

令和3年度

文部科学省 国家課題対応型研究開発推進事業

原子力システム研究開発事業

放射性廃液のガラス固化妨害元素（白金族金属、モリブデン）を対象にしたバイオ湿式
分離技術の創出

成果報告書

令和4年3月

公立大学法人 大阪府立大学

本報告書は、文部科学省の原子力システム研究開発事業による委託業務として、公立大学法人 大阪府立大学が実施した令和2年度－令和3年度「放射性廃液のガラス固化妨害元素（白金族金属、モリブデン）を対象にしたバイオ湿式分離技術の創出」の成果を取りまとめたものです。

目次

概略	vii
1. はじめに	1-1
2. 業務計画	
2.1 全体計画	2.1-1
3. 令和3年度の実施内容および成果	
3.1 バイオ分離剤の妨害金属イオン分離機能に及ぼす放射線照射の影響評価	3.1-1
3.1.1 パン酵母の妨害金属イオン分離効率に及ぼす放射線照射の影響に関する 検討 【R2-R3】	3.1-1
3.1.2 微生物の放射線抵抗性メカニズムに関する検討 【R2-R3】	3.1-10
3.2 ガラス固化妨害成分を含むバイオ分離剤の脱水・減容化方法の確立	3.2-1
3.2.1 機械的脱水による減容効果の検討 【R2】	3.2-1
3.2.2 乾燥・焼成によるパン酵母細胞の減容効果の検討 【R2-R3】	3.2-2
3.3 バイオ分離剤の細胞表層の化学修飾による金属イオン選択性の発現	3.3-1
3.3.1 FT-IR-ATR 分析によるパン酵母細胞表層の官能基の同定 【R2】	3.3-1
3.3.2 パン酵母細胞表層の化学修飾による官能基導入のプロトコルに関する 検討 【R2】	3.3-6
3.3.3 金属イオン選択性付与に関する検討 【R2-R3】	3.3-7
3.4 ガラス固化妨害成分のバイオ分離・除去操作の確立	3.4-1
3.4.1 パン酵母による妨害成分バイオ分離への影響因子に関する検討 【R2-R3】	3.4-1
3.4.2 廃液の連続処理に関する検討 【R2-R3】	3.4-14
3.5 研究推進 【R2-R3】	3.5-1
4. 結言	4-1

表一覧

表 3. 1-1	模擬廃液の化学組成	3. 1-1
表 3. 1-2	パン酵母生残数に及ぼす硝酸処理の影響	3. 1-16
表 3. 3-1	γ 線非照射パン酵母（試料 I）の FT-IR-ATR 分析における主な吸収帯	3. 3-2
表 3. 3-2	模擬廃液の化学組成	3. 3-7
表 3. 3-3	パン酵母（野生株、化学修飾株）による Ru/Rh 系模擬廃液からのガラス 固化妨害金属イオン除去率に及ぼす初期 pH およびバッチ操作時間の 影響（細胞濃度 36 g/L）	3. 3-9
表 3. 3-4	Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液（2.0 mol/L 硝酸水溶液）における長寿命 核種（Pd、Zr）と短寿命核種（Ru、Rh）の選択的分離（各バッチ操作の トルラ酵母添加量 36 g/L）	3. 3-14
表 3. 4-1	模擬廃液の化学組成	3. 4-1
表 3. 4-2	23 金属元素模擬廃液（硝酸濃度 2.0 mol/L）の化学組成	3. 4-2
表 3. 4-3	Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液および Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液におけるパン 酵母（野生株）による金属イオン（Pd (II)、Mo (VI)、Zr (IV)) 除去率 （酵母添加量 18 g/L、操作時間 30 min、廃液の硝酸濃度 2.0 mol/L）	3. 4-8
表 3. 4-4	トルラ酵母を用いる 23 金属元素模擬廃液（2.0 mol/L 硝酸水溶液）から のガラス固化妨害 5 元素総括除去率とバッチ除去操作回数との関係 （各バッチ操作の酵母添加量 36 g/L）	3. 4-12
表 3. 4-5	白金族金属（Pd、Ru、Rh）に対する既存の湿式分離法と新規バイオ分離法 の比較（廃液中の白金族金属濃度：50~5000 mg/L を想定）	3. 4-13

図一覧

図 1-1	放射性廃液からの白金族金属およびモリブデンのバイオ分離除去システム の概念図	1-2
図 2. 1-1	全体計画図	2. 1-1
図 3. 1-1	Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去率に 及ぼす乾燥パン酵母への γ 線照射線量の影響（酵母添加量 18 g/L）	3. 1-3
図 3. 1-2	Mo/Ru/Rh 系模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去率に及ぼす 乾燥パン酵母への γ 線照射線量の影響（酵母添加量 72 g/L）	3. 1-3
図 3. 1-3	Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液（硝酸濃度 2.0 mol/L）からのガラス固化 妨害金属イオン除去率に及ぼすパン酵母懸濁液への γ 線照射線量の影響 （酵母添加量 18 g/L）	3. 1-4
図 3. 1-4	Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液（硝酸濃度 2.0 mol/L）からのガラス固化 妨害金属イオン除去率に及ぼすパン酵母への γ 線照射の影響（各バッチ 操作の酵母添加量 18 g/L）	3. 1-5
図 3. 1-5	(a) Pd (II) /Zr (IV) イオンを分離除去したパン酵母（山吹色）、(b) ギ酸 ナトリウムによる化学還元処理後（80 °C、60 min）のパン酵母（黒褐色）	3. 1-6

図 3.1-6	パン酵母細胞（ギ酸ナトリウムによる化学還元処理後）の走査透過型電子顕微鏡法/エネルギー分散型 X 線分光法による観察および元素分布分析	・ 3.1-7
図 3.1-7	パン酵母細胞に生成したナノ粒子とそのナノビーム電子線回折スポット	・ 3.1-7
図 3.1-8	Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液（硝酸濃度 1.0 mol/L）からのガラス固化妨害金属イオン除去率に及ぼす γ 線照射線量の影響（酵母添加量 18 g/L）	3.1-9
図 3.1-9	Ru/Rh 系模擬廃液（硝酸濃度 0.01 mol/L）からのガラス固化妨害金属イオン除去率に及ぼす γ 線照射線量の影響（酵母添加量 18 g/L）	・ ・ ・ 3.1-9
図 3.1-10	パン酵母の生残率に及ぼす γ 線照射の影響	・ ・ ・ ・ ・ 3.1-14
図 3.1-11	パン酵母の酵素活性に及ぼす γ 線照射の影響	・ ・ ・ ・ ・ 3.1-15
図 3.1-12	パン酵母の酵素活性に及ぼす硝酸処理の影響	・ ・ ・ ・ ・ 3.1-15
図 3.2-1	パン酵母懸濁液（18 g/L 酵母）の遠心分離	・ ・ ・ ・ ・ 3.2-2
図 3.2-2	遠心分離操作（600 G、10 min）により回収された酵母細胞（含水率 73 wt%）	・ ・ ・ ・ ・ 3.2-2
図 3.2-3	パン酵母の示差熱・熱重量分析データ	・ ・ ・ ・ ・ 3.2-4
図 3.2-4	湿潤細胞（パン酵母、トルラ酵母）の乾燥処理（50 °C）における質量および減量化率の経時変化	・ ・ ・ ・ ・ 3.2-4
図 3.2-5	トルラ酵母とパン酵母に対する示差熱・熱重量分析データの比較	・ ・ ・ ・ 3.2-5
図 3.3-1	γ 線非照射パン酵母（試料 I）および γ 線照射パン酵母（試料 II）に対する FT-IR-ATR 吸収スペクトル	・ ・ ・ ・ ・ 3.3-2
図 3.3-2	硝酸水溶液に暴露したパン酵母（試料 III）および超純水に暴露したパン酵母（試料 I）に対する FT-IR-ATR 吸収スペクトル	・ ・ ・ ・ ・ 3.3-3
図 3.3-3	Pd (II) /Mo (VI) イオンを吸着したパン酵母（試料 VI）、Pd (II) イオンを吸着したパン酵母（試料 IV）、Mo (VI) イオンを吸着したパン酵母（試料 V）、硝酸水溶液に暴露させたパン酵母（試料 III）に対する FT-IR-ATR 吸収スペクトル	・ ・ ・ ・ ・ 3.3-5
図 3.3-4	Pd (II) イオンのタンパク質におけるアミノ基およびカルボキシル基（酵母細胞表層）への配位（推定）	・ ・ ・ ・ ・ 3.3-6
図 3.3-5	Pd (II) イオンのアミノ酸におけるカルボン酸（酵母細胞表層）との塩形成（推定）	・ ・ ・ ・ ・ 3.3-6
図 3.3-6	パン酵母（野生株）による Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去（酵母添加量 18 g/L、硝酸濃度 2.0 mol/L）	・ ・ ・ ・ 3.3-8
図 3.3-7	パン酵母（野生株）による Mo/Ru/Rh 系模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去（酵母添加量 72 g/L、硝酸濃度 2.0 mol/L）	・ ・ ・ ・ ・ 3.3-8
図 3.3-8	反復バッチ操作におけるパン酵母（化学修飾株、野生株）による Ru/Rh 系模擬廃液からの妨害金属イオン（Ru (III)、Rh (III)）除去率の経時変化（廃液初期 pH 1.5、各バッチ操作の酵母添加量 36 g/L）	・ ・ ・ ・ ・ 3.3-10
図 3.3-9	4 種酵母による Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去率の経時変化（酵母添加量 36 g/L）	・ ・ ・ ・ ・ 3.3-11
図 3.3-10	7 種酵母による Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液（2.0 mol/L 硝酸水溶液）	

	からの妨害金属イオン (Pd(II)、Zr(IV)、Mo(VI)) 除去率 (酵母添加量 36 g/L、時間 30 min)	3.3-11
図 3.3-11	5 種酵母による Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液 (1.0 mol/L 硝酸水溶液) からの妨害金属イオン (Pd(II)、Zr(IV)、Mo(VI)) 除去率 (酵母添加量 36 g/L、時間 30 min)	3.3-11
図 3.3-12	8 種酵母による Ru/Rh 系模擬廃液 (0.1 mol/L 硝酸水溶液) からのガラス固化妨害金属イオン除去 (酵母添加量 36 g/L)	3.3-13
図 3.3-13	8 種酵母による Ru/Rh 系模擬廃液 (0.01 mol/L 硝酸水溶液) からのガラス固化妨害金属イオン除去 (酵母添加量 36 g/L)	3.3-13
図 3.4-1	Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からの金属イオン (Pd (II) 、Zr (IV)) 除去率に及ぼす乾燥パン酵母の再水和条件 (硝酸濃度) の影響 (酵母添加量 18 g/L)	3.4-3
図 3.4-2	パン酵母による Pd(NO ₃) ₂ 水溶液からの Pd (II) イオン除去率に及ぼす硝酸濃度の影響 (Pd (II) 初期濃度 1.0 mmol/L、酵母添加量 9 g/L)	3.4-5
図 3.4-3	パン酵母による Pd(NO ₃) ₂ 水溶液からの Pd (II) イオン除去率に及ぼす酵母添加量の影響 (Pd (II) 初期濃度 1.0 mmol/L、硝酸濃度 2.0 mol/L)	3.4-5
図 3.4-4	パン酵母による Pd/Mo/Ru/Rh 系 4 成分模擬廃液からの Pd (II) イオン除去率に及ぼす酵母添加量の影響 (Pd (II) 初期濃度 5.0 mmol/L、硝酸濃度 2.0 mol/L)	3.4-5
図 3.4-5	パン酵母による Pd/Mo/Ru/Rh 系 4 成分模擬廃液からの Mo (VI) イオン除去率に及ぼす酵母添加量の影響 (Mo (VI) 初期濃度 5.0 mmol/L、硝酸濃度 2.0 mol/L)	3.4-5
図 3.4-6	パン酵母による Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からの金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) 除去率に及ぼす酵母添加量の影響. (a) 9 g/L、(b) 36 g/L	3.4-6
図 3.4-7	パン酵母 (野生株) による Pd(II) イオン吸着分離における酵母細胞-液相間の分配平衡に及ぼす共存金属イオンの影響	3.4-8
図 3.4-8	パン酵母 (野生株) によるガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Zr(IV)、Mo (VI)) 除去率に及ぼす共存金属イオンの影響 (酵母添加量 36 g/L、操作時間 30 min)	3.4-8
図 3.4-9	各種酵母によるガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Zr(IV)、Mo (VI)) 除去率に及ぼす共存金属イオンの影響 (酵母添加量 36 g/L、操作時間 30 min)	3.4-9
図 3.4-10	パン酵母 (野生株) を用いる 23 金属元素模擬廃液 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) からの各種金属元素の総括除去率 (5 回バッチ除去操作、各バッチ操作の酵母添加量 36 g/L)	3.4-11
図 3.4-11	トルラ酵母を用いる 23 金属元素模擬廃液 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) からの各種金属元素の総括除去率 (5 回バッチ除去操作、各バッチ操作の酵母添加量 36 g/L)	3.4-11

図 3. 4-12	連続槽型バイオ分離装置の概略図	3. 4-14
図 3. 4-13	連続操作における Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からの妨害金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) バイオ分離除去 (槽内パン酵母濃度 36 g/L) .Run 1 : 平均滞留時間 10 min ; Run 2 : 平均滞留時間 30 min ; Run 3 : 平均滞留時間 60 min	3. 4-15
図 3. 4-14	連続操作における Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からの妨害金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) 除去率および除去速度に与える平均滞留時間の影響 (槽内パン酵母濃度 36 g/L)	3. 4-16
図 3. 4-15	連続操作における Pd/Mo 系模擬廃液からの妨害金属イオン (Pd (II)、Mo (VI)) 総括除去率と連続槽台数の関係 (平均滞留時間 120 min、槽内パン酵母濃度 36 g/L)	3. 4-16
図 3. 4-16	不織布バッグ (パン酵母封入) を用いる Pd(NO ₃) ₂ 水溶液からの Pd (II) イオン除去率に及ぼす γ 線照射の影響 (液相 Pd 初期濃度 2.1 mmol/L、酵母添加量 18 g/L)	3. 4-18
図 3. 4-17	シームレスカプセル (パン酵母内包) を用いる Pd(NO ₃) ₂ 水溶液からの Pd (II) イオン除去率に及ぼす γ 線照射の影響 (液相 Pd 初期濃度 1.0 mmol/L、酵母添加量 3.6 g/L)	3. 4-18

略語一覧

ATR	: Attenuated Total Reflection (減衰全反射)
CFU	: Colony Forming Unit (コロニー形成単位)
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (デオキシリボ核酸 : 遺伝子の物質的本体)
DTA	: Differential Thermal Analysis (示差熱分析)
EDX	: Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (エネルギー分散型 X 線分光法)
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (フーリエ変換赤外分光法)
Gy	: Gray (グレイ : 吸収線量の単位)
ICP-AES	: Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (誘導結合プラズマ発光分光法)
LET	: Linear Energy Transfer (線エネルギー付与 : 荷電粒子の飛跡に沿って 単位長さ当りに局所的に与えられるエネルギー量)
NADH	: Reduced Form of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (H for hydrogen) (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型)
STEM	: Scanning Transmission Electron Microscopy (走査透過型電子顕微鏡法)
TG	: Thermogravimetry (熱重量分析)
WST	: Water Soluble Tetrazolium Salts (水溶性テトラゾリウム塩)

