

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310066

研究課題名(和文) 微生物・植物細胞に発現する環境ナノリスクの評価

研究課題名(英文) Evaluation of the environmental nanorisk toward microbe and plant

研究代表者

野村 俊之(Nomura, Toshiyuki)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00285305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、人為的に創製されたナノ粒子が微生物や植物に及ぼす環境毒性影響について検討を行った。微生物では、静電引力により負帯電の微生物表面が正帯電のPSLナノ粒子で被覆され、死滅することが分かった。一方、生理食塩水中では、堅牢な細胞壁を持つ酵母がナノ粒子を取り込んで生存していることが分かった。植物では、ナノ粒子とナノ粒子から溶出した金属イオンが、レタスの根、ユリの花粉管、タバコカルスの成長を阻害することが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this research, the ecotoxicity of the engineered nanoparticles toward microbe and plant was evaluated. In the case of microbe, it was found that the surface of the negatively charged microbe was entirely covered with the positively charged PSL nanoparticles owing to the electrostatic interaction, leading to the cell death. Interestingly, the PSL nanoparticles were taken inside the living yeast equipped with the rigid cell wall in the physiological saline. In the case of plant, the growth of lettuce root, lily pollen tube, and tobacco callus was inhibited by the nanoparticles and their dissolved metal ions.

研究分野：微粒子工学

キーワード：ナノリスク 微生物細胞 植物細胞

1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子が応用された日用品が市販されているなかで、環境中へのナノ粒子の拡散は既に進行してことが懸念されていた。しかし、食物連鎖の底辺を支える微生物、植物を用いた直接・間接的な環境ナノリスクに関する知見は絶対的に不足しているのが現状であった。そこで、環境中に放出されている人為的に創製されたナノ粒子を対象とし、“コロイド科学”の視点からナノ粒子の細胞への付着・取り込み現象を理解し、“生理学”の視点から生産者(植物)・分解者(微生物)に与えるナノ粒子の毒性を明らかにすることで、消費者(動物)を含めた食物連鎖全域に波及させてリスク評価できるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、微生物と植物を対象として、ナノ粒子のキャラクタリゼーション、生育環境などの毒性発現条件を明らかにすると共に、その評価方法について検討した。また、各種顕微鏡を駆使してナノ粒子の挙動を直接捉えるとともに、ナノ粒子と細胞の表面性状を実測し、コロイド科学的観点から細胞表面への付着・取り込み現象を理論的に解析することで、環境中におけるナノ粒子の動的挙動を理解し、ナノ粒子が上位の生物界に影響を及ぼす可能性について検討することで、ナノ粒子の環境毒性評価法を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 微生物に対するナノリスク

菌体懸濁液0.5 mLとナノ粒子懸濁液0.5 mLを1.5 mL容マイクロチューブに添加し、室温で1時間攪拌後の菌体生存率をコロニーカウント法により評価した。分散液は、滅菌処理したNaCl水溶液もしくはスクロース溶液を用いた。ナノ粒子は、公称径100 nmで表面官能基の異なる蛍光ポリスチレンラテックス(PSL)ナノ粒子を用いた。また、原核生物のモデル細胞として、グラム陰性菌の大腸菌 *Escherichia coli*、グラム陽性菌の *Lactococcus lactis*、真核生物のモデル細胞として酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、糸状菌 *Aspergillus oryzae*、*Aspergillus nidulans* などを用いた。

さらに、複合微生物菌叢を対象としたナノ粒子の毒性評価実験では、消化発酵汚泥を土壌微生物生態系のモデルとし、ZnO ナノ粒子を投与して、嫌気条件下で培養を行い、発酵産物を定量した。

ナノ粒子暴露後の菌体は、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)と分子間力プローブ顕微鏡(AFM)により観察した。CLSМ観察では、菌体の生死状態を判別するため、細胞膜透過のDAPIにより全菌体を、細胞膜非透過性のヨウ化プロピジウム(PI)により死菌体を蛍光染色した。

