

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420718

研究課題名(和文)希土類の生体への影響：希土類の新規機能(抗菌)材料化に向けた生物学的アプローチ

研究課題名(英文)Effects of rare earth ions on biological systems

研究代表者

若林 篤光(Wakabayashi, Tokumitsu)

岩手大学・理工学部・助教

研究者番号：30332498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はレア・アースの抗菌・抗カビ材料としての可能性を検討することを目的に行った。種々の微生物や線虫C.エレガンス、哺乳類の培養細胞などに対する全レア・アースイオンの毒性を系統的に評価したところ、すべてのレア・アースが、抗菌・抗カビ活性を有することが示された。この活性は細菌類に対しては、銀や銅に比べてやや弱いものであったが、菌類(カビ類)に対しては銀よりは弱いものの、銅と同程度であった。一方、レア・アースは哺乳類培養細胞に対しては遺伝毒性、細胞毒性ともに全く示さず、銅に比べて高い安全性を持つことが示された。以上の結果は、レア・アースの抗菌金属、抗カビ金属としての可能性を示すものであった。

研究成果の概要(英文)：Despite the name, rare earth elements are relatively abundant in soil. Therefore, these elements might interact with biosphere during the history of life. In this study, we have examined the effect of rare earth ions on the growth of bacteria, fungi, and soil nematode. All rare earth ions, except radioactive promethium that we have not tested, showed antibacterial and antifungal activities comparable to that of copper ions, which is widely used as antibacterial metals in our daily life. Since the rare earth ions did not show high toxicity to the human lymphoblastoid cell line or even stimulated the growth of the cultured cells at 1 mM, raising the possibility that we can substitute rare earth elements for the antibacterial metals usually used because of their safety.

研究分野：分子遺伝学 分子生物学

キーワード：希土類金属 抗菌活性 抗カビ活性 抗線虫活性 金属ストレス ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

抗菌材料としての金属は、i) 人体にとって安全で、ii) 種々の微生物に対して抗菌(静菌)活性を示し、かつ iii) 低コストであることが求められる。現在このような目的には銀が用いられることが多いが、銀にはコストの問題、そしてカビなどの真核微生物(真菌類)に対して比較的效果が低いなどの問題があった。

レア・アース(希土類)は、特殊な原子構造に由来する特異な化学的性質のため、コンピューターの磁気記憶層、携帯電話、薄型テレビや自動車など、現代文明の主役ともいえる様々なデバイスに必ずといっていいほど使用されている。これらの元素はレアの名前とは裏腹に、地殻中には比較的豊富に存在し、このため地球の歴史において生物が何らかの形でレア・アースと関わってきた可能性は十分に高いと考えられた。しかしながら、レア・アースと生物とのかわりについての研究は多くの場合、セリウム、ランタンなどの特定の元素を対象としており、すべてのレア・アースに対して、同じ実験系で効果を系統的に比較した例は少なかった。

研究開始までに我々は、土壌自活性線虫の1種であり、近年の分子生物学的研究にもよく用いられている *C. エレガンス* (*Caenorhabditis elegans*) をモデル生物とする実験系を用いて、全種類のレア・アースの線虫の胚発生に与える影響を系統的に検討し、すべてのレア・アースイオンが *C. エレガンス* の胚発生に対して毒性を有すること、ランタノイド系列のイオンでは、原子番号の大きいものほど高い毒性を示すことを見出していた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、種々の微生物や線虫 *C. エレガンス*、哺乳類の培養細胞などに対する全レア・アースイオンの毒性をすべて同じ実験系で系統的に評価し、新たな機能性金属材料(抗菌剤・抗カビ剤)としてのレア・アースの可能性について検討することを第一の目的とした。

(2) また、当初計画では、レア・アースを含む合金の製造過程で生じる廃材(鉄鋼スラグ)に含まれるレア・アースの含量を測定し、充分な量の回収が見込まれる場合には廃材からの抗菌材料の回収による、抗菌材料の低コスト化の可能性について検討することを目的とした。

ただし、後述するように鉄鋼スラグ中のレア・アース含量は決して多いとは言えないものであったため、本研究では計画を一部変更し、

(3) *C. エレガンス* 変異体を用いた解析によって、多細胞生物がどのようにしてレア・アース毒性に対応しているかについての生物学的メカニズムの解明を目的に遺伝学的な解析を実施した。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌に対するレア・アース毒性の寒天平板法による評価