用語一覧

AP 部位	: Apurinic/Apyrimidinic Site (アプリニック/アピリミジニック部位 : ヌクレオチド鎖のなかで、塩基が脱離した 部位。プリン塩基の脱離で生じる場合はアプリニック部位、ピリミジン塩基の場合 はアピリミジニック部位)
PprA	: Pleiotropic Protein Promoting DNA Repair A (DNA 修復を促進する多面的タンパク質のひとつとして、A を付して名付けられた)
<i>pprA</i>	: PprA をコードしている遺伝子。
<i>pprI</i>	: PprA の発現を調節する遺伝子。調節遺伝子は、一般に I を付して名付けられた。
RecA	: Recombination A (遺伝子組換えに関与するタンパク質のひとつとして A を付して名付けられた)
<i>recA</i>	: RecA をコードする遺伝子。

概略

(1) 研究の背景

使用済み核燃料の再処理工程から大量発生する高レベル放射性廃液、また原子力発電所の操業・廃止時の除染等により発生する低レベル放射性廃液は、ガラス固化されて地層処分される計画である。放射性廃液のガラス固化工程における深刻な問題は、廃液に存在する i) 白金族金属（パラジウム (Pd)、ルテニウム (Ru)、ロジウム (Rh)) の溶融炉への沈積とともに、ii) 廃液中のモリブデン (Mo) による不溶性塩（イエローフェーズ）の形成、iii) 廃液中に共存するジルコニウム (Zr) との不溶性モリブデン酸ジルコニウムの形成である。そこでガラス固化妨害元素である白金族金属および Mo を廃液から分離除去するために、放射性廃液中の核種分離技術に関する研究は活発に行われてきたが、その実用化技術の開発においては解決すべき課題が残っている。

(2) 解決すべき課題と研究の目的

放射性廃液からのガラス固化妨害成分白金族金属 (Pd、Ru、Rh)・Mo の除去方法として、イオン交換樹脂や無機粒子（ゼオライト、フェロシアン化合物など）を用いる分離除去法では、廃液処理に伴う二次廃棄物の多量発生が課題となっている。また有機溶剤に溶解させた大環状化合物（複雑な環状構造を持つ有機物）等を分離剤として用いる溶媒抽出法では、各種の金属イオンに対して高い選択性が保証されるが、後処理が困難な放射性有機廃液を多量に排出する課題が残る。これら従来の吸着法や溶媒抽出法の改善策として、溶媒抽出剤（液体）を担持させた多孔性シリカ/ポリマー複合粒子（粒径 50~100 μm ）を分離剤に用いる抽出クロマトグラフィの開発が進められている。

本研究開発事業「新発想型」では、ガラス固化妨害成分 (Pd、Ru、Rh、Mo) を放射性廃液から分離除去するため、従来の溶媒抽出法や吸着法の短所を払拭できる分離技術の創出を目標に、パン酵母等の市販酵母（安全・低コストの普及品）をバイオフィン分離剤として活用し、廃液からガラス固化妨害成分を除去するバイオフィン分離技術を開発することを目的としている。加えて、ガラス固化妨害成分を含むパン酵母細胞の脱水・減容化方法を確認し、バイオフィン分離操作に伴う放射性二次廃棄物の発生量低減を図る。さらに、パン酵母（野生株）の細胞表層を人為的に化学修飾してガラス固化妨害成分に対する選択性を発現させ、パン酵母（化学修飾株）等をバイオフィン分離剤として用いて、長寿命核種 Pd の選択的除去（有害度低減）とともに、短寿命核種 Ru・Rh の選択的分離（資源化）を目指す。このように本事業では、放射線照射・硝酸酸性の過酷な環境下にも拘らず分離剤として微生物を活用して放射性廃液からのガラス固化妨害成分白金族金属 (Pd、Ru、Rh)・Mo の分離除去に挑むものであり、この新しい発想自体が挑戦的かつ独創的で、国内外の従来研究には皆無の発想である。

(3) 本研究の実施内容と成果

本研究では、放射性廃液に含まれるガラス固化妨害元素 (Pd、Ru、Rh、Mo) を対象にしたバイオフィン湿式分離技術の創出を目標に、模擬放射性廃液中のガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Ru (III)、Rh (III)、Mo (VI)) を除去するための新しい分離剤としてパン酵母等の市販酵母に着目し、その分離機能に及ぼす放射線照射および硝酸酸性の影響について検証するとともに、妨害金属イオン除去率に及ぼす各種操作条件の影響について明らかにした。加えて、ガラス固化妨害成分を含むパン酵母細胞の脱水・減容化方法、パン酵母（野生株）細胞表層に対して妨害金属イ

オン分離除去に有効な官能基を導入する化学修飾方法、市販酵母を用いる長寿命核種 Pd と短寿命核種 Ru・Rh の相互分離する操作方法についても開発した。具体的には、本研究の実施内容と成果は次のとおりである。

「バイオ分離剤の妨害金属イオン分離機能に及ぼす放射線照射の影響評価」に関しては、硝酸水溶液中においてコバルト 60 γ 線を照射したパン酵母等の市販酵母（安全・低コストの普及品）をバイオ分離剤として用いて、Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液（5.0 mmol/L 各金属濃度、2.0 mol/L 硝酸）からのガラス固化妨害金属イオン（Pd (II)、Ru (III)、Rh (III)、Mo (VI)）の分離除去実験を行い、過酷な環境下（硝酸濃度 \leq 2.0 mol/L、 γ 線の線量 \leq 3.0 kGy）においても、パン酵母等の各種酵母が備えている妨害金属イオン分離機能は損なわれないことを検証した。ただし、パン酵母の生理状態に関しては、 γ 線照射ならびに硝酸処理によってパン酵母細胞の生残率は低下するとともに、パン酵母細胞の酵素活性も低減することを確認した。さらに、放射線抵抗性微生物に関する文献調査結果を参考に、放射線照射・硝酸酸性の過酷な環境下においても、パン酵母がガラス固化妨害イオン分離機能を備える要因について考察した。

「ガラス固化妨害成分を含むバイオ分離剤の脱水・減容化方法の確立」に関しては、機械的脱水による減容効果を定量的に把握するために、バイオ分離剤であるパン酵母の濾過・脱水実験を行い、酵母細胞の減容化効果について評価した。その結果、液中に懸濁するパン酵母の固液分離には遠心沈降法が適しており、弱い遠心場（600 G、10 min）でも酵母細胞が液中から完全に沈降し、堆積酵母の含水率が 70%程度になることがわかった。さらに、乾燥・焼成によるパン酵母細胞の減容効果を評価するために、ガラス固化妨害成分を含むパン酵母（湿潤細胞）に対して示差熱・熱重量分析を行い、操作温度と細胞減量化率との関係を明らかにするとともに、パン酵母の焼成後に残渣となる無機灰分量を把握した。パン酵母（Pd、Zr を含む湿潤細胞）は、乾燥処理（50°C、30 h）によって初期質量の 30%程度、さらに乾燥細胞の焼成処理（500°C 付近）によって初期質量の 2%程度まで減量できることを示した。

「バイオ分離剤の細胞表層の化学修飾による金属イオン選択性の発現」に関しては、バイオ分離剤であるパン酵母による妨害金属イオン（Pd (II)、Mo (VI)）吸着に寄与する官能基（細胞表層）を同定するため、妨害金属イオン分離・除去実験の前後のパン酵母（乾燥細胞）に対して FT-IR-ATR（フーリエ変換-赤外分光-減衰全反射）分析を行った。その結果、パン酵母による Pd (II) イオンの分離除去においては、細胞表層に存在するタンパク質中のアミノ基およびカルボキシル基が寄与していることを明らかにした。また、パン酵母（野生株）の細胞表層にリン酸基を導入したパン酵母（化学修飾株）および市販の飼料用酵母をバイオ分離剤として用いて、Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液（5.0 mmol/L 各金属濃度、2.0 mol/L 硝酸）から長寿命核種 Pd・Zr を選択的除去（有害度低減）するとともに、短寿命核種 Ru・Rh を選択的分離（資源化）できる操作方法を提案した。

「ガラス固化妨害成分のバイオ分離・除去操作の確立」に関しては、パン酵母（野生株）を用いて Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液（5.0 mmol/L 各金属濃度、2.0 mol/L 硝酸）からのガラス固化妨害金属イオン分離除去実験をバッチ操作法で行い、各種因子（酵母添加量、硝酸濃度、共存金属イオン）が各妨害金属イオン除去率に及ぼす影響を明らかにした。特に、パン酵母による妨害金属イオン（Pd (II)）除去率は、共存イオン（Zr (IV)、Nd (III)）によって影響されなかった。パン酵母および飼料用酵母による 6 種金属イオン分離除去の選択性は、次の序列に従って

変化することも明らかにした。

Pd(II) > Zr(IV) > Mo(VI) > Ru(III) > Rh(III)、Nd(III)

また、パン酵母（野生株）を利用するバイオ分離除去における問題点を洗い出し、妨害金属イオン除去率を向上させるための方策として多回バッチ操作方式の採用、新たなバイオ分離剤としてのパン酵母（化学修飾株）および飼料用酵母の活用に取り組み、問題点に対する解決策を提案・実践した。特に、23 金属元素模擬廃液（ガラス固化妨害元素、希土類元素、アルカリ金属元素、アルカリ土類金属元素等を含む硝酸溶液）を対象に、ガラス固化妨害元素（Pd、Mo、Ru、Rh）に対する除去率が 90%以上、23 元素のうちの 18 元素に対する除去率が 60%以上となるバイオ分離操作条件を確立した。以上の実験データを基に、廃液からのガラス固化妨害元素の分離除去を想定して、本バイオ分離法と既存の分離方法を定性的に比較した。

さらに、放射性廃液の大量処理を想定し、連続槽型バイオ分離装置（攪拌槽への模擬廃液と乾燥パン酵母の連続的な供給・排出）による妨害イオンのバイオ除去実験を行い、平均滞留時間（槽容積/廃液の体積流量）および連続槽の連結台数が妨害イオン除去速度に及ぼす影響を定量的に把握した。これに併せて、バイオ分離剤である酵母細胞（妨害イオン含有）の固液分離を簡便にするツールとして、バイオ分離剤を封入したカプセル、不織布バッグの有効性を示した。

1. はじめに

高レベル放射性廃液、また低レベル放射性廃液は、ガラス固化されて地層処分される計画であるが、廃液に存在する白金族金属（パラジウム（Pd）、ルテニウム（Ru）、ロジウム（Rh））の溶融炉への沈積とともに、廃液中のモリブデン（Mo）による不溶解性塩（イエローフェーズ）の形成と共存するジルコニウム（Zr）との不溶性モリブデン酸ジルコニウムの形成は、放射性廃液のガラス固化工程における問題点となっている。

本研究開発事業「新発想型」では、従来の溶媒抽出法や吸着法の問題点を払拭できる革新的な分離技術の創出を目標に、パン酵母等の市販酵母（安全・低コストの普及品）を新規な分離剤として活用し、過酷な環境下（放射線照射、硝酸酸性）にも拘らず分離剤としてパン酵母等を活用して放射性廃液からのガラス固化妨害元素（白金族金属（Pd、Ru、Rh）、Mo）の除去に挑むものであり、放射線殺菌という既存概念を打ち破る発想自体が挑戦的かつ独創的で、国内外の従来研究には皆無の発想である。本事業のベースとなる学術的根拠は、研究代表者の技術シーズ『低コストで大量入手できる酵母 *Saccharomyces cerevisiae*（パン酵母）は、過酷な放射線（ ≤ 3.0 kGy）に暴露された後でも、硝酸水溶液中の Pd や Mo を高速・高効率・選択的に分離除去する機能を発揮できる』[1-10]である。

この技術シーズを基に、本事業では放射性廃液に含まれるガラス固化妨害金属イオン（Pd（II）、Ru（III）、Rh（III）、Mo（VI））を除去するための斬新な分離剤として、パン酵母等の市販酵母を活用し、その分離機能に及ぼす硝酸環境下での放射線照射の影響を明らかにしたうえで、妨害金属イオンの高速・高効率除去が簡便な操作方式によって達成できるとともに、放射性二次廃棄物の発生量が少ないことを特長とするバイオ分離技術の創出を目指す。具体的には、模擬廃液（ガラス固化妨害元素、希土類元素、アルカリ金属元素、アルカリ土類金属元素等を含む硝酸溶液）を対象に、i) パン酵母等による妨害金属イオン分離効率に及ぼすコバルト 60γ 線照射線量、硝酸濃度の影響を評価する、ii) 妨害金属イオンを含むパン酵母の脱水・減容化方法を確立し、バイオ分離操作に伴う放射性二次廃棄物の発生量低減を図る、iii) 分離剤自体の高機能化を図るため、パン酵母（野生株）の細胞表層にリン酸基を導入したパン酵母（化学修飾株）を開発するとともに、パン酵母（野生株）に比べて妨害金属イオン分離機能が優れた市販酵母を探索する、iv) 妨害金属イオン除去操作を最適化することにより、模擬廃液からの長寿命核種 Pd・Zr の選択的除去（有害度低減）と短寿命核種 Ru・Rh の選択的分離（資源化）をめざす（図 1-1）。

参考文献

- [1] Saitoh, N., Fujimori, R., Tanaka, H., Kondoh, A., Nomura, T. & Konishi, Y. Microbial recovery of palladium by baker's yeast through bioreductive deposition and biosorption. *Hydrometallurgy*. 196, 105413 (2020).
- [2] 小西康裕. パン酵母を分離剤として活用する貴金属・レアメタル（金、パラジウム、白金）のバイオ回収. *環境管理*. 55, 29-33 (2019).
- [3] Saitoh, N., Fujimori, R., Nakatani, M., Nomura, T. & Konishi, Y. Microbial recovery of gold from neutral and acidic solutions by the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Hydrometallurgy*. 181, 29-34 (2018).