(2) 植物に対するナノリスク

植物に対するナノ粒子の暴露実験には、3種類の溶液を用いた。1つ目は、ナノ粒子を任意の濃度となるように純水と混合して、超音波で15分間分散処理し、ナノ粒子分散液とした。2つ目は、ナノ粒子分散液から遠心する過によりナノ粒子を取り除いた溶液を調製した。3つ目は、ナノ粒子を除去した溶液の亜鉛イオン濃度を測定し、同濃度となるように塩化亜鉛を用いて調製した塩化亜鉛水溶液を準備した。これら3種類の溶液を、タマネギやレタスの水耕栽培液、タバコカルスやユリの花粉管の所定培地に混合し、ナノ粒子の暴露実験を行った。

4. 研究成果

(1) 微生物に対するナノリスク

菌体懸濁液にPSLナノ粒子(終濃度40 mg/L)を暴露した時の代表的な菌体生存率を図1に示す。表面が負に帯電したn-Amineを暴露した場合、大腸菌、酵母共にほとんど毒性を発現しなかった。これは、他の表面修飾を施した負帯電のPSLナノ粒子でも同じ傾向であった。一方、正帯電のp-Amineを暴露した場合、大腸菌ではイオン強度によらず顕著な毒性を発現した。しかし、酵母に対しては、暴露環境がNaCl濃度5 mMでは高い毒性を発現したのに対して、154 mMではほとんど毒性は見られなかった。なお、ナノ粒子を暴露しなかった時のコロニー数は、NaCl濃度によらずほぼ一定で、浸透圧の影響は見られなかった。以上のように、同じアミノ基修飾PSLナノ粒子でも帯電性の違いにより菌体に対する毒性発現が異なることが分かった。なお、アミノ基修飾PSLナノ粒子の表面電位の正負が異なるのは、導入されたアミノ基の量が異なるためである。また、原核生物の大腸菌と真核生物の酵母とでは、同じナノ粒子でもその生体影響は異なることが明らかとなった。

図1で顕著な毒性を発現したp-Amineを暴露した時のCLSМ像を図2に示す。図1において菌体が死滅した暴露条件では、ナノ粒子(緑色)がリング状に局在していることから、ナノ粒子が菌体表面に付着していることが分かった。また、細胞の生死を染め分け

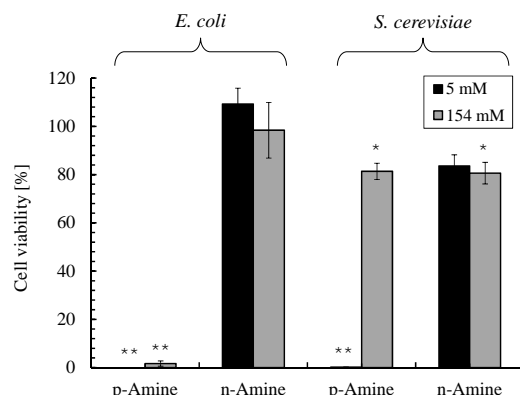


図1 PSLナノ粒子を暴露後の菌体生存率

たところ、ナノ粒子で被覆された菌体はすべて赤色に蛍光しており、死滅していることが分かった。これより、ナノ粒子が静電引力により細胞表面に付着すると、細胞膜が損傷して、細胞死が誘発されることが分かった。一方、酵母に NaCl 水溶液 154 mM 中で p-Amine を暴露した場合、ナノ粒子は酵母細胞の内部に取り込まれており、大腸菌と酵母では、ナノ粒子の挙動が異なることが分かった。タイムラプス観察を行ったところ、ナノ粒子の取込時間は3分以内であった。これは、真核生物の酵母は原核生物とは異なり、エンドサイトーシスによって異物を細胞内に取り込むことができるためと推察される。しかし、酵母の細胞壁を酵素により溶解したスフェロプラストでは、銀ナノ粒子の取込が報告されているが、酵母は堅牢な細胞壁構造を持つため、ナノ粒子の取込は困難と考えられており、本結果はナノ粒子の取込を CLSM で直接捉えた興味深い成果である。

CLSM は、ナノ粒子が細胞表面に局在していることは観察できるが、どのように付着しているかを判別することは困難である。そこで、ナノ粒子の付着状態について AFM を用いてナノレベルで直接観察を行った。ナノ粒子暴露後の酵母細胞の AFM 像を図3に示す。NaCl 水溶液 5 mM 中では、ナノ粒子が酵母の細胞表面を緻密に被覆していることが分かった。一方、NaCl 水溶液 154 mM 中で p-Amine を取り込み、毒性を回避した酵母細胞の表面は、ナノ粒子に密に被覆されておらず、ナノ粒子がまばらに付着していることが