標準的な大腸菌株である K-12 株を、0.1~100mM のレア・アースイオン(塩化物塩、酢酸塩、硝酸塩のいずれかの無機塩の水溶液として使用)、銅あるいは銀イオンの存在下で 24 時間培養した後に通常の大腸菌生育用寒天培地に塗布した。一晩の培養後に、現れた大腸菌コロニーの数を金属イオンの非存在下で同様の処理を施した大腸菌と比較することで毒性の評価を行った。

(2) 大腸菌、黄色ブドウ球菌、アオカビ、クロコウジカビに対するレア・アース毒性のペーパーディスク拡散法による評価

上記の菌類、細菌類の寒天懸濁液をプラスチックシャーレ内の通常の寒天培地上に重層した。寒天が固化した後に培地中央に 100 mM の無機のレア・アース塩水溶液に浸漬した濾紙をのせ、数日間培養し、発育阻止円の大きさを測定することで毒性の評価を行った。

(3) ヒトリンパ芽球細胞、TK6 株に対するレア・アースの細胞毒性と遺伝毒性の評価

細胞毒性は、通常の培養液に対して 10~1000 μ M のレア・アース塩を添加した培養液中での細胞の生存率の計測によって評価した。遺伝毒性は、同濃度のレア・アースの存在下で培養した TK6 細胞に対し、遺伝毒性評価によく用いられているコメットアッセイ(DNA の切断の有無を評価する)、および小核試験(その他の変異原性を評価する)の2種類の検査を行うことで評価した。

(4) 鉄鋼スラグ中のレア・アース含量の測定

含レア・アース合金の製造過程で生じた鉄鋼スラグを磨砕した後に、塩酸を用いて溶解した。溶解液中の種々の金属の含量を ICP 発光分光法によって測定した。

(5) *C. エレガンス* 変異体を用いたレア・アース耐性経路の解析

銅やカドミウムに対する耐性経路に必要であることが知られている種々の遺伝子の変異体の受精卵をレア・アース水溶液中で 24 時間飼育した後に、孵化しなかった卵の割合、孵化後に死んだ個体の割合、生存個体の割合をそれぞれ計測することで、レア・アースに対する感受性の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 大腸菌に対するレア・アースイオンの抗菌活性

放射性の人工元素であるプロメシウムを除くすべてのレア・アースの無機塩溶液を用いて大腸菌 K-12 株に対する毒性の評価を寒天平板法によって行ったところ、試したすべてのレア・アースは大腸菌の生育に対して毒性を持つことが示された。毒性は 0.1mM でも観察され、濃度依存的に毒性は大きくなった。レア・アースの毒性は同じ濃度の銀イオ

ンや銅イオンと比較するとやや低かったが、100mMのレア・アースの存在下では大腸菌は死滅した(図1)。

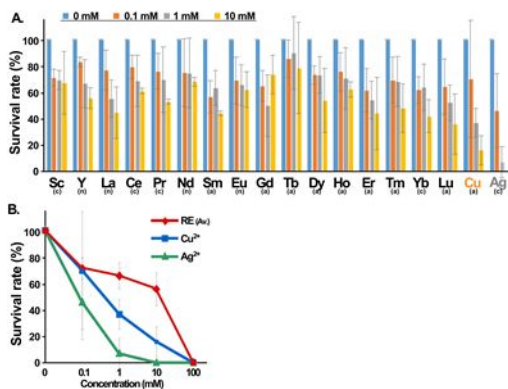


図1. レア・アースの抗菌活性

(2) 大腸菌、黄色ブドウ球菌、アオカビ、クロコウジカビに対するレア・アースイオンの抗菌・抗カビ活性

グラム陰性細菌である大腸菌に対する抗菌効果が確認されたので、次にグラム陽性菌の1種である黄色ブドウ球菌、および我々の生活圏に広く存在する真菌類から2種のカビ、アオカビ、クロコウジカビの生育に対する毒性をペーパーディスク拡散法によって検討した。(1)の結果と同様、試したすべてのレア・アースは、上のすべての菌類、真菌類に対して抗菌・抗カビ効果を示した。レア・アースの抗菌効果は大腸菌、黄色ブドウ球菌では、銀や銅よりも弱かったが、抗カビ効果は、銀よりも弱いものの、銅と同程度であった(図2)。