- [4] Saitoh, N., Fujimori, R., Nakatani, M., Nomura, T. & Konishi, Y. Microbial recycling of precious and rare metals sourced from post-consumer products. *Solid State Phenomena*. 262, 563-567 (2017).
- [5] 小西康裕. 微生物を利用する貴金属・レアメタルの分離・回収システム. 金属. 87, 689-697 (2017).
- [6] 小西康裕, 斎藤範三, 古田雅一. 放射性白金族金属の回収方法. 特願 2020-078453 (2020. 4. 27 出願) .
- [7] 小西康裕, 斎藤範三, 古田雅一. 放射性の Pd の回収方法および Pd の製造方法. 特許第 6707250 (2020. 5. 22 登録) .
- [8] 小西康裕, 斎藤範三, 岸田正夫. 貴金属の回収方法. 特許第 6586690 (2019. 9. 20 登録) .
- [9] 小西康裕, 斎藤範三, 岸田正夫. 貴金属の回収方法. 特許第 6230033 (2016. 10. 27 登録) .
- [10] 小西康裕. 科学研究費助成事業・挑戦的研究(開拓) 17H06232 (2017-2019) 研究成果報告書 <https://kaken.nii.ac.jp/report/KAKENHI-PROJECT-17H06232/17H06232seika/>

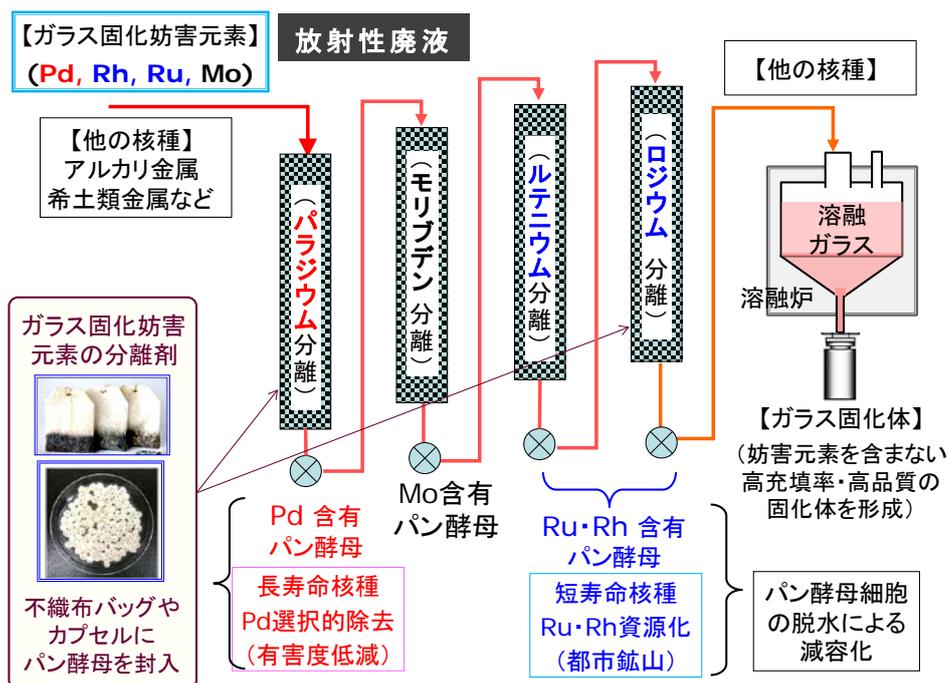


図 1-1 放射性廃液からの白金族金属およびモリブデンのバイオ分離除去システムの概念図

2. 業務計画

2.1 全体計画

本業務の全体計画図を図 2.1-1 に示す。

項目	年度	令和2年度	令和3年度
(1) バイオ分離剤の妨害金属イオン分離機能に及ぼす放射線照射の影響評価			
① パン酵母の妨害金属イオン分離効率に及ぼす放射線照射の影響に関する検討		パン酵母(野生株)に対する検証	各種酵母(野生株や化学修飾株)に対する検証
② 微生物の放射線抵抗性メカニズムに関する検討		文献調査	放射線抵抗性と妨害イオン分離機能を備える要因を考察
(2) ガラス固化妨害成分を含むバイオ分離剤の脱水・減容化方法の確立			
① 機械的脱水による減容効果の検討		脱水実験	
② 乾燥・焼成によるパン酵母細胞の減容効果の検討		熱分析	乾燥・焼成実験による減容化検証、バイオ分離剤(湿潤細胞)の乾燥条件検討
(3) バイオ分離剤における妨害金属イオン選択性の発現			
① FT-IR-ATR分析によるパン酵母細胞表層の官能基の同定		IR分析	官能基の導入実験と選択性付与の効果検証、各種酵母株を用いた特定金属イオンに対する選択性の有無を検討、長寿命核種(Pd)と短寿命核種(Ru,Rn)の選択的分離を検討
② パン酵母細胞表層の化学修飾による金属イオン選択性付与に関する検討		プロトコル検討	
(4) ガラス固化妨害成分のバイオ分離・除去操作の確立			
① パン酵母による妨害成分バイオ分離への影響因子に関する検討		影響因子の洗い出し	各種因子(細胞濃度、硝酸濃度、共存金属イオンなど)の影響評価 従来の分離技術との比較検討
② 廃液の連続処理に関する検討		装置準備	連続処理のデータ収集・解析
(5) 研究推進		情報共有・議論・論文投稿の準備	情報共有・議論・成果発表
		△ 総括・評価	△ 総括・評価 △ 総括・評価

図 2.1-1 全体計画図

3. 業務の実施内容および成果

3.1 バイオ分離剤の妨害金属イオン分離機能に及ぼす放射線照射の影響評価

3.1.1 パン酵母の妨害金属イオン分離効率に及ぼす放射線照射の影響に関する検討【R2-R3】

所定線量のコバルト 60 γ 線を照射した各種酵母(野生株、化学修飾株)をバイオ分離剤として用いて、模擬廃液からのガラス固化妨害イオン (Pd (II)、Ru (III)、Rh (III)、Mo (VI)) の分離・除去実験を行い、硝酸下での γ 線照射が各種酵母の備える妨害イオン分離機能に及ぼす影響について検討した。

令和 2 年度には、各種の模擬廃液を対象にパン酵母 (野生株) の妨害金属イオン分離機能に対する γ 線照射の影響について調べた。

令和 3 年度には、パン酵母 (化学修飾株) および他種酵母 (野生株) の妨害金属イオン分離機能に対する γ 線照射の影響について検討した。

(1) パン酵母 (野生株) の妨害金属イオン分離効率への放射線照射の影響【R2】

ガラス固化妨害金属イオンのバイオ分離剤としては、食品分野の普及品であり入手容易かつ安価なパン酵母 (オリエンタル酵母工業(株)、乾燥細胞) を用いた。本バイオ分離剤に対する放射線照射の影響を明らかにするために、①パン酵母の乾燥細胞および②乾燥パン酵母を硝酸水溶液中に添加して調製した酵母細胞懸濁液に対して、高レベル放射性廃液の放射線環境 (ガラス固化体の製造時線量率 1.5 kSv/h) を考慮して線量 1.0 kGy および 3.0 kGy のコバルト 60 γ 線を照射し、妨害金属イオン分離機能について評価した。なお、コバルト 60 γ 線の照射実験は、大阪府立大学放射線研究センターにおいて実施した。

模擬廃液としては、5 種類の初期組成を持つ硝酸水溶液を使用した。表 3.1-1 に示すように、模擬廃液は、所定濃度の Pd(NO₃)₂、Ru(NO₃)₃、Rh(NO₃)₃、(NH₄)₆Mo₇O₂・4H₂O、ZrO(NO₃)₂・2H₂O、Nd(NO₃)₃ をそれぞれ含む硝酸水溶液である。模擬廃液の硝酸濃度は主として 2.0 mol/L であるが、一部の実験では硝酸濃度を 1.0 mol/L または 0.01 mol/L に変更した。

表 3.1-1 模擬廃液の化学組成

模擬廃液	Pd [mmol/L]	Ru [mmol/L]	Rh [mmol/L]	Mo [mmol/L]	Zr [mmol/L]	Nd [mmol/L]	HNO ₃ [mol/L]
Ru/Rh 系	-	2.5	2.5	-	-	-	0.01
Mo/Ru/Rh 系	-	5.0	5.0	5.0	-	-	2.0
Pd/Mo/Ru/ Rh 系	5.0	5.0	5.0	5.0	-	-	2.0
Pd/Mo/Ru/ Rh/Zr/Nd 系	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0
Pd/Mo/Ru/ Rh/Zr/Nd 系	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0

① パン酵母の乾燥細胞に対する γ 線照射の影響

ガラス固化妨害金属イオン (Pd (II) , Rh (III) , Ru (III) , Mo (VI)) のバイオ分離除去実験は、大気開放下において、所定量の模擬廃液に対して γ 線を照射したパン酵母を添加してバッチ操作によって行った。主な操作条件は、温度 34 °C の一定条件下において、乾燥パン酵母の添加量は 18 g/L (細胞濃度 5.0×10^{14} cells/m³) または 72 g/L (細胞濃度 2.0×10^{15} cells/m³) である。対照実験としては、 γ 線非照射のパン酵母を用いて、同様の妨害金属イオン除去実験を行った。パン酵母の添加から所定時間ごとに液試料を採取し、その液相金属濃度を ICP-AES 装置 (島津製作所製、ICPE-9800) を用いて測定した。なお、液相細胞濃度はヘマトメーター法で測定した。また、パン酵母による模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン分離除去率 (以下では妨害金属イオン除去率) は、バイオ分離前後における液相金属濃度の減少量に基づいて物質収支から算出した。妨害金属イオン除去率に及ぼす γ 線照射の影響を実験的に検討することによって、バイオ分離剤である微生物試料の放射線抵抗性を判定した。

図 3.1-1 は、Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液を対象に、線量範囲 0~3.0 kGy の γ 線を照射したパン酵母を用いて、ガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Rh (III)、Ru (III)、Mo (VI)) の除去実験をバッチ操作によって行った結果を示したものである。なお、パン酵母の添加量は 18 g/L (細胞濃度 5.0×10^{14} cells/m³) である。図 3.1-1 に示すように、 γ 線 (1.0 kGy、3.0 kGy) を照射したパン酵母による妨害金属イオン除去率の経時変化は、 γ 線非照射パン酵母の場合と同様の挙動を示すことが明らかになった。すなわち、 γ 線照射 (≤ 3.0 kGy) の影響を受けずに、4 種の妨害金属イオンのうちで Pd (II) イオンが選択的に模擬廃液からパン酵母によって急速に分離除去され、60 min のバッチ操作において Pd (II) イオン除去率は 70%に、120 min 後には Pd (II) イオン除去率は 72%に達する。また、Mo (VI) イオンもパン酵母によって急速に分離除去され、60 min 以内のバッチ操作において Mo (VI) イオン除去率は 22%になった。なお、模擬廃液中の Ru (III) イオン除去率は 3%以下、Rh (III) イオン除去率は 0%と低レベルであったので、それらデータの記載は割愛した。

Mo/Ru/Rh 系模擬廃液を対象に、線量範囲 0~3.0 kGy の γ 線を照射したパン酵母による妨害金属イオン (Mo (VI)、Ru (III)、Rh (III)) 除去率に及ぼす照射線量の影響を検討した。図 3.1-2 に示すように、 γ 線 (1.0 kGy、3.0 kGy) を照射したパン酵母による妨害金属イオン (Mo (VI)、Ru (III)) 除去率は、非照射パン酵母を用いる場合と同程度になることがわかった。すなわち、コバルト 60 γ 線の照射 (≤ 3.0 kGy) の影響を受けずに、パン酵母の添加量が 72 g/L (細胞濃度 2.0×10^{15} cells/m³) の場合には Mo (VI) イオン除去率は 67%、Ru (III) イオン除去率は 10%であった。なお、本実験条件下では、Rh (III) イオンのバイオ除去は認められなかったため、そのデータの記載は割愛した。

以上の実験結果から、ガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Mo (VI)、Ru (III)) に対するパン酵母の分離機能は、乾燥細胞状態における γ 線暴露 (≤ 3.0 kGy) の影響を受けないことが明らかになった。

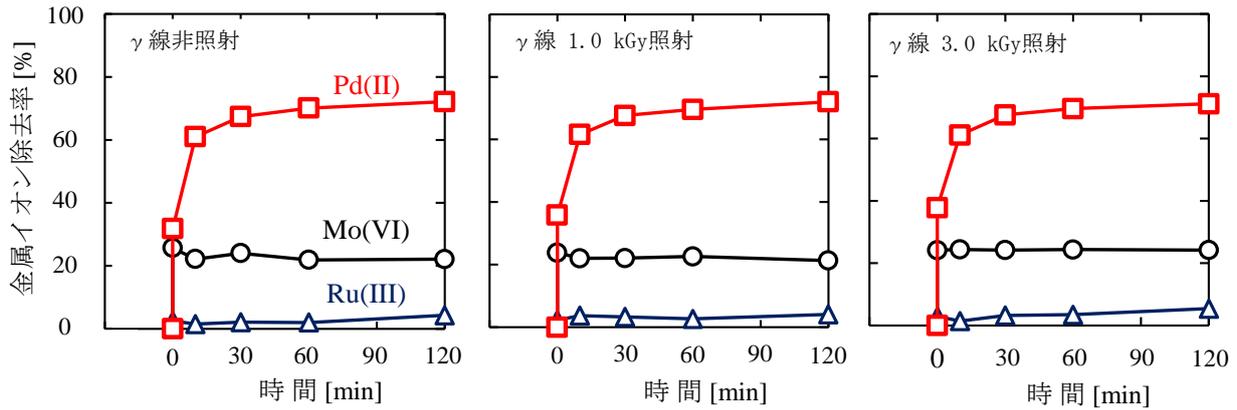


図 3.1-1 Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去率に及ぼす乾燥パン酵母への γ 線照射線量の影響 (酵母添加量 18 g/L)

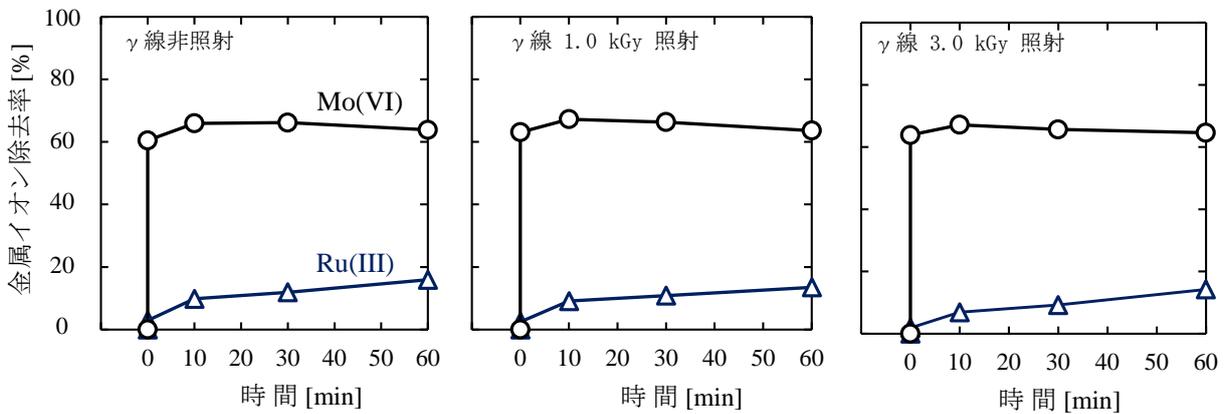


図 3.1-2 Mo/Ru/Rh 系模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去率に及ぼす乾燥パン酵母への γ 線照射線量の影響 (酵母添加量 72 g/L)

② 硝酸水溶液中のパン酵母細胞に対する γ 線照射の影響

高レベル放射性廃液を処理することを考慮して、硝酸下のパン酵母に対して放射線抵抗性を検証した。具体的には、2.0 mol/L 硝酸水溶液および 0.2 mol/L 硝酸水溶液に対して乾燥パン酵母を添加し、細胞濃度 36 g/L の酵母懸濁液を調製した。この細胞懸濁液の約 4 mL をホウケイ酸ガラス製スクリー管 (容量 5 mL) に入れ、積算線量 1.0 kGy および 3.0 kGy の γ 線を照射した。照射線源はコバルト 60、線量率は 1.0 kGy/h であった。このように硝酸下での暴露パン酵母をバイオ分離剤として用いて、模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去実験をバッチ操作によって行った。主な実験条件は、細胞濃度 18 g/L、温度 34 °C である。

図 3.1-3 は、Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液 (硝酸濃度 2.0 mol/L) からの Pd (II) イオン除去率および Zr (IV) イオン除去率に及ぼす γ 線照射線量の影響を示したものである。 γ 線照射時の硝酸濃度が 0.2 mol/L および 2.0 mol/L の条件下において、積算線量 1.0 kGy および 3.0 kGy

の γ 線を照射したパン酵母は、非照射パン酵母と同程度の金属イオン除去率を示すことが明らかになった。したがって、パン酵母が備えている金属イオン(Pd (II)、Zr (IV))分離機能は、硝酸下 ($\leq 2.0 \text{ mol/L}$) のコバルト 60 γ 線暴露 ($< 3.0 \text{ kGy}$) の影響を受けないとみなして差し支えない。なお、本実験条件下では、模擬廃液中の金属イオン(Mo (VI)、Ru (III)、Rh (III)、Nd (III))の除去率は5%以下と低レベルであったので、図中へのそれら実験データの記載を割愛した。