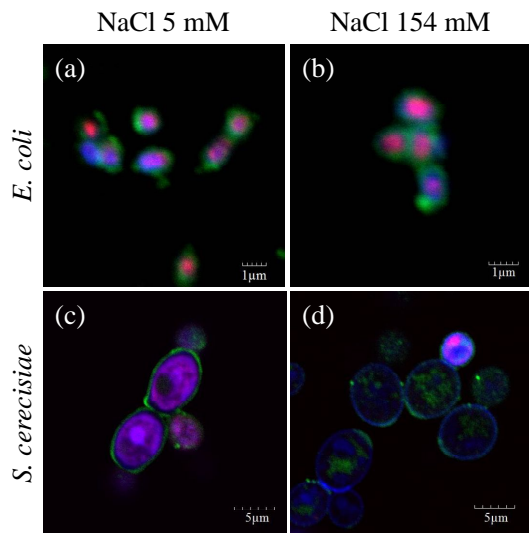


図2 p-Amine暴露後の菌体のCLSM像

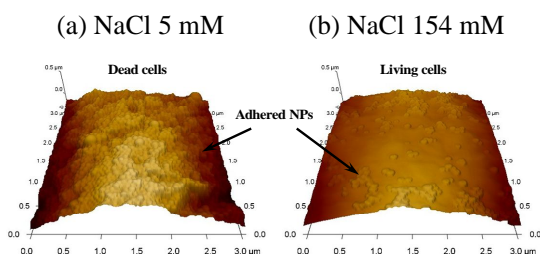


図3 p-Amine暴露後の菌体のAFM像

明らかとなった。なお、ナノ粒子を暴露していない酵母表面は非常になめらかであった。

次に、浸透圧が菌体生存率に及ぼす影響について検討するために、分散媒を NaCl とグルコースの混合溶液として同様の実験を行った。その結果を図4に示す。ナノ粒子暴露後の酵母細胞の生存率は、分散媒に含まれるグルコース濃度には関係なく、NaCl 濃度に依存した1本の相関線となることが分かった。これより、ナノ粒子暴露後の菌体生存率は、ナノ粒子と細胞間に働く相互作用に強く依存していることが分かった。一方、浸透圧が等張よりも高くなると、細胞内へのナノ粒子の取込は抑制された。これは、高張液中では、細胞の内圧が高くなるため、ナノ粒子が取り込まれにくくなったものと推察される。図4には、50 nm の PSL ナノ粒子の結果も併せて示したが、100 nm の結果と同様であった。しかし、500 nm のナノ粒子は細胞内に取り込まれなかった。

また、ナノ粒子の濃度を変えて、毒性実験を行った結果を図5に示す。ナノ粒子を微生物細胞に暴露したときの生存率は、ナノ粒子が菌体表面を単層で被覆すると仮定したときの表面被覆率と相関があることも分かった。また、グラム陰性菌の大腸菌とグラム陽性菌の乳酸菌の結果は類似しており、細菌の細胞表面層の構造によるナノ粒子の毒性影響には違いは認められなかった。