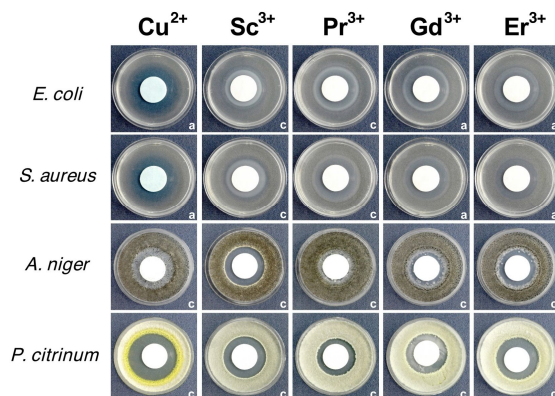


図2 レアアースの抗菌・抗カビ活性

(3) ヒトリンパ芽球細胞、TK6株に対するレア・アースの遺伝毒性と細胞毒性

これまでもいくつかのレア・アースに関して哺乳類の培養細胞を用いて細胞毒性を検討した先行研究はあるものの、同一の条件下ですべてのレア・アースを評価した例は少なかった。また、それらの先行研究の多くは血清を含まない条件で行われているため、実際の生体内でのレア・アースの影響が過少にあるいは過大に評価されている可能性が懸念された。そこで本研究では血清を含む、同じ

条件下ですべてのレア・アースの遺伝毒性、細胞毒性を評価した。比較対象として、抗菌抗カビ活性を持つと同時に毒性を有する重金属である銅、あるいは酸化ストレスを与える過酸化水素を培地に添加したものについて実験を行った。

銅や過酸化水素が強い毒性を示す1000μMでもレア・アースの遺伝毒性は全く観察されなかった(図3)。同様に細胞毒性についても銅が強い毒性を示す100μMでレア・アースは培養細胞の生存率に全く影響を与えなかった(図4)。それどころか1000μMのレア・アースの添加は、細胞の生存率を有意に高める傾向が観察された。同様の傾向は先行研究でも数例報告されており、我々の結果はその報告を再現するものだった。以上の結果は、レア・アースが銀や銅に比べてやや弱いながらも抗菌抗カビ活性を有していること、同時に哺乳類の培養細胞に対する毒性は、一般に抗菌金属として認識されている銅に比べて著しく低いことが明らかとなった。この安全性は抗菌金属としてのレア・アースの優位性を示唆するものである。

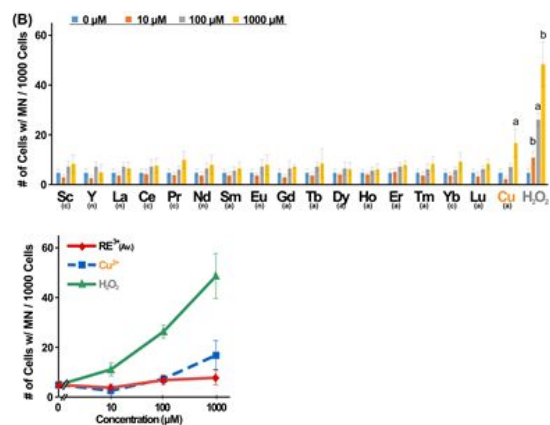


図3 レア・アースの遺伝毒性

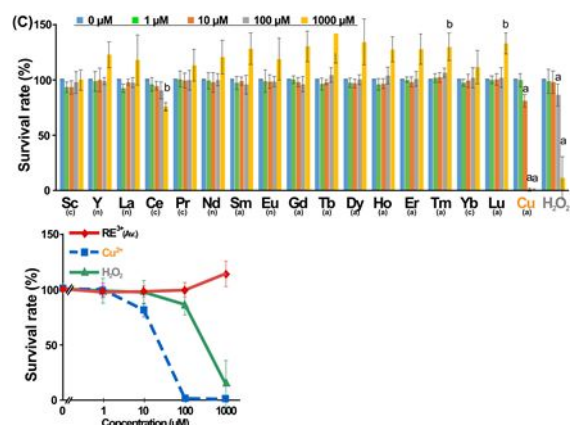


図4 レア・アースの細胞毒性

(4) 鉄鋼スラグ中のレア・アース含量

産業廃棄物である鉄鋼スラグから抗菌材料としてのレア・アースを回収、調達することができれば、コストの面において、従来、抗菌金属としてよく用いられる銀に対しての優位性が得られると考え、次に我々はレ