また図 3.1-3 において Pd (II) イオン除去率は、パン酵母への γ 線照射時の硝酸濃度が 0.2 mol/L の場合には60%程度であるのに比べて、硝酸濃度が 2.0 mol/L の場合には55%に低下した。これは、パン酵母のPd (II) イオン分離機能が硝酸濃度によって影響を受けるためと考えられる。その詳細については、3.4.1に記載する。

次に、パン酵母 (2.0 mol/L 硝酸水溶液中で 3.0 kGy の γ 線照射または非照射)の一定量(古保添加量 36 g/L)を2等分して添加する2回バッチ除去操作実験を行った。Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd系模擬廃液(硝酸濃度 2.0 mol/L)を用いて行った実験結果を図 3.1-4に示す。ただし、模擬廃液中のRu (III)、Rh (III)イオン、Nd (III)イオンのバイオ分離除去が認められなかったため、これらデータは図中に記載していない。2回バイオ除去操作による金属イオン総括除去率は、 γ 線照射線量の影響を受けずに、Pdが98%、Zrが92-93%、Moが $26 \pm 2\%$ になることがわかった。これらの実験結果は、高レベル放射性廃液中のガラス固化妨害金属元素(Pd、Mo)および長寿命核種(Pd、Zr)の新規な分離剤として、市販のパン酵母が応用できる可能性を示唆するものである。

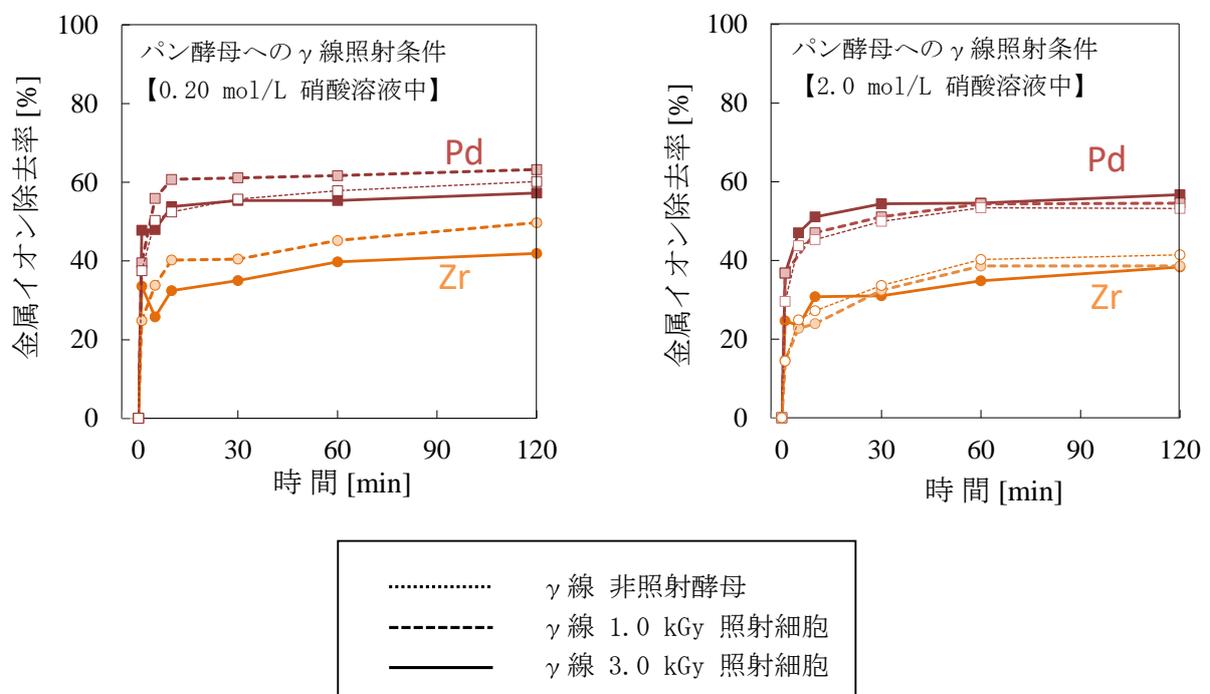


図 3.1-3 Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd系模擬廃液(硝酸濃度 2.0 mol/L)からのガラス固化妨害金属イオン除去率に及ぼすパン酵母懸濁液への γ 線照射線量の影響(酵母添加量 18 g/L)

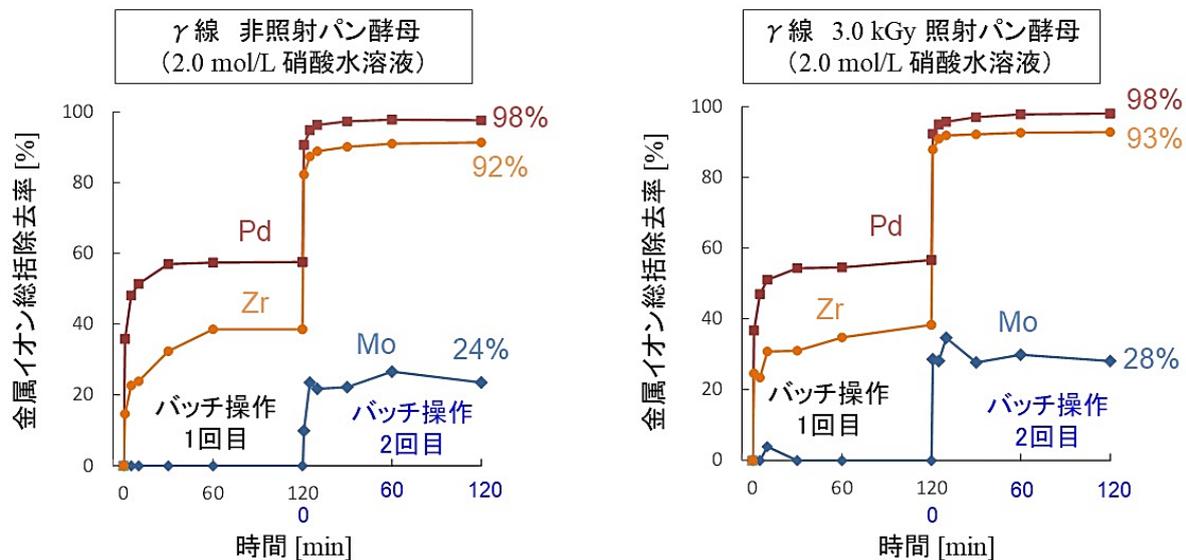


図 3.1-4 Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液（硝酸濃度 2.0 mol/L）からのガラス固化妨害金属イオン除去率に及ぼすパン酵母へのγ線照射の影響（各バッチ操作の酵母添加量 18 g/L）

③ パン酵母細胞に分離除去された Pd (II) イオンの化学還元・固体粒子化

模擬廃液から分離除去された Pd (II) イオンが酵母細胞に存在することを可視化して観察するために、パン酵母細胞に分離除去された Pd (II) イオンを化学還元して固体粒子化した。具体的には、γ線照射時の硝酸濃度が 2.0 mol/L のパン酵母を用いて、Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液（硝酸濃度 2.0 mol/L）を対象にバイオ分離除去実験（図 3.1-3 のデータと同条件）を行い、Pd (II) イオンおよび Zr (IV) イオンを分離除去した酵母細胞を調製した。細胞 Pd 濃度は 18.1 mg/g-乾燥細胞、細胞 Zr 濃度は 10.0 mg/g-乾燥細胞である。次に、模擬廃液からパン酵母（Pd、Zr 含有）を遠心分離し、超純水で洗浄した後、この酵母細胞を化学還元剤であるギ酸ナトリウム水溶液に添加した。化学還元条件としては、ギ酸塩濃度 0.1 mol/L、温度 80°C、酵母添加量 18 g/L (5.0×10^{14} cells/m³)、反応時間 60 min である。図 3.1-5 は、化学還元実験の前後におけるパン酵母を撮影したものである。化学還元実験後には、酵母細胞が黒褐色（Pd ナノ粒子のプラズモン吸収）に変化しており、酵母細胞内において Pd (II) イオンが Pd ナノ粒子に変換されたことが確認できた。電気化学的にも、Pd (II) イオンの化学還元が優先的に進行することは、Pd (II) イオンの標準電極電位 ($\text{Pd}^{2+} + 2e = \text{Pd}$; $E_0 = + 0.987 \text{ V}$) と Zr (IV) イオンの標準電極電位 ($\text{Zr}^{4+} + 4e = \text{Zr}$; $E_0 = - 1.53 \text{ V}$) を比較することにより自明である。

次に、化学還元実験後の酵母細胞表面に存在している Pd および Zr に対して、走査透過型電子顕微鏡法 (STEM)/エネルギー分散型 X 線分光法 (EDX) による観察/元素分析を行った。なお、STEM 観察/EDX 分析には、原子分解能分析電子顕微鏡 (JEOL 製、JEM-ARM200F Dual-X) および EDX

検出器 (JEOL 製、JED2300) を用いた。図 3.1-6 に示すように、硝酸下における γ 線照射パン酵母 (3.0 kGy) は、非照射パン酵母と同様の STEM/EDX 分析結果であった。低倍率の STEM 像から 2~3 μm の球状細胞が観察されることから、硝酸下において 3.0 kGy の γ 線が照射された場合でさえも、パン酵母細胞は外形を留めていることが判明した。また、低倍率の EDX 元素マップから、Pd は酵母細胞上に分布しており、Zr は酵母周縁部や酵母同士の接合部にも確認できる。Pd および Zr の分布については、細胞表面の場所により強度差が確認できるが、偏析は認められない。高倍率の元素マップから、Pd と Zr の元素分布は一致せず、Pd ナノ粒子 (粒子径 3~5 nm) の周囲に Zr が分布している様子が観察された。また、図 3.1-7 にパン酵母細胞に生成したナノ粒子のナノビーム電子線回折分析の結果を示す。Pd ナノ粒子に対する高倍率 STEM 観察から格子像が確認できるとともに、ナノビーム電子線回折におけるスポットの出現から、ナノ粒子は金属パラジウムと同定できる。STEM/EDX 分析によって原子レベルで確認された Pd ナノ粒子生成は、マクロレベルでは酵母細胞の黒褐色化 (図 3.1-5) として肉眼で観察されたことになる。

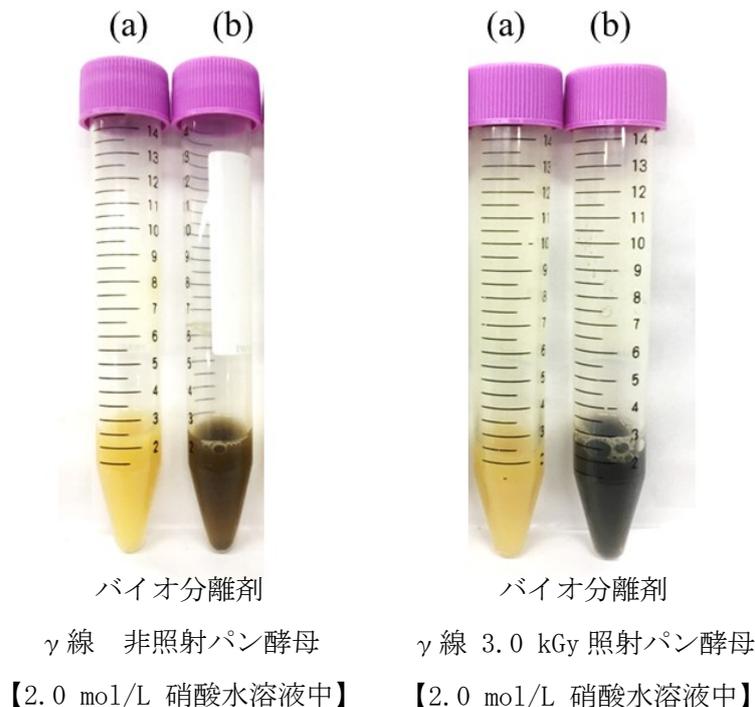


図 3.1-5 (a)Pd (II) /Zr (IV) イオンを分離除去したパン酵母(山吹色), (b)ギ酸ナトリウムによる化学還元処理後 (80 °C、60 min) のパン酵母(黒褐色)

γ線 3.0 kGy 照射パン酵母細胞
【2.0 mol/L 硝酸水溶液中】

γ線非照射パン酵母細胞
【2.0 mol/L 硝酸水溶液中】

STEM 像
(高角度環状暗視野) EDX 元素マッピング
(赤: Pd, 青: Zr)

STEM 像
(高角度環状暗視野) EDX 元素マッピング
(赤: Pd, 青: Zr)

