリアには内部に生物構造が見られたのに対し、NBCでは生物構造は認められなかった。

次に、培地成分がナノバクテリアとNBCに及ぼす影響を比較した。ナノバクテリアはSchneider's培地で培養を行った際に増殖が促進され、またサケ血清やヒト血清を添加することで増殖がさらに促進された。しかし、NBCは種々の培地や血清を用いても増加量の変化は認められなかった。また、SBFを培地に添加したところ両者ともに増殖(あるいは増加)が20%促進された。

模擬微小重力培養がナノバクテリアとNBCに及ぼす影響を比較した。ナノバクテリアでは通常の約5倍に増殖が促進されたのに対して、NBCでは増加が促進されなかった。また、ナノバクテリアとNBCの嫌気培養を行ったところ、ナノバクテリアは溶菌したのに対して、NBCでは溶解は認められなかった。

抗生物質や抗菌剤がナノバクテリアとNBCに及ぼす影響を比較した。種々の抗生物質や抗菌剤について検討を行った結果、etidronic acidを添加することで、両者の増殖(あるいは増加)を長期的に抑制できることが示された。しかしながら、ナノバクテリアとNBCのMIC値は大きく異なった。

以上の結果、ナノバクテリアとNBCは形態や含有成分、SBFに対する応答性など一部の性質は共通していたが、培地成分や培養法に対する増殖(あるいは増加)量には違いが見られた。この結果より、ナノバクテリアとNBCの異なる特性を有することが示され、MartelとYoungの結晶説³⁾ではナノバクテリア

を十分に説明できないことが示唆された。

上述で得られた両者の特性の違いを活用することにより、ナノバクテリアとNBCが混合した状態で、個々の濃度を推算する方法を開発した。

申請者は、国内外のナノバクテリア研究で用いられている試料には、ナノバクテリアとNBCが混在したものがあるのではないかと考え、ナノバクテリアとNBCの混合培養を検討した。その結果、混合培養条件下では、ナノバクテリアの増殖が抑えられ、NBCが優先化して増加することが明らかとなった(このことがナノバクテリアの生物説と無生物説を混沌とさせてきた要因の一つであると考えられた)。

本研究で得られた種々の知見は、今後、ナノバクテリアの研究の推進に大きく貢献する事が期待できる。

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1件)

① H. Aoyagi and A. Kuroda: Effects of low-shear modeled microgravity on a microbial community filtered through a 0.2- μ m filter and its potential application in screening for novel microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有、DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.02.021, (2012).

[学会発表](計3件)

① H. Aoyagi and A. Kuroda: Effects of microgravity on microbial community and its application in screening for novel microorganisms. 2nd World Congress on Biotechnology (招待講演), 平成23年11月29日, Philadelphia, USA

② 青柳秀紀ら、ヒト由来急性骨髄性白血病細胞系から分離したナノバクテリア様微粒子の特性(第6報)、第63回日本生物工学会大会、平成23年9月26日、東京、東京農工大学

③ 青柳秀紀ら、ヒト由来急性骨髄性白血病細胞系から分離したナノバクテリア様微粒子の特性(第5報)、第62回日本生物工学会大会、平成22年10月29日、宮崎 シーガイア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青柳 秀紀 (AOYAGI HIDEKI)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号: 00251025