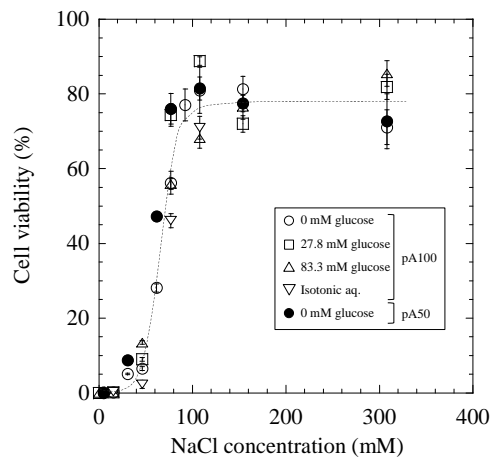


図4 浸透圧が菌体生存率に及ぼす影響

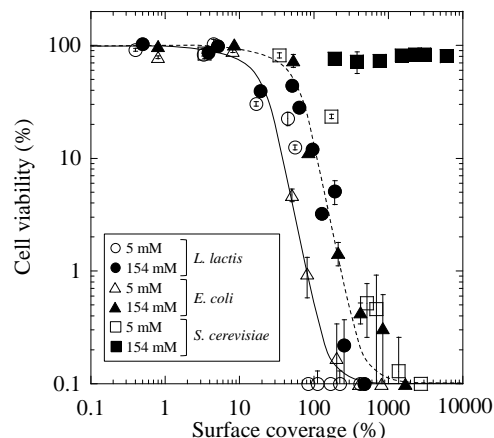


図5 ナノ粒子濃度が菌体生存率に及ぼす影響

細胞壁を有した酵母と同じ真菌類に属する糸状菌 *A. oryzae* と *A. nidulans* をモデル細胞として、等張液中において PSL ナノ粒子の毒性実験を行った。その結果、イオン強度の低いスクロース溶液中では、静電相互作用により細胞表面がナノ粒子により被覆して細胞は死滅することが分かった。一方、イオン強度の高い生理食塩水中では、ナノ粒子は *A. oryzae* 細胞に取り込まれたが、*A. nidulans* 細胞にはほとんど取り込まれず、細胞壁で捕捉されることが分かった。これは細胞の young 率の違いに起因していることを AFM により示した。また、寒天培地で培養した糸状菌を用いてナノ粒子の暴露実験を行うと、両親媒性タンパク質 Hydrophobin が生成されて細胞表面を保護するため、ナノ粒子が付着しないことが分かった。以上より、ナノ粒子の毒性発現と局在は、酵母の場合と類似していたが、細胞壁の堅さの違いにより、ナノ粒子を取り込むことができない場合があることも分かった。

消化発酵汚泥に ZnO ナノ粒子 (50 mg/L) を投与して培養したときの発酵産物量の経時変化を図 6 に示す。培養 7 日後において、ナノ粒子を投与していない対照では、酢酸濃度は 15.7 mM、メタン生成量は 4.76 mL であったが、ZnO ナノ粒子を投与すると、酢酸濃度が 22.5 mM に上昇した。さらに、本来は発酵産物ではない中間体の水素が検出され、その生成量は培養時間に伴って減少傾向を示すものの、メタン生成量は 0.4 mL に抑制されることが分かった。以上より、ZnO ナノ粒子は、水素生産力の高い水素生成菌を優勢化させた可能性が示唆される。また、水素や酢酸からメタンを生成するメタン生成細菌の代謝活性を阻害した可能性も高く、メタンに変換できない水素や酢酸が蓄積したのではないかと考えられる。

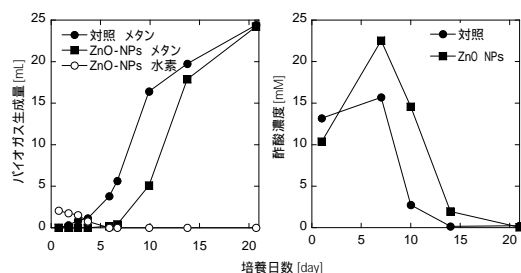


図6 消化発酵汚泥にZnOナノ粒子を投与した時の発酵産物量

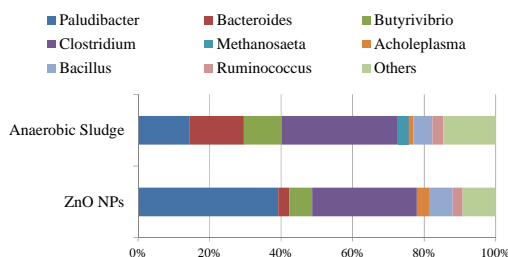


図7 次世代シーケンサーによる消化発酵汚泥中の微生物種の解析

そこで、PCR-DGGE 法により、消化発酵汚泥中の菌叢解析を行った。その結果、菌叢構造を大きく変化させないが、対照に存在する水素生成菌の一部を欠損させた可能性が示唆された。さらに、次世代シーケンサーを用いて菌叢解析を行った結果を図 7 に示す。ZnO ナノ粒子の投与により、OTU の減少即ち、菌叢を構成する微生物種の減少と、一部のメタン生成菌の欠損が見られた。以上より、ZnO ナノ粒子が、消化発酵汚泥内の生態系を変化させていることが分かった。これより、ナノ粒子が菌叢制御に利用することも期待できる。