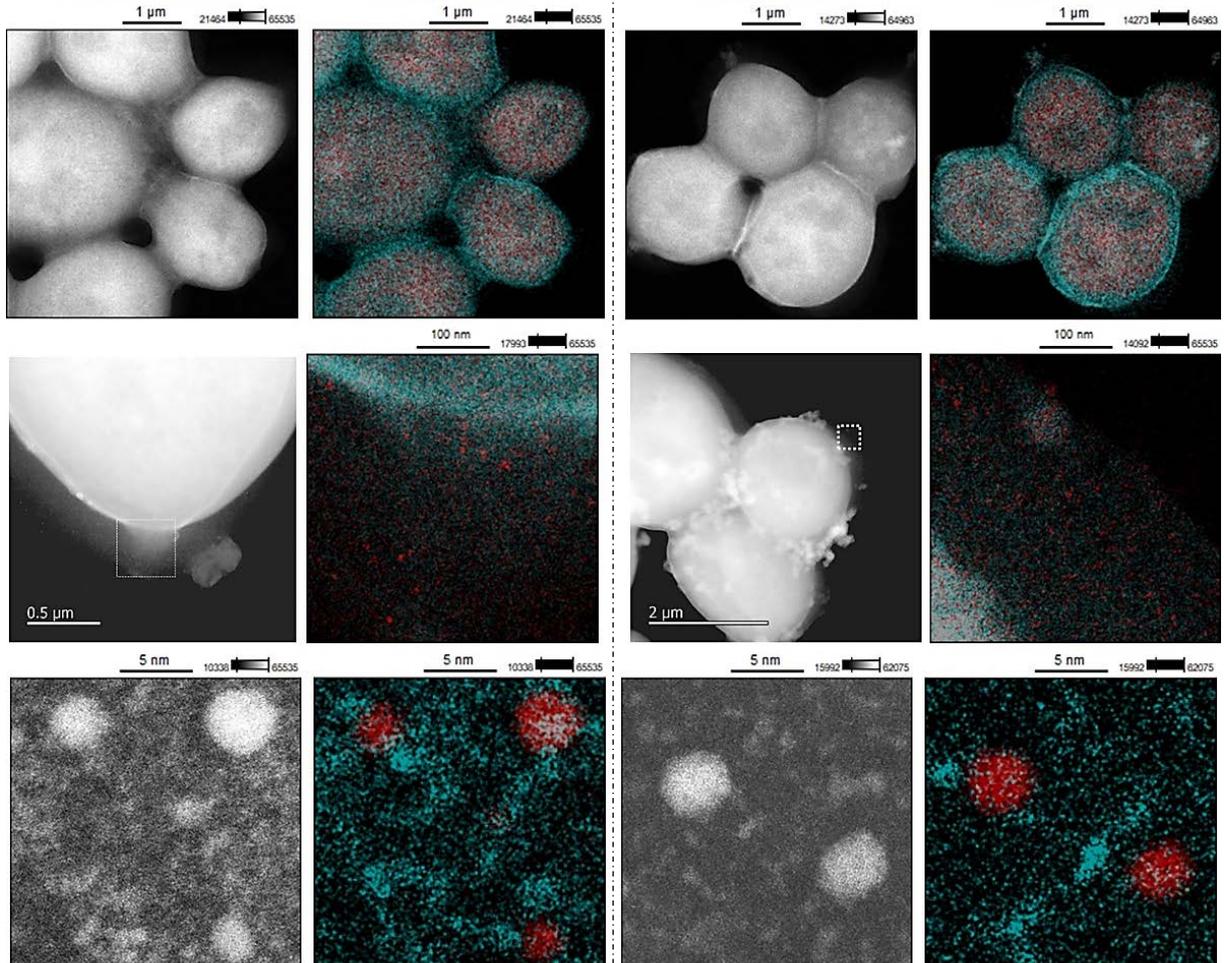


図 3.1-6 パン酵母細胞（ギ酸ナトリウムによる化学還元処理後）の走査透過型電子顕微鏡法/エネルギー分散型 X 線分光法による観察および元素分布分析

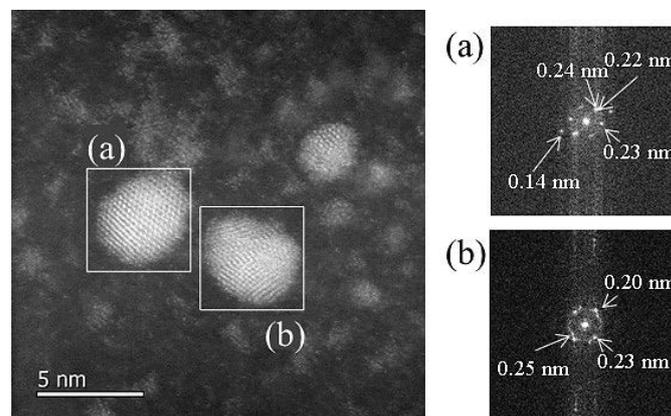


図 3.1-7 パン酵母細胞に生成したナノ粒子とそのナノビーム電子線回折スポット

(2) パン酵母（化学修飾株）および他種酵母（野生株）の妨害金属イオン分離機能への放射線照射の影響【R3】

ガラス固化妨害金属イオン（Pd（II），Rh（III），Ru（III），Mo（VI））分離剤としては、前年度に開発した化学処理方法に基づいてパン酵母（野生株）細胞表層にリン酸基を導入したパン酵母（化学修飾株）を用いた。また、バイオ分離剤として選定した他種酵母（野生株、三輪製薬（株））は、トルラ酵母、しょう油酵母、脱核酵母、ビール酵母である。これらの各種酵母に対する放射線照射の影響を明らかにするために、上記の酵母種の乾燥細胞を硝酸水溶液中に添加した酵母細胞懸濁液に対して線量 1.0 kGy および 3.0 kGy のコバルト 60 γ 線を照射し、妨害金属イオン分離機能を評価した。

ガラス固化妨害金属イオンのバイオ分離除去実験は、大気開放下において、所定量の模擬廃液に対して γ 線を照射したパン酵母を添加してバッチ操作によって行った。主な操作条件は、温度 34 °C の一定条件下において、各種酵母（乾燥細胞）の添加量は 18 g/L、バッチ操作時間は 30 min である。対照実験としては、 γ 線非照射の酵母を用いて、同様の妨害金属イオン除去実験を行った。各種酵母の添加から所定時間ごとに液試料を採取し、その液相金属濃度を ICP-AES 装置（島津製作所製、ICPE-9800）を用いて測定した。各種酵母による模擬廃液からの妨害金属イオン除去率は、バイオ分離前後における液相金属濃度の減少量に基づいて物質収支から算出した。

図 3.1-8 に、線量範囲 0~3.0 kGy の γ 線を照射した各種酵母を用いて、Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液（硝酸濃度 1.0 mol/L）からの妨害金属イオン（Pd（II）、Zr（IV）、Mo（VI））除去実験を行った結果を示す。 γ 線（1.0 kGy、3.0 kGy）を照射した各種酵母による妨害金属イオン除去率は、非照射の各種酵母の場合と同程度であることがわかる。すなわち、パン酵母（野生株）、トルラ酵母、しょう油酵母、脱核酵母、ビール酵母が備える 3 種金属イオン（Pd（II）、Zr（IV）、Mo（VI））除去機能は、パン酵母（野生株）と同様に、 γ 線の照射（ \leq 3.0 kGy）の影響を受けないことが明らかになった。なお、妨害金属イオン除去率は酵母種によって異なり、例えばトルラ酵母（3.0 kGy 照射）による妨害金属イオン除去率が Pd（II）イオンでは 98%、Zr（IV）イオン除去率では 95%、Mo（VI）イオンでは 35%であった。なお、模擬廃液中の他種金属イオン除去率は 3%以下と低レベルであったので、これらのデータは図 3.1-8 において記載を割愛した。

Ru/Rh 系模擬廃液（硝酸濃度 0.01 mol/L）を対象に、線量範囲 0~3.0 kGy の γ 線を照射した各種酵母によるガラス固化妨害金属イオン（Ru（III）、Rh（III））除去実験を行った。図 3.1-9 に示すように、 γ 線（1.0 kGy、3.0 kGy）を照射した各種酵母による妨害金属イオン（Ru（III）、Rh（III））除去率は、 γ 線非照射のパン酵母を用いる場合と同程度になり、コバルト 60 γ 線の照射（ \leq 3.0 kGy）の影響を受けないことが明らかになった。

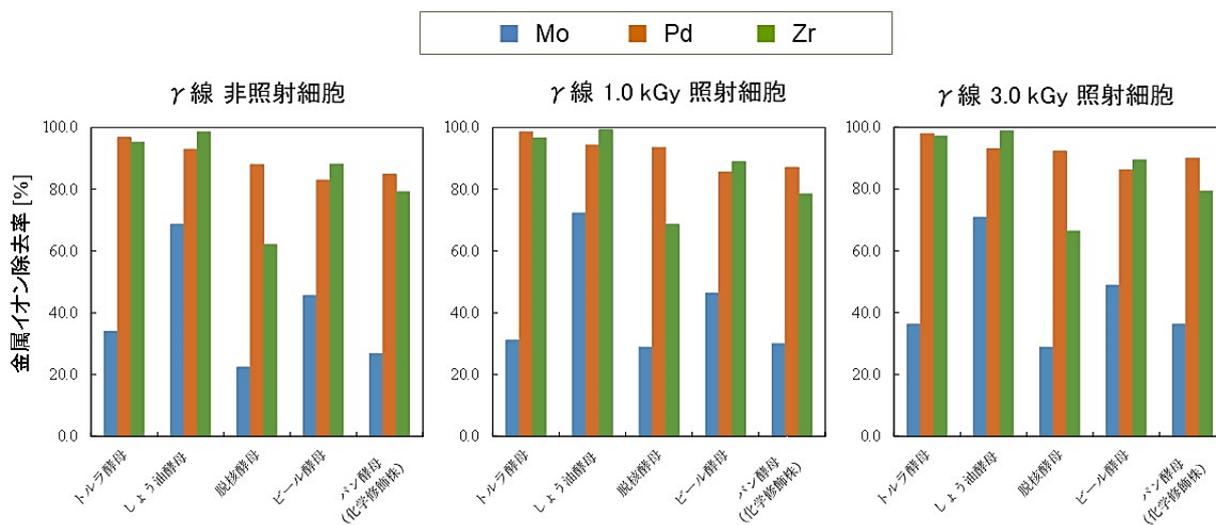


図 3.1-8 Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液（硝酸濃度 1.0 mol/L）からのガラス固化妨害金属イオン除去率に及ぼすγ線照射線量の影響（酵母添加量 18 g/L）

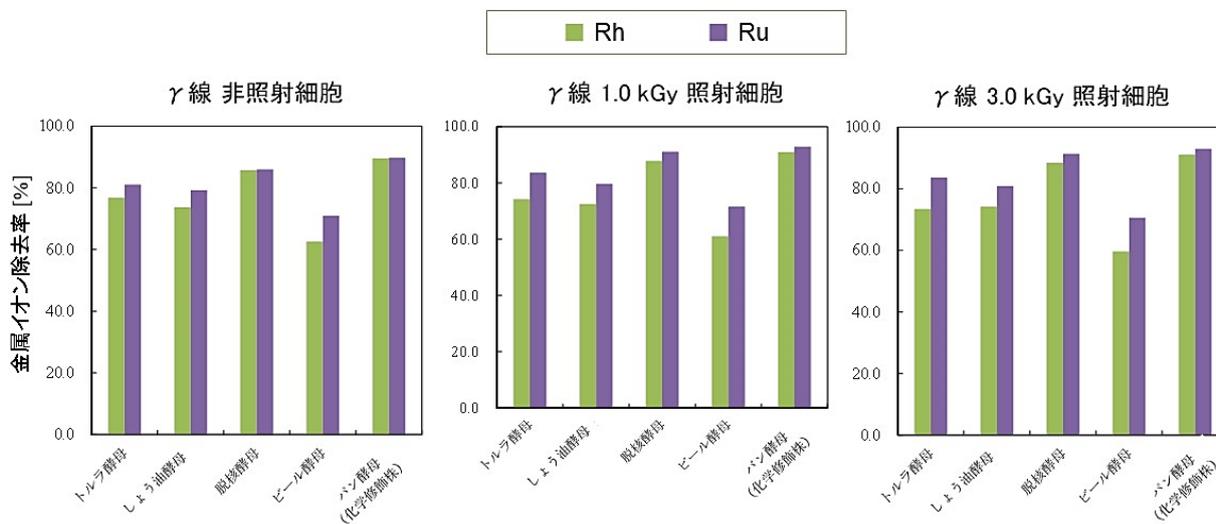


図 3.1-9 Ru/Rh 系模擬廃液（硝酸濃度 0.01 mol/L）からのガラス固化妨害金属イオン除去率に及ぼすγ線照射線量の影響（酵母添加量 18 g/L）

3.1.2 微生物の放射線抵抗性メカニズムに関する検討【R2-R3】

微生物は、その細胞の基本構造に応じて、原核生物と真核生物の二つのグループに分類できる。原核生物は、細胞内にむき出しの状態では染色体が散在しており、膜で包まれた細胞小器官を持たない。原核生物の代表例が細菌（バクテリア）である。一方の真核生物には、染色体が核膜で包まれた核および細胞小器官（ミトコンドリア、葉緑体、ゴルジ体、小胞体）が細胞内に存在する。単一の細胞で構成される単細胞生物（酵母など）だけでなく、細胞が寄り集まった多細胞生物（植物、動物）も真核生物に属する。

放射線が微生物に及ぼす悪影響は、主として照射後の生残率によって評価されている。微生物の放射線ダメージは、i)放射線が生細胞内の DNA 等を直接損傷する直接作用と、ii)生細胞内や培地中の水分子を放射線が励起することで発生する活性酸素種（主に OH ラジカル）による間接作用に起因する。したがって、微生物が放射線抵抗性を獲得するメカニズムとしては、直接作用による DNA 損傷の修復機能と、間接作用によって生じる活性酸素種に対する防御機能に大別される。

令和2年度には、代表的な原核生物である大腸菌、高い放射線抵抗性を示す細菌として知られている *Deinococcus radiodurans*（原核生物）、代表的な真核生物であるパン酵母に着目し、それぞれのDNA修復機能について文献調査した。また、活性酸素種に対する防御機能についても文献調査した。なお、*Thermococcus*属細菌が放射線抵抗性を獲得する機構に関する知見は、文献調査から得られなかった。

令和3年度には、前年度の研究成果を踏まえて、パン酵母細胞の生理状態に及ぼすγ線照射および硝酸酸性の影響を各種実験に基づいて検討することにより、苛酷な環境下（放射線照射、硝酸酸性）においてパン酵母がガラス固化妨害イオン分離機能を備える要因について考察した。

(1) DNA 損傷の修復機能に関する文献調査結果【R2】

生物は、地球上で自然に存在する放射性物質や宇宙から降り注ぐ放射線によって生じる生体分子の損傷や、通常の代謝の過程で生じる化学物質による生体分子の損傷、あるいは DNA 複製の誤り等が引き起こす遺伝情報への影響を減じるために、様々な DNA 修復機構を確立し進化してきた。

① 原核生物（大腸菌）

原核生物に分類される大腸菌における DNA 修復の代表的なメカニズムとして、DNA 鎖や塩基の異常を検知してその周辺を含む領域のオリゴヌクレオチドを切り出した後に、相補鎖合成とそれに続く鎖の結合によって修復する「ヌクレオチド除去修復」、異常な塩基を検知・除去した結果生じる脱塩基部位（AP 部位；apurinic/aprimidinic site）を切り出して修復する「塩基除去修復」が存在する。さらに、DNA 複製を介して修復がなされる「相同組換え修復」、「損傷乗り越え修復」、複製の誤りを修復する「ミスマッチ修復（ミスマッチの除去と相補鎖合成および鎖の結合）」、変異原を検知して発動する「誘導 SOS 修復」など、様々な修復機構が知られている。

低 LET 放射線による DNA 損傷の主なものは、i) ポリヌクレオチド鎖の切断および DNA 二重らせん構造の開裂、ii) 塩基の修飾や開環、iii) DNA 鎖とタンパク質との架橋などがある。DNA 二重らせんにおけるポリヌクレオチド鎖の切断は、一方の鎖のみに起こる場合（一本鎖切断）と、それぞれの鎖の切断が近傍に起こり DNA 鎖が分断される（二本鎖切断）場合がある。それぞれの

切断様式が生じる頻度の解析から、ひとつのラジカルの反応によって、一か所（一本鎖）のみが切断されることが示唆されている。一本鎖切断は、除去修復と同様に、相補鎖合成とその後の DNA リガーゼ（結合酵素）反応によって修復される。二本鎖切断は、大腸菌の場合、RecA タンパク質を中心とする相同組換えによって修復される。異常な修飾塩基や架橋による付加体の修復は、除去修復の機構を介して起こる。二本鎖 DNA の切断は、その完全な修復が困難であることから、細胞の致死性への影響が最も大きいと考えられている。

② 高放射線抵抗性微生物 *Deinococcus radiodurans*

高い放射線抵抗性を示す微生物の代表例として、*Deinococcus radiodurans*（原核生物）は古くから研究されてきた。*D. radiodurans* は、15 kGy の電離放射線照射によって生じる染色体あたり 100 か所以上の二重鎖切断を、RecA タンパク質の働きによって、生残率の低下や遺伝子変異なしに修復することができる [7, 8]。これは、一つの細胞内に複数コピー存在するゲノム DNA を相同組換えに活用しているものと思われる。*D. radiodurans* における RecA タンパク質の発現は DNA の損傷によって高まることが報告されている [9]。*D. radiodurans* の *recA* 遺伝子変異株は、その野生株に比べて極めて低い放射線抵抗性を示すが、それでも大腸菌（野生株）よりも高い放射線抵抗性を示した [10]。これは、RecA タンパク質が関与する相同組換えを介した二本鎖切断修復の他にも、放射線抵抗性に関与する因子が存在することを示唆する。なお、*D. radiodurans* は、高い放射線抵抗性の他に、乾燥にも強い性質を持つ。また、他の変異原に対する抵抗性も高く、変異原暴露後に生残した菌における DNA 変異は、通常の世代あたりの自発的（自然）置換率と変わらないことが知られている。このことから、修復後の変異をもたらしやすい誘導 SOS 修復系の寄与は小さいのではないかと考えられている [7]。また、紫外線で生じるピリミジンダイマーの光回復酵素系を持たないこと [11]、アルキル化剤による修飾がもたらす DNA 変異を抑制する機構を持たないことも報告されている [12]。