ア・アースを含む合金の製造過程で排出される鉄鋼スラグ中のレア・アースの含量の測定を行った。金属酸化物の混合物である鉄鋼スラグを塩酸を用いて溶解し、溶液中のランタン、およびセリウムの含量を定量したところ、5gのスラグの溶解物からは約10mgのレア・アースが検出された。これは決して多いとは言えない。かつて供給が不安定であったレア・アースは、代替材料の研究が進んだこともあり、近年では軽希土類に関しては、供給過剰が問題となっていることから、スラグからの回収は必ずしも優位性を持たないことがわかった。

そこで本研究では当初計画を変更し、生物がレア・アースの毒性に対しどのようなメカニズムで耐性を獲得するのかを明らかにするために、レア・アース感受性の多細胞生物である、線虫をモデル生物として以下の解析を行った。

(5) C.エレガンスにおけるレア・アース耐性経路

線虫では、銅やカドミウムといった毒性を持つ重金属イオンストレス耐性を発揮するために、JNK(c-Jun N-terminal Kinase)型のMAPキナーゼによる細胞内シグナル伝達経路が主要な役割を果たすことが知られていた。そこで本研究では、レア・アースに対する細胞応答に、重金属イオン応答と同様のシグナル伝達経路が関与するかどうかを確かめるためにJNK経路とp38経路の2つのストレス応答MAPキナーゼ経路を構成する5種類の遺伝子の変異体を用いてレア・アースに対する感受性の変化を検討した。この結果、調べたすべての変異体は、野生型に比べて高い感受性(低い耐性)を示した(図5)。銅やカドミウムイオンに対してはJNK経路が主要な耐性経路で、p38経路の寄与は比較的小さいことが報告されていたが、レア・アースに対する耐性は重金属イオンと類似ではあるが全く同じではない耐性獲得機構が働くことが示唆された。

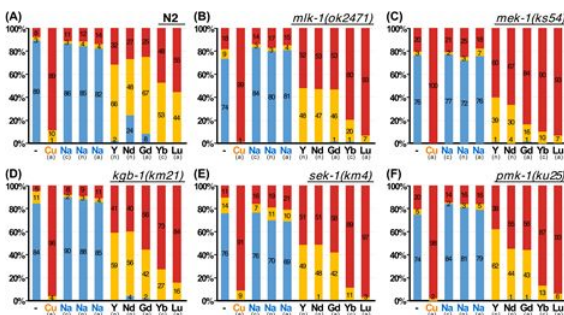


図5 線虫のレア・アース耐性機構

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)

Tokumitsu Wakabayashi, Ayumi Yamamoto, Akira Kazaana, Yuta Nakano, Yui Nojiri, Moeko Kashiwazaki
Antibacterial, antifungal, and nematocidal activities of rare earth ions. *Biological Trace Element Research* 174, 464-470 (2016)
DOI: 10.1007/s12011-016-0727-y

[学会発表](計 4 件)

柏崎萌子、風穴彰、中野裕太、野尻祐衣、山本歩、若林篤光
レアアースの遺伝毒性評価と抗菌材としての可能性の検討
日本環境変異原学会 第45回大会 平成28年11月(つくば)

柏崎萌子、風穴彰、若林篤光、山本歩
希土類元素の抗菌素材としての可能性の検討
平成27年度東北地区高等専門学校専攻科産学連携シンポジウム
平成27年12月(仙台)

柏崎萌子、風穴彰、若林篤光、山本歩
希土類元素の有効利用の検討
化学工学会第17回学生発表会
平成27年3月(八戸)

若林篤光、渡辺美和、中野裕太、野尻祐衣、富田浩史
レア・アースの線虫に対する毒性と線虫のレア・アースに対する忌避行動
日本動物学会・平成26年度東北支部大会
平成26年7月(盛岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 篤光 (WAKABAYASHI, Tokumitsu)
岩手大学・理工学部・助教
研究者番号: 30332498

(2) 研究分担者

山本 歩 (YAMAMOTO, Ayumi)
八戸工業高等専門学校・その他部局等・准教授
研究者番号: 60523800