(2) 植物に対するナノリスク

植物を対象としたナノ粒子の毒性評価では、まず、細胞表面へのナノ粒子の付着現象を観察し、続いて、分裂細胞及び伸長細胞に及ぼす影響をナノ粒子の溶解性、凝集性の観点を踏まえて検討を加えた。

タマネギ根にアミノ基修飾した負帯電 n-Amine と正帯電 p-Amine の PSL ナノ粒子 (0.4 mg/L) を暴露したときの CLSM 像を図 8 に示す。p-Amine の付着は分裂成長の盛んな根の先端部で顕著に見られたが、n-Amine の付着は見られなかった。一般的に、根の表面にはペクチン性多糖類から成る分泌物で覆われているとされる。そこで図 9 に示すように、ペクチン性多糖類をキレート剤の EDTA で除去したところ、PSL ナノ粒子が付着しないことを見出した。また、Ca²⁺の添加により、この EDTA のペクチン性多糖類の除去効果を打ち消すと、p-Amine の付着が見られるようになったことから、この PSL ナノ粒子の付着はペクチン性多糖類を介した付着現象であることが明らかとなった。

成長の盛んな根の先端にナノ粒子が付着する可能性が高いことから、次はレタスの水耕栽培液に金属酸化塩ナノ粒子 (ZnO ナノ粒子) を投与し、レタスの成長量を測定する実験を行った。図 10 は水耕栽培したレタスの

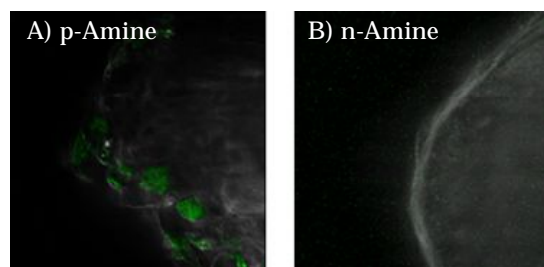


図8 ナノ粒子暴露後のレタス根のCLSM像

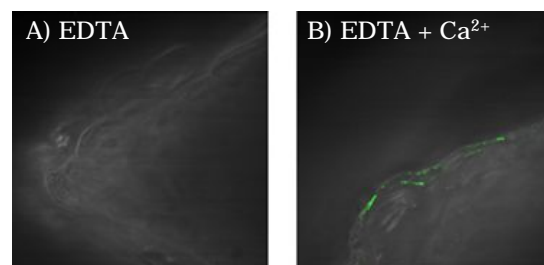


図9 EDTA処理後のレタス根のCLSM像

根の長さを測定したものである。対照は水のみで生育させた。試料は3種類で、ZnO ナノ粒子分散液(2, 10, 20mg/L) 各 ZnO ナノ粒子分散液から ZnO ナノ粒子を除去した分散液、同濃度の Zn²⁺濃度の ZnCl₂ 水溶液を用意した。グラフ横軸の数値はそれぞれの栽培液中に含まれる Zn²⁺濃度で表記している。生育実験の結果、対照では、根の長さが 2.78 cm であったのに対して、ZnO ナノ粒子分散液で生育させた根は、液中の Zn²⁺が 0.74 mg/L 以上となると約 1 cm の長さとなった。一方、同濃度の Zn²⁺を含む ZnO ナノ粒子を除去した分散液で生育させた場合は、いずれにおいても、対照とほぼ同程度の約 2-2.5 cm となった。また、同じ Zn²⁺濃度の ZnCl₂ 水溶液を用いて生育させた場合は、いずれの Zn²⁺濃度においても、ZnO ナノ粒子を除去した分散液で生育させたものより根が長くなった。以上より、ZnO ナノ粒子が根の伸長を阻害する可能性が示唆された。さらに、レタスの根の細胞壁量を分析したところ、ZnO ナノ粒子により短くなった根は 1 cm 当たりの細胞壁量は増加傾向を示すことから、ZnO ナノ粒子が根に付着することで細胞壁を損傷し、そのストレスにより細胞壁が肥厚化したのではないかと考えられる。