相同組換えとは別の二本鎖切断修復に関与する因子として、鳴海ら [13] は *D. radiodurans* の放射線感受性変異株の遺伝子解析によって、二本鎖 DNA 切断修復に重要な遺伝子 *pprA*（産物は PprA タンパク質）を同定した。*pprA* 遺伝子の発現は、DNA 損傷によって誘導され、DNA 損傷後に *recA* の発現を誘導する *pprI* 遺伝子を欠損する株においては、*pprA* 遺伝子の誘導も起こらなかった [14]。PprA タンパク質は、直鎖状 DNA と弛緩した（一本鎖切断部位を持つ）環状 DNA に結合し、i) 二重鎖切断末端から一方の DNA 鎖を 3' → 5' 方向に向かってかじり取るように働くエキソヌクレアーゼ III（結果として断端に一本鎖 DNA 突出末端をつくる）から二本鎖 DNA 切断末端を保護する効果を持つこと、および ii) 試験管内で DNA 末端を結合するリガーゼ反応を効率化することが示されている [13]。これらの研究結果は、RecA タンパク質の働きによる相同組換えを介した二重鎖切断修復とは別に、二重鎖切断末端同士を直接結合して修復する非相同末端結合の経路が存在することで、*D. radiodurans* の放射線抵抗性に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。ただし、原核生物における非相同末端結合の仕組みについては解明されていない。

その後、2019 年には、この PprA タンパク質の結晶構造が解明された [15]。すなわち、PprA タンパク質は、分子内に二か所の相互作用面を持ち、分子間でそれぞれ face-to-face に結合することで、繊維状構造を形成するホモ多量体を形成し、その繊維状構造は、8 量体で 1 回転する右

巻きらせん構造であることが示された。PprA タンパク質が持つ DNA 結合能に関与するアミノ酸残基は、らせん構造の内側に位置しており、DNA と結合した状態の結晶構造解析はなされていないものの、DNA は PprA タンパク質が作るらせん構造にはまり込むように結合するものと想像されている。このような性質が、DNA の切断末端の二重鎖構造を安定化し、末端結合（二重鎖切断の修復）の高い効率をもたらすのではないかと考察されている。

③ 真核生物（パン酵母）

真核細胞では、多くの因子が非相同末端結合による二本鎖切断部位の修復に関与する。ヒト培養細胞を用いた研究により、相同組換えおよび非相同末端結合のいずれの経路も、DNA の二重鎖切断修復経路として重要であることが示されている（例えば文献[16]を参照）。Bennet ら [17]は、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を対象に、非必須遺伝子の欠損変異株群を用いて遺伝情報の違いをゲノム全体にわたり調べることにより、 γ 線照射に対する抵抗性に関与する遺伝子の同定を試みた。その結果、放射線抵抗性関連遺伝子として、DNA 修復系において働くもの、細胞周期進行におけるチェックポイントで役割を果たすもの（損傷を残したまま細胞周期を進めない）などが同定された。それらの多くは、ヒトゲノムにも相同な遺伝子が存在し、その変異はヒト疾患にも関連するものがあつた。

(2) 活性酸素種に対する防御機能に関する文献調査結果【R2】

低 LET 放射線によって生成する活性酸素種（ラジカル）の悪影響を抑制することは、放射線抵抗性に寄与するものと思われる。その点では、細胞に内在する物質の役割が注目される。例えば、チオール基（-SH）を持つ化合物は、ラジカルスカベンジャー（フリーラジカルを補足する物質）として働き、放射線による間接効果から細胞成分を防護する。酵母に対しては、熱ショックによるトレハロース合成を誘導しておけば、その後の放射線暴露への抵抗性が高まることが見出されている [18]。また、カビ類が産するメラニン色素が、放射線抵抗性や極限環境での生育に関係していること [19、20]や、電離放射線のエネルギーを生体エネルギーとして獲得することに関与していること [21]が報告されている。

(3) パン酵母細胞の生理状態への放射線照射および硝酸酸性の影響【R3】

放射性廃液の苛酷な環境下（放射線照射、硝酸酸性）において、パン酵母のバイオ分離剤としてのガラス固化妨害金属イオン吸着能と細胞生理との関連を知ることは、高機能バイオ分離剤の開発において重要な基礎的知見となる。パン酵母細胞は、廃液中で高濃度の硝酸と放射線に暴露され、酵母細胞に損傷を受けると考えられる。このような苛酷な環境条件が酵母細胞の生理状態に及ぼす影響について各種実験を基に検討することにした。パン酵母の生理状態の指標としては、放射性廃液の環境下（硝酸処理またはコバルト 60 γ 線照射）における細胞生残率と、水溶性テトラゾリウム塩（WST-1）アッセイによる呼吸活性を採用した。なお、WST-1アッセイは、ミトコンドリア呼吸鎖複合体にあり、生細胞において活性を示すコハク酸-テトラゾリウム還元酵素（EC 1.3.99.1）の作用を評価するもので、細胞傷害性処理（硝酸処理、 γ 線照射）が細胞内タンパク質機能に及ぼす影響の指標とする。

供試菌株としては、パン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S288C 株を用いた。前培養として、

寒天平板培地で生育した *S. cerevisiae* S288C 株のコロニーを 2.0 mL のペプトン・酵母抽出物・デキストロース (YPD) 培地に接種し、30 °C で振とう培養した (前培養)。前培養液から 0.6 mL を分取し、60 mL の YPD 液体培地に植菌し、30 °C で振とう培養した (本培養)。本培養の期間が 16 h を「対数増殖期後期試料」、40 h を「初期定常期試料」、64 h を「定常期試料」とした。

① γ 線照射の影響

パン酵母の本培養終了後、遠心分離によって酵母菌体を集菌し、40 mL の滅菌蒸留水に懸濁後、再度遠心分離によって集菌し、25 mL の滅菌蒸留水に懸濁した (培地成分の除去)。それを 5 mL ずつ 5 本に分注し、それぞれ、未照射試料、1.0 kGy 照射試料、2.0 kGy 照射試料、3.0 kGy 照射試料、4.0 kGy 照射試料とした。 γ 線照射は、大阪府立大学放射線研究センター線源棟のコバルト 60 照射室において、一定の線量率 (3.8 kGy/h) の下、所定の積算線量に到達するまで照射した。未照射試料については、室温に静置した。培養終了から 2 h 経過 (この間に集菌、 γ 線照射の作業を完了) した後に、生残率測定と WST-1 アッセイを行った。

生残率の測定では、 γ 線照射後に段階希釈した菌懸濁液試料から、YPD 寒天培地に定量 (0.1 mL) を播種し、30 °C にて 48 h かけて保温した後に出現するコロニー数を計数して生残菌数とした。この γ 線照射試料の生残菌数を未照射試料の生残菌数で除した値を生残率とした。

WST-1 アッセイは、96 穴マイクロプレート上で、酵母細胞懸濁液 0.1 mL に対して、WST-1 反応溶液 0.01 mL を加え、37 °C で 1 h 経過後、450 nm および 620 nm の吸光度 (A450 および A620) を測定した。細胞懸濁液あたりの酵素活性を、A450 と A620 との差を A620 で除した値 $[(A450 - A620)/A620]$ によって評価した。生細胞中のミトコンドリア脱水素酵素によるテトラゾリウム塩の還元反応で生成するフォルマザン色素を A450 値で測定し、反応試料中の酵母細胞による吸収を A620 として標準化した。酵母細胞懸濁液の代わりに、蒸留水 0.1 mL に WST-1 反応溶液 0.01 mL を加えたものをブランク対照として用いた。なお、 γ 線照射実験には、定常期の酵母細胞を用いた。

定常期の酵母細胞試料に対する γ 線照射の効果を、放射線照射後の生残率測定と呼吸鎖複合体酵素活性を指標として行った。 γ 線照射後の生残率と照射線量との関係を図 3.1-10 に示す。 γ 線 1.0 kGy の照射によって生残率が 4% 未満、3.0 kGy の照射によって 1% 未満となった。これらの結果は、酵母に対する γ 線照射実験の先行研究の結果 [1, 2] と概ね一致した。

放射線照射による酵母細胞成分の損傷は、その後の増殖に対して負の効果を及ぼす。その一方で、食品に対する汚染菌の殺菌を目的とした放射線照射においては、放射線照射の結果生じる食品の分解性生成物は加熱調理と類似しており、特別な副生成物は見られないこともわかっている [3]。そこで、 γ 線照射後に残存する細胞機能について WST-1 アッセイによって評価した。WST-1 アッセイは、呼吸鎖複合体で生成するニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型 (NADH) を検出する。呼吸鎖複合体では、多くの化学反応を段階的に進めるために酵素が連携し働いている。生体分子の放射線損傷による機能喪失は、経験的に機能分子複合体のサイズに比例して起こることが指摘されている [4] ので、このような酵素複合体による反応産物を定量することは、細胞に残存する生理機能を見積もるのに適する一例であると考えた。

WST-1 アッセイによる細胞内酵素活性の評価結果を図 3.1-11 に示す。 γ 線照射試料の回収後を照射後 0 日目とした。 γ 線照射直後 (0 d) では、非照射~4.0 kGy 照射のいずれの試料において

も高い生理活性（WST-1 からフォルマザン色素への変換）が現れている。これは、 γ 線照射後も呼吸鎖複合体が関わる代謝経路が十分に働いており、細胞内に十分な NADH が存在したことによると思われる。 γ 線照射は、この反応に関与する酵素を含む代謝経路の酵素活性に対して、重大な損傷を与えなかったことを示唆している。しかしながら、1 日目以降では γ 線照射後の時間の経過に伴って、酵素活性は減少傾向を示した。なお、非照射の生菌（対照試料）においても活性の低下が認められるのは、酵母細胞が貧栄養条件（蒸留水に懸濁）におかれたことで、細胞質の状態が何らかの変化、例えば細胞内成分の流動性の変化[5]等を起こし、呼吸鎖複合体の活性が低下したのではないかと思われる。また、4.0 kGy 照射された試料（3 回の照射実験による平均値）において、2 日以降に 1.0~3.0 kGy 照射試料よりも高い活性を示した理由については現時点で未解明である。

② 硝酸酸性の影響

本培養したパン酵母細胞の所定量を硝酸水溶液（0.5~2.0 mol/L）に懸濁し、これら細胞懸濁液（細胞濃度 $5.9 \times 10^8 \sim 1.3 \times 10^9$ cells/mL）を 30 °C で振とう攪拌することによって硝酸処理を行った。振とう開始から 30 min 経過後、遠心分離によって集菌・洗浄したものを硝酸処理済み酵母細胞とし、この細胞試料に対して生残率の測定と WST-1 アッセイを行った。

硝酸処理後の懸濁液におけるパン酵母の生残数を YPD 寒天培地におけるコロニー形成能によって評価した。表 3.1-2 に示すように、0.5 mol/L 硝酸処理によって大半の酵母細胞は増殖不能となり、1.0 mol/L または 2.0 mol/L の硝酸処理によって酵母細胞のコロニー形成能は事実上消滅した。WST-1 アッセイによる酵素活性についても、0.5 mol/L~2.0 mol/L の硝酸処理によって著しく低下した（図 3.1-12）。酸性環境下における酵母細胞は、細胞質内の流動性が低下して休眠状態に移行することが報告されている[5、6]。今回の硝酸処理は、既往の文献[6]と比較して酸性化の度合いが極めて大きいため、細胞内成分の変性を含めた変化が起こり、コロニー形成能の消滅と酵素活性の消失が起こったものと考えられる。

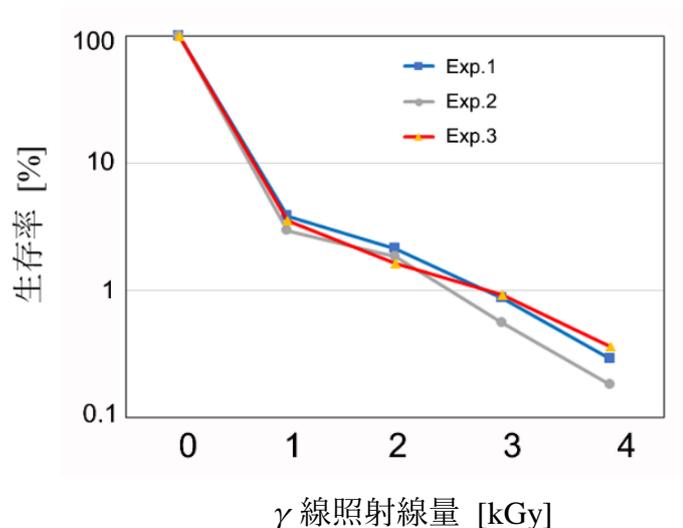


図 3.1-10 パン酵母の生残率に及ぼす γ 線照射の影響

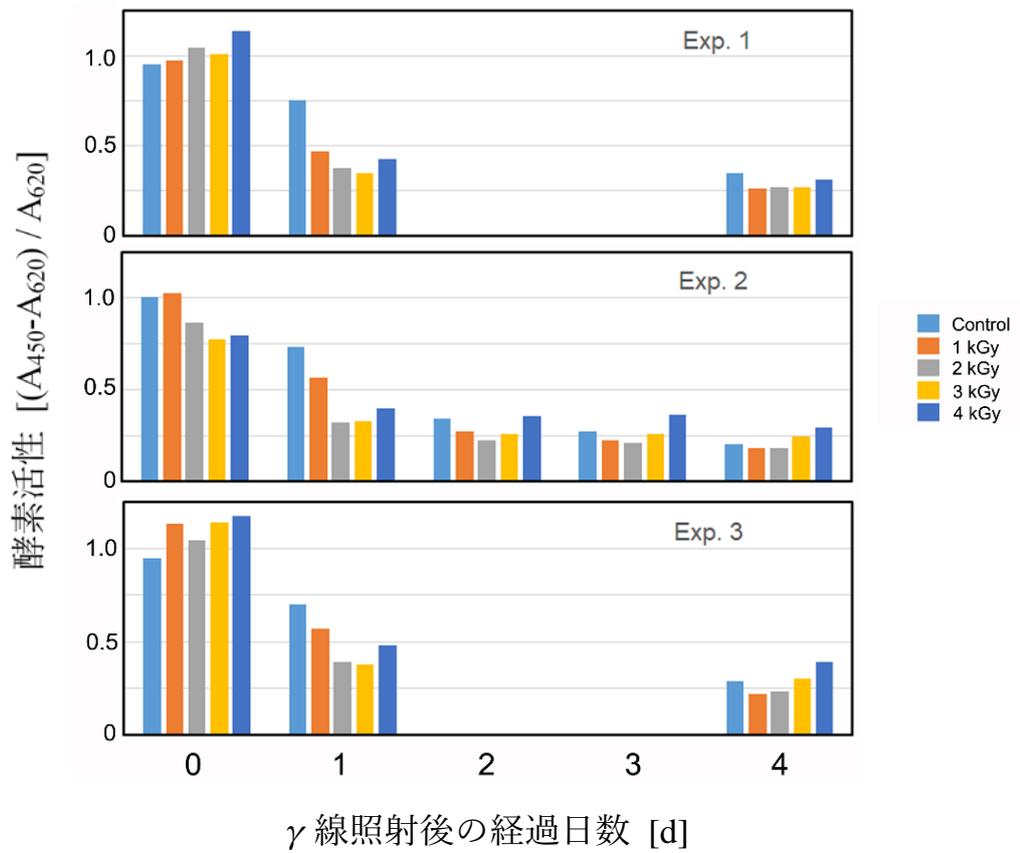


図 3.1-11 パン酵母の酵素活性に及ぼすγ線照射の影響

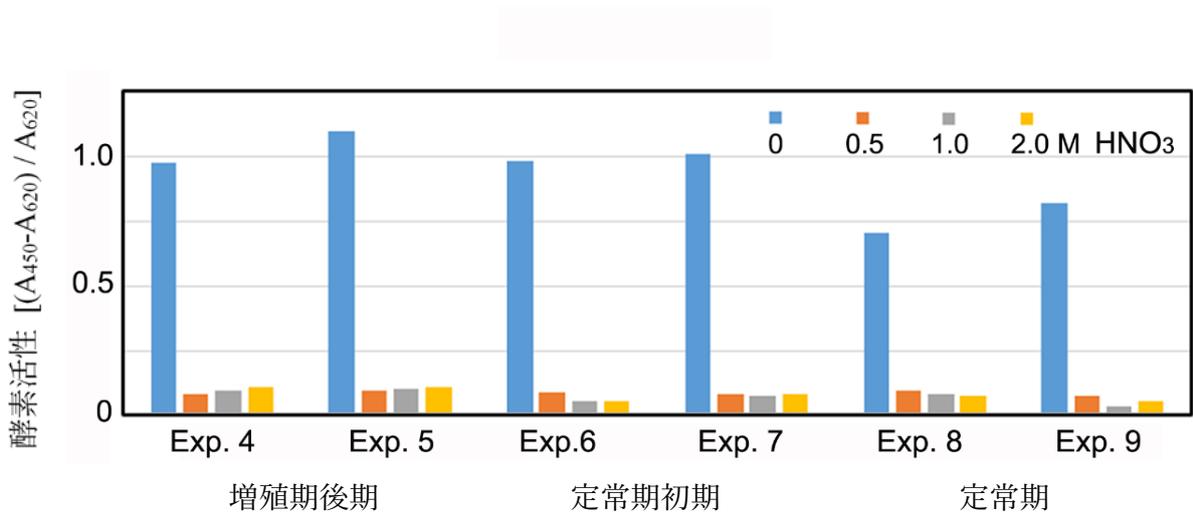


図 3.1-12 パン酵母の酵素活性に及ぼす硝酸処理の影響

表 3. 1-2 パン酵母生残数に及ぼす硝酸処理の影響

	細胞懸濁液 1ml 当たりのコロニー形成数 (CFU/mL)*					
	増殖期後期 (培養時間 16 h)		定常期初期 (培養時間 40 h)		定常期 (培養時間 64 h)	
	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8	Exp. 9
比較対照 (in H ₂ O)	5.9×10 ⁸	6.5×10 ⁸	1.2×10 ⁹	8.5×10 ⁸	1.3×10 ⁹	8.8×10 ⁸
硝酸処理 30 min						
0.5 mol/L	8.0×10	5.4×10 ³	1.9×10 ⁴	4.5×10 ²	2.1×10 ⁴	7.3×10 ⁴
1.0 mol/L	1.3×10	0	8.1×10 ²	0	3.8×10 ³	10>
2.0 mol/L	0	0	0	0	0	0

*) CFU : コロニー形成単位

(4) パン酵母の妨害金属イオン分離機能と生理状態との関係【R3】

上述の実験結果 ((1) パン酵母 (野生株) の妨害金属イオン分離機能への放射線照射の影響) から、パン酵母が備えるガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Mo (VI)、Ru (III)、Rh (III)) を分離除去する機能は、硝酸水溶液中におけるγ線照射 (硝酸濃度 ≤ 2.0 mol/L、線量 ≤ 3.0 kGy) による悪影響を受けないことが明らかになった。また、後述するように (3.3.1 参照)、γ線照射 (線量 ≤ 3.0 kGy) や硝酸暴露 (濃度 ≤ 2.0 mol/L) がパン酵母細胞表層の官能基に及ぼす影響は、FT-IR-ATR 分析によって認められないことも実験事実である。一方では、パン酵母の生理状態に関する各種実験によって、γ線照射ならびに硝酸処理によって酵母細胞の生残率が著しく低下するとともに、酵母細胞の酵素活性もγ線照射や硝酸処理によって低下することを見出した。

放射線照射による微生物の損傷は、確率的に、「機能単位の構造」が大きいほど影響を受けやすいことが指摘されている[4]。したがって、上述の実験結果 ((3) パン酵母の細胞生理状態への放射線照射および硝酸酸性の影響) から明らかになったように、長大な高分子である DNA の損傷に起因する生残率の低下は、放射線照射によって顕著に起こることになる。また、酵母細胞内には多分子が存在しており、比較的サイズの大きい酵素も放射線照射によって棄損される。しかしながら、ガラス固化妨害金属イオンの吸着分離に必要な機能構造は、細胞表層構造に存在する“小さな領域 (たんぱく質を構成するアミノ酸やカルボン酸の官能基)”が働いている。この“小さな領域”は放射線照射による悪影響は確率的に受け難いことになり、これは後述の FT-IR-ATR 分析の結果 (3.3.1) とも一致する。このようにガラス固化妨害金属イオン吸着分離に作用する機能構造が“小さな領域”であることが、パン酵母が放射線抵抗性ととも妨害金属イオン分離機能を備える要因と考えられる。

本事業の目標は、放射性廃液の環境下に置かれた酵母細胞のガラス固化妨害金属イオン分離機

能を活用し、従来法の問題点を払拭できるような斬新な妨害金属イオン除去法を研究開発することである。バイオ分離除去剤となる酵母細胞を放射線 (≤ 3.0 kGy γ 線) や硝酸酸性 (≤ 2.0 mol/L) に暴露する実験では、生残率や酵素活性は大きく低下されていたが、一方では妨害金属イオン分離機能には大きな変化は認められなかった。したがって、本事業の目標を達成するにあたっては、バイオ分離除去剤となる酵母細胞が放射線照射後に増殖可能かどうか等の生理状態 (DNA 損傷が修復されなかったり、修復過程で致死の変異が生じたりするか) についてはあまり問題ではない。すなわち、酵母細胞に対して、効率的で正確な DNA 修復系を備える放射線抵抗性メカニズムを探求する微生物学的アプローチは本事業では重要ではないと考える。それよりも本事業においては、酵母細胞が備える妨害金属イオンの分離機能が、放射線や硝酸酸性にどのように影響されるのかを明らかにしたうえで、酵母細胞による妨害金属イオン除去効率を向上させる方を論じる分離工学的アプローチに重点を置くことが肝要であるとの認識に至った。

参考文献

- [1] Stepanenko, I.Y. *et al.* Protection of *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative and radiation-caused damage by alkylhydroxybenzenes. *Microbiology* 73, 163-169 (2004).
- [2] Nishimoto, T. *et al.* Important role of catalase in the cellular response of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ionizing radiation. *Curr. Microbiol.* 70, 404-407 (2015).
- [3] (一財)放射線利用振興協会「世界保健機関による 10kGy 以上の高線量照射食品の健全性に関する公式見解」放射線利用技術データベース データ番号 020211.
<http://www.rada.or.jp/database/home4/normal/ht-docs/member/synopsis/020211.html>
(2021).
- [4] Kepner, G.R. & Macey, R.I. Membrane enzyme systems. Molecular size determinations by radiation inactivation. *Biochim. Biophys. Acta* 163, 188-203 (1968).
- [5] Joyner, R. P. *et al.* A glucose-starvation response regulates the diffusion of macromolecules. *eLIFE* 5, e09376 (2016).
- [6] Munder, M.C. *et al.* A pH-driven transition of the cytoplasm from a fluid- to a solid-like state promotes entry into dormancy. *eLIFE* 5. e09347 (2016).
- [7] Daly, M. J., Ouyang, L., Fuchs, P. & Minton, K. W. In vivo damage and recA-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* 176, 3508-3517 (1994).
- [8] Minton, K. W. DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* 13, 9-15 (1994).
- [9] Carroll, J. D., Daly, M. J. & Minton, K. W. Expression of recA in *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* 178, 130-135 (1996).
- [10] Minton, K. W. Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant

- bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutant. Res.* 363, 1-7 (1996).
- [11] Moseley, B. E. & Evans, D. M. Isolation and properties of strains of *Micrococcus (Deinococcus) radiodurans* unable to excise ultraviolet light induced pyrimidine dimers from DNA: evidence for two excision pathways. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2437-2445 (1983).
- [12] Rebeyrotte, N. Induction of mutation in *Micrococcus radiodurans* by N-methyl-N9-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mutat. Res.* 108, 57-66 (1983).
- [13] Narumi, I., Satoh, K., Cui, S., Funayama, T., Kitayama, S. & Watanabe, H. PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation. *Mol. Microbiol.* 54, 278-285 (2004).
- [14] Hua, Y., Narumi, I., Gao, G., Tian, B., Satoh, K., Kitayama, S. & Shen, B. PprI: a general switch responsible for extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 354-360 (2003).
- [15] Adachi, M., Shimizu, R., Shibasaki, C., Satoh, K., Fujiwara, S., Arai, S., Narumi, I. & Kuroki, R. Extended structure of pleiotropic DNA repair - promoting protein PprA from *Deinococcus radiodurans*. *FASEB J.* 33, 3647-3658 (2019).
- [16] 黒沢綾, 足立典隆. ヒト細胞における DNA 二本鎖切断の修復. *Isotope News* 721, 8-14 (2014).
- [17] Bennet, C.B., Lewis, L.K., Karthikeyan, G., Lobachev, K.S., Jin, Y.H., Sterling, J.F., Snipe, J.R. & Resnick, M.A. Genes required for ionizing radiation resistance in yeast. *Nature Genetics* 29, 426-434 (2001).
- [18] 西本琢登. 酵母の放射線曝露による細胞内酸化応答に対する抗酸化因子の機能. 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科博士学位論文. <http://doi.org/10.24729/00000620> (2015).
- [19] Dighton, J., Tugay, T. & Zhdanova, N. Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 109-120 (2008).
- [20] Dadachova, E. & Casadevall, A. Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 525-531 (2008).
- [21] Dadachova, E., Bryan, R.A., Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, A.D., Aisen, P., Nosanchuk, J.D. & Casadevall, A. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS ONE* 2, e457 (2007).

3.2 ガラス固化妨害成分を含むバイオ分離剤の脱水・減容化方法の確立

3.2.1 機械的脱水による減容効果の検討【R2】

ガラス固化妨害金属イオンのバイオ分離剤であるパン酵母の細胞懸濁液の濾過・脱水実験を行い、酵母細胞の減容化効果を評価した。パン酵母としては、市販の乾燥酵母（オリエンタル酵母（株））を使用した。

濾過・脱水実験に用いる酵母懸濁液は、1 L の純水に対して 18 g の乾燥パン酵母を添加し、十分に攪拌して調製したものである。このパン酵母懸濁液の細胞濃度（18 g/L）は 5.0×10^{14} cells/m³ に相当し、妨害金属イオン分離除去実験における代表的な細胞濃度である。

パン酵母は、その細胞径が 3~10 μm 程度の微小粒子であるうえに、細胞密度が溶液と同程度であることから、重力場での沈降速度は非常に遅くなる。したがって、妨害金属イオン分離除去後の酵母細胞を処理廃液から分離・回収するためには、精密濾過、遠心分離などの固液分離操作が必要になる。

まず精密濾材（通気度 80 cm³/cm²/min のフィルター）を用いて、パン酵母懸濁液（18 g/L 酵母、温度 16 °C）の濾過・脱水実験を行った。ただし、操作時間の短縮を図るために、重力場ではなく、600 G の遠心場における濾過実験とした。酵母細胞径（3~10 μm 程度）よりも小さい孔径の濾材を用いて濾過実験を行ったが場合でも、液中の酵母細胞が変形するために、濾材上に酵母堆積層が形成されるまでは酵母細胞が濾液に漏れ出した。さらに、濾材上に堆積する酵母堆積層の通液性が悪く、厚み 5 mm の酵母層が濾材に付着した場合には脱水操作に長時間（100 min）を要することがわかった。以上の濾過実験データから、精密濾過はパン酵母のような微生物の固液分離には適していないことが判明した。

次に、酵母細胞の固液分離方式として遠心沈降法に着目した。液中に懸濁する酵母細胞の沈降特性を把握するために、50 mL のパン酵母懸濁液（18 g/L 酵母、温度 16 °C）を透明遠沈管に仕込み、バケット型遠心分離機を用いて固液分離実験を行った。図 3.2-1 に示すように、遠心効果 600 G において 10 min の遠心分離操作を行うことにより、液中の酵母細胞が遠沈管底部に堆積し、濁りのない透明な分離液が得られることがわかった。遠沈管の堆積物（酵母細胞と細胞間に存在する間隙水）は、容量が 3 mL、含水率が 73 wt% であった。したがって、パン酵母懸濁液（18 g/L 酵母）は、比較的弱い遠心場（600 G）における短時間（10 min）の遠心分離操作により、その体積が 3/50 に減少したクリーム状態（含水率 73 wt% の酵母細胞）として減容化回収できることが明らかになった（図 3.2-2）。

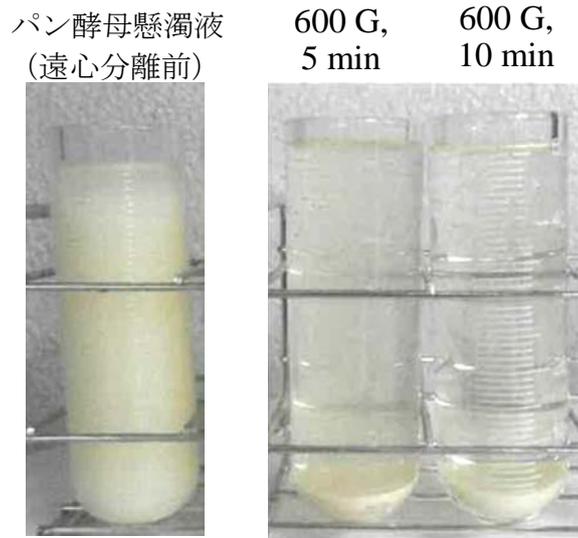


図 3.2-1 パン酵母懸濁液 (18 g/L 酵母) の遠心分離



図 3.2-2 遠心分離操作 (600 G、10 min) により回収された酵母細胞 (含水率 73 wt%)

3.2.2 乾燥・焼成によるパン酵母細胞の減容効果の検討【R2-R3】

ガラス固化妨害成分を含むバイオ分離剤 (パン酵母等) を濾過・脱水した後、湿潤状態のバイオ分離剤を乾燥・焼成処理することによって大幅に減容化できる。

令和 2 年度には、ガラス固化妨害成分を含むパン酵母に対して示差熱・熱重量分析を行い、操作温度と細胞質量減少との関係を明らかにした。また、焼成後のパン酵母が含有する無機灰分の定量分析を行い、焼成による減容効果を評価した。

令和 3 年度には、前年度の示差熱・熱重量分析データに基づいて、ガラス固化妨害成分を含むパン酵母 (湿潤細胞) の乾燥条件を検討した。また、パン酵母とは異なるバイオ分離剤としてトルラ酵母に着目し、ガラス固化妨害成分を含むトルラ酵母に対して示差熱・熱重量分析を行い、乾燥・焼成過程における操作温度と細胞減量化率との関係を明らかにするとともに、トルラ酵母の焼成後に残渣となる無機灰分量を把握した。なお、トルラ酵母としては、市販の乾燥酵母 (三輪製菓 (株)) を使用した。