タバコカルスの培養細胞に同様の暴露実験を行った結果を図 11 に示す。培養 1 週間後の対照の生重量に対し、ZnO ナノ粒子分散液、ZnO ナノ粒子を除去した分散液、ZnCl₂ 水溶液、で生育させたカルスは、いずれも生重量が減少することが分かった。しかし、ZnO ナノ粒子による特異的な生重量の減

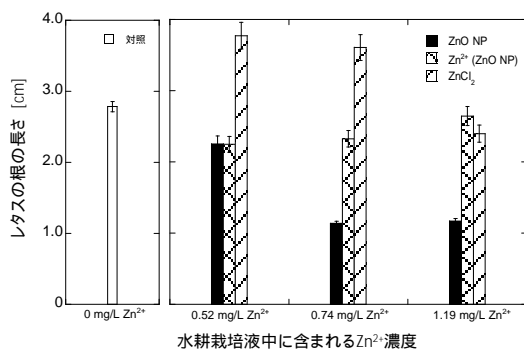


図10 ナノ粒子存在下で水耕栽培したレタス根の長さ

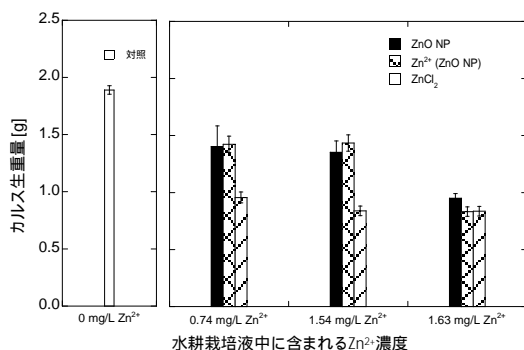


図11 ナノ粒子存在下で培養したタバコカルスの生重量

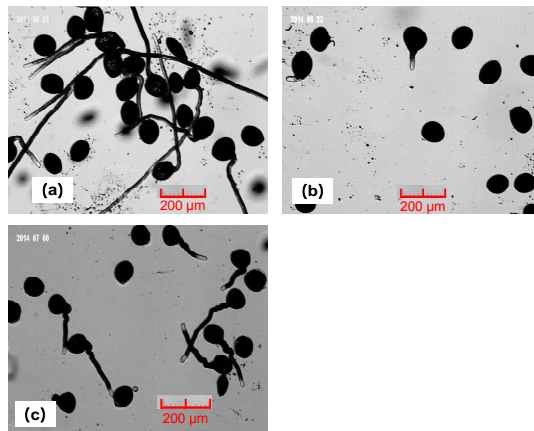


図12 ナノ粒子暴露後のユリ花粉管の顕微鏡像:(a)対照、(b)ZnO ナノ粒子分散液、(c)ZnO ナノ粒子を除去した分散液

少は見られず、生重量の変化は Zn²⁺によって起こることが明らかとなった。以上より、カルスはレタス根や花粉と異なり、ZnO ナノ粒子から溶出する Zn²⁺がその細胞増殖を阻害していることが分かった。

単一の生殖細胞であるユリ花粉を用いて同様の暴露実験を行ったときの顕微鏡写真を図 12 に示す。対照の花粉管の発芽率が 40%であるにもかかわらず、ZnO ナノ粒子分散液 (50 mg/L) を投与した場合は発芽率がほぼ 0%となり、時間が経過しても回復は見られなかった。一方、ZnO ナノ粒子を除去した分散液を花粉に投与すると、発芽率は 20%程度であった。しかし、この場合、3 時間程度の短時間で、対照の 9 割程度までその発芽率が回復した。以上より、固体の ZnO ナノ粒子は花粉に対しても、その花粉管発芽を特異的に阻害する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

J. Miyazaki, Y. Kuriyama, H. Tokumoto, Y. Konishi, T. Nomura, Cytotoxicity and behavior of polystyrene latex nanoparticles to budding yeast, Colloids and Surfaces A, 469, 287-293, 2015, 査読有

DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.01.046

T. Nomura, Y. Kuriyama, H. Tokumoto, Y. Konishi, Cytotoxicity of Functionalized Polystyrene Latex Nanoparticles Toward Lactic Acid Bacteria, and Comparison with Model Microbes, Journal of Nanoparticle Research, 17:105, 2015, 査読有

DOI: 10.1007/s11051-015-2922-8

T. Nomura, J. Miyazaki, A. Miyamoto, Y. Kuriyama, H. Tokumoto, Y. Konishi, Exposure of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to functionalized polystyrene latex nanoparticles: influence of surface charge on toxicity, Environmental Science &

Technology, 47, 3417-3423, 2013, 査読有

DOI: 10.1021/es400053x

宮崎準平, 栗山雄太, 宮本顕久, 徳本勇人, 小西康裕, 野村俊之, ポリスチレンラテックスナノ粒子の酵母細胞への付着・取込現象の評価, 粉体工学会誌, 50, 472-477, 2013, 査読有

DOI: <http://doi.org/10.4164/sptj.50.472>

J. Miyazaki, Y. Kuriyama, A. Miyamoto, H. Tokumoto, Y. Konishi, T. Nomura, Bacterial Toxicity of Functionalized Polystyrene Latex Nanoparticles toward *Escherichia coli*, Advanced Materials Research, 699, 672-677, 2013, 査読有

DOI: [10.4028/www.scientific.net/AMR.699.672](http://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.699.672)

宮本顕久, 徳本勇人, 小西康裕, 野村俊之, PSL ナノ粒子が大腸菌に及ぼす環境毒性評価, 粉体工学会誌, 49, 362-366, 2012, 査読有

DOI: <http://doi.org/10.4164/sptj.49.362>

〔学会発表〕(計 35 件)

宮崎準平, 栗山雄太, 宮本顕久, 徳本勇人, 小西康裕, 野村俊之(受賞講演), ポリスチレンラテックスナノ粒子の酵母細胞への付着・取込現象の評価, 2014年度粉体工学会秋期研究発表会, 2014/11/25, 東京ビックサイト(東京都江東区)

野村俊之(依頼講演), ナノ粒子の微生物細胞への付着・取込現象の解明とその利用技術の開発, 粉体工学会『ナノ粒子と細胞の相互作用に関するワークショップ』, 2014/9/16, 福岡大学(福岡市)
野村俊之(特別講演), ナノ粒子の微生物細胞への付着・取込現象の解明, 2013年度 LSC 研究成果発表会, 2014/3/14, 神戸学院大学(神戸市)

Y. Kuriyama, J. Miyazaki, H. Tokumoto, Y. Konishi, T. Nomura, Toxicity of Functionalized Polystyrene Latex Nanoparticles toward Microorganisms, The First OPU-TKU International Symposium on Frontier Chemistry and Materials for the 21st Century, 2013/11/18, 大阪府立大学(堺市)

K. Watanabe, N. Sato, Y. Kuriyama, T. Nomura, H. Tokumoto, ZnO nanoparticles change the ecosystem of anaerobic digestion, The First OPU-TKU International Symposium on Frontier Chemistry and Materials for the 21st Century, 2013/11/18, 大阪府立大学(堺市)

Y. Kuriyama, J. Miyazaki, H. Tokumoto, Y. Konishi, T. Nomura, Influence of

Polystyrene Latex Nanoparticles on Growth of Budding Yeast, The 5th Taiwan-Korea-Japan International Symposium on Microbial Ecology, 2013/11/1, Jhongli (Taiwan)

Y. Kuriyama, J. Miyazaki, H. Tokumoto, Y. Konishi, T. Nomura, Potential Impact of Functionalized Polystyrene Latex Nanoparticles toward *Saccharomyces cerevisiae*, 7th International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT2013), 2013/7/3, Singapore

Y. Kuriyama, J. Miyazaki, H. Tokumoto, Y. Konishi, T. Nomura, Ecotoxicity of Functionalized Polystyrene Latex Nanoparticles Comparison between Gram Positive and Negative Bacteria, 7th International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT2013), 2013/7/3, Singapore

野村俊之(招待講演), ナノ粒子の環境毒性評価, 粉体技術セミナー「ナノ粒子のリスクとその対策」, 2012/12/14, ホテルセントノーム京都(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 俊之 (NOMURA TOSHIYUKI)
大阪府立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 00285305

(2) 研究分担者

徳本 勇人 (TOKUMOTO HAYATO)
大阪府立大学・大学院工学研究科・講師
研究者番号: 70405348