(1) ガラス固化妨害成分を含むパン酵母に対する示差熱・熱重量分析【R2】

Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液 (上掲の表 3.1-1、硝酸濃度 2.0 mol/L) を対象に、パン酵母

による分離除去実験を細胞濃度 18 g/L、バッチ操作時間 120 min の条件下で行った。この分離除去実験の結果、Pd (II) イオン除去率は 64%、Zr (IV) イオン除去率は 45%となり、その他の金属イオン除去率は4%以下であった。パン酵母に分離・回収された金属量は、乾燥酵母の単位質量あたりに換算すると、Pd は 21.3 mg/g-dry cells (Pd 含有率 2.13%)、Zr は 12.8 mg/g-dry cells (Zr 含有率 1.28%) になる。

次の操作として、バイオ除去実験後に模擬廃液中のパン酵母細胞を遠心沈降法によって固液分離し、純水による酵母細胞の洗浄・遠心分離による集菌操作を 3 回繰り返した。この湿潤パン酵母を恒温乾燥器内に静置して 50 °C、24 h の条件下で乾燥させ、得られた乾燥細胞を廃液処理後パン酵母として熱分析に供した。熱分析には、示差熱・熱重量 (TG/DTA) 同時測定装置 (島津製作所製、DTG-60) を用いた。熱分析条件は、空気雰囲気下において昇温速度 5 °C/min、温度範囲は室温~1,000 °C である。

廃液処理後パン酵母および市販パン酵母に対する示差熱・熱重量分析の結果を図 3.2-3 に示す。両方のパン酵母試料ともに 40~60 °C 付近において、示差熱データにおいて顕著な吸熱ピークが出現するとともに、減量化率データにおいて5%程度の質量減少が認められることから、酵母細胞からの水の蒸発現象を確認できる。市販パン酵母の場合には、300 °C および 550 °C 付近に発熱ピークが認められ、600 °C 以上では質量変化は起こらないことがわかった。焼成による市販パン酵母の減量化率は 97%であり、無機灰分量は初期質量の 3%に相当する。一方、廃液処理後パン酵母 (Pd、Zr を含む乾燥細胞) では、300~450 °C 付近に顕著な発熱ピークが出現し、500 °C 以上の温度域では質量変化は認められなかった。焼成による廃液処理後パン酵母の減量化率は 94%、無機灰分量は初期質量の 6%に相当することがわかった。

廃液処理後パン酵母の熱分析を 1,000 °C で終了後、得られた固形残留物に対して王水による溶解処理を行い、その溶解液中の金属濃度を ICP 定量分析法によって測定した。その分析結果から、1,000 °C 焼成後に得られた固形残渣の Pd 含有率は 43%であることがわかった。なお、王水溶解液中には微量の Zr だけしか検出できなかったことから、固形残留物中の大部分の Zr が王水には溶解しなかったと推測される。

(2) ガラス固化妨害成分を含むバイオ分離剤 (パン酵母、トルラ酵母) の乾燥・焼成【R3】

前年度の示差熱・熱重量分析データに基づいて、乾燥温度 50 °C の一定条件下でガラス固化妨害成分を含むパン酵母 (湿潤細胞) の乾燥特性 (湿潤細胞質量の経時変化) を測定した。具体的には、模擬廃液液中のパン酵母細胞を遠心沈降法によって固液分離し (3,000 G、10 min)、酵母細胞に対して純水による洗浄を行った。その後、酵母細胞の遠心分離と純水による洗浄を 2 回繰り返した。このように調製した湿潤パン酵母の所定量を 50 °C に設定した恒温乾燥器内に静置し、パン酵母の質量変化を測定した。また、トルラ酵母についてもパン酵母と同様に乾燥・焼成実験を行った。

図 3.2-4 に、湿潤細胞 (パン酵母、トルラ酵母) の質量および減量化率 (任意時間までに減少した質量/初期質量) の経時変化を示す。湿潤パン酵母の質量は、乾燥時間の経過に伴って直線的に減少し、24 h 後には減量化率は 66% (初期質量の 34%) になることがわかる。乾燥時間が 24 h 以降では質量変化は小さくなり、乾燥時間が 30 h 以降では減量化率は 71% (初期質量の 29%) の一定値を示すことが明らかになった。また、湿潤トルラ酵母の場合には、乾燥時間が 48 h 以

降で質量が一定となり、減量化率は 83%（初期質量の 17%）になった。湿潤細胞の質量はトルラ酵母が 1.06 g、パン酵母が 0.69 g であったが、乾燥処理後ではトルラ酵母が 0.18 g、パン酵母が 0.20 g となって両者の質量がほぼ一致した。したがって、乾燥処理に供した湿潤細胞の含水率はパン酵母に比べてトルラ酵母の方が高く、そのために乾燥時間が 30 h から 48 h と長くなったと考えられる。

図 3.2-5 は、トルラ酵母とパン酵母に対する示差熱・熱重量分析データを比較したものである。模擬廃液処理後の酵母試料に関しては、トルラ酵母とパン酵母とでは同様の示差熱データが得られた。焼成による廃液処理後トルラ酵母の減量化率は 93%、無機灰分量は初期質量の 7%に相当することがわかった。

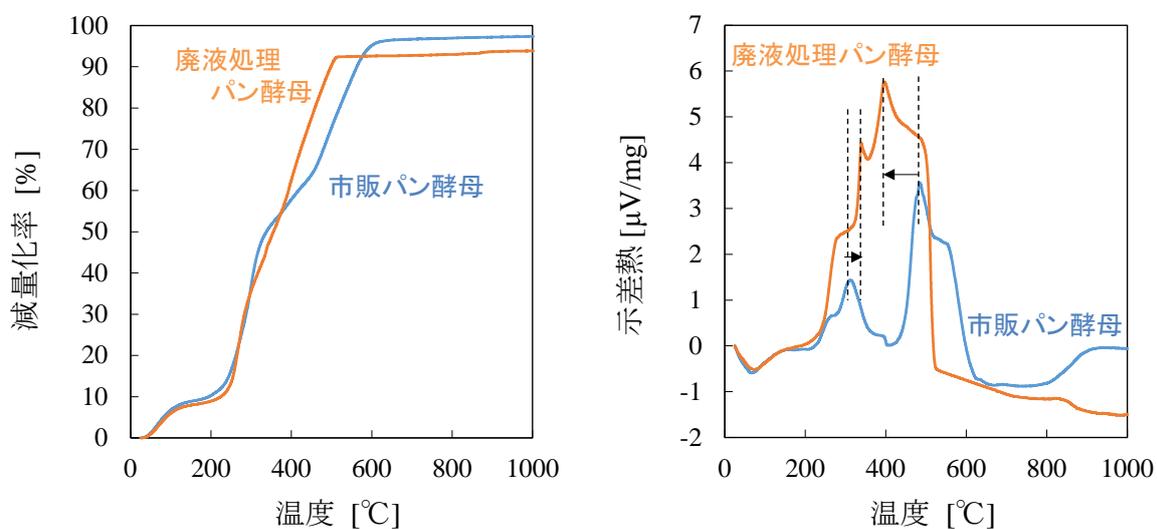


図 3.2-3 パン酵母の示差熱・熱重量分析データ

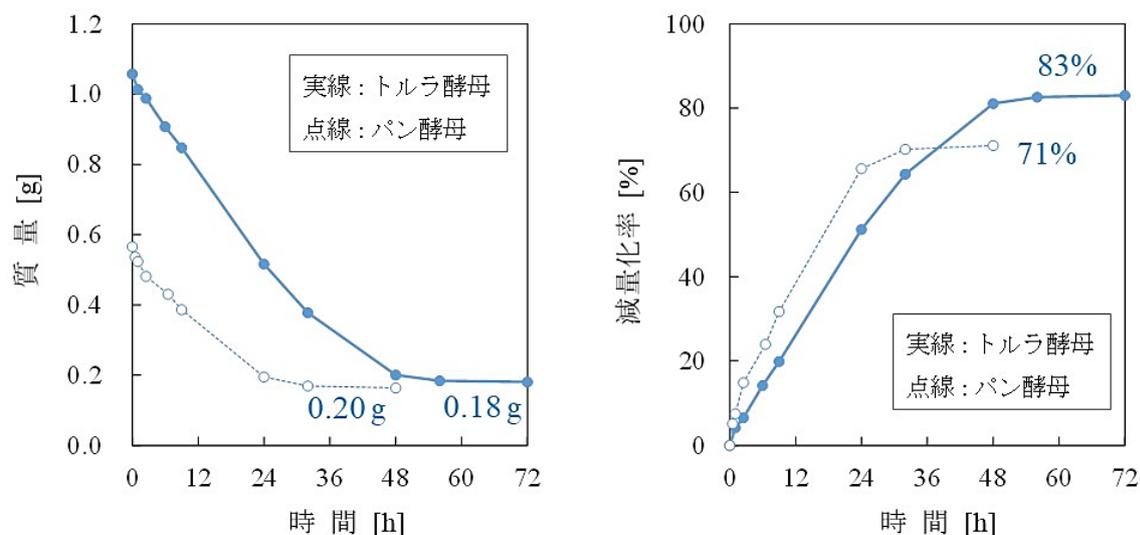


図 3.2-4 湿潤細胞（パン酵母、トルラ酵母）の乾燥処理(50 °C)における質量および減量化率の経時変化

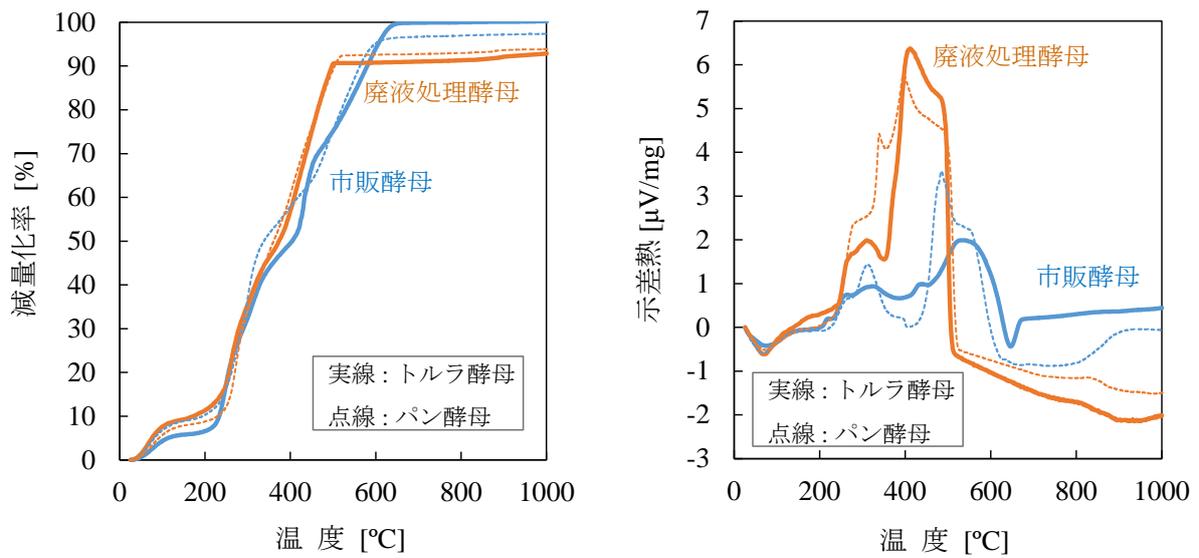


図 3.2-5 トルラ酵母とパン酵母に対する示差熱・熱重量分析データの比較

以上の乾燥・焼成実験データから、パン酵母 (Pd、Zr を含む湿潤細胞) については、乾燥処理 (50 °C、30 h) によって初期質量の 29%、この乾燥細胞に対する焼成処理 (500 °C 付近) によって初期質量 (湿潤細胞) の 1.7%にまで減量できることがわかった。また、トルラ酵母 (Pd、Zr を含む湿潤細胞) については、パン酵母 (Pd、Zr を含む湿潤細胞) の場合に比べて含水率が高いが、乾燥処理 (50 °C、30 h) によって初期質量の 17%、乾燥細胞の焼成処理 (500 °C 付近) によって初期質量 (湿潤細胞) の 1.2%にまで減量することができた。

3.3 バイオ分離剤の細胞表層の化学修飾による金属イオン選択性の発現

3.3.1 FT-IR-ATR 分析によるパン酵母細胞表層の官能基の同定【R2】

バイオ分離剤であるパン酵母によるガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Mo (VI)) 吸着に寄与する官能基 (細胞表層) を同定するため、各種のパン酵母試料 (乾燥細胞) に対して FT-IR-ATR (フーリエ変換 - 赤外 - 減衰全反射) 分析を行った。測定装置は、TENSOR II (Bruker 社製 FT-IR)/一回反射 ATR 用アタッチメント (Thunder Dome TM, Spectra-Tech 社製) である。

測定試料は、次の 6 種類のパン酵母であり、市販の乾燥パン酵母 (オリエンタル酵母工業 (株)) を用いて調製したものである。

試料 I : 乾燥細胞を純水に懸濁させて 4 h 後、集菌・洗浄・乾燥

試料 II : 乾燥酵母を純水に懸濁させて線量 3.0 kGy の γ 線照射した後、集菌・洗浄・乾燥

試料 III : 乾燥酵母を 2.0 mol/L 硝酸水溶液に懸濁させて 4 h 後、集菌・洗浄・乾燥

試料 IV : 乾燥細胞を 5 mmol/L Pd(NO₃)₂ 水溶液 (硝酸濃度 2.0 mol/L) に懸濁させて 4 h 後、Pd (II) イオン吸着細胞を集菌・洗浄・乾燥

試料 V : 乾燥細胞を 5 mmol/L (NH₄)₆Mo₇O₂ 水溶液 (硝酸濃度 2.0 mol/L) に懸濁させて 4 h 後、Mo (VI) イオン吸着細胞を集菌・洗浄・乾燥

試料 VI : 乾燥酵母を 5 mmol/L Pd(NO₃)₂/5 mmol/L (NH₄)₆Mo₇O₂ 水溶液 5 mmol/L に懸濁させて 4 h 後、Pd (II) /Mo (VI) イオン吸着細胞を集菌・洗浄・乾燥

上記の試料 I ~ 試料 VI におけるパン酵母細胞を遠心分離 (10 min, 10,000 rpm) により集菌し、これを超純水で洗浄し、再び遠心分離 (10 min, 10,000 rpm) により集菌した。この洗浄・集菌操作を 2 回繰り返した後、湿潤細胞を真空デシケータ内で 24 h かけて乾燥させた酵母細胞試料に対して FT-IR-ATR 分析を行った。

(1) γ 線照射の影響

図 3.3-1 に γ 線非照射パン酵母 (試料 I) に対する FT-IR-ATR 分析結果を、また表 3.3-1 にパン酵母から検出された主な吸収帯の帰属を示す。検出された吸収帯は、主に酵母細胞における糖鎖およびタンパク質に起因すると考えられる。

また図 3.3-1 は、 γ 線非照射パン酵母 (試料 I) と積算線量 3.0 kGy の γ 線照射パン酵母 (試料 II) に対する FT-IR-ATR 吸収スペクトルを比較したものであり、酵母表層の官能基に及ぼす γ 線照射の影響を表すものである。 γ 線非照射試料 I および照射を受けた試料 II は、同様の吸収スペクトルを示しており、パン酵母細胞が線量 3.0 kGy の γ 線照射を受けても細胞表層の官能基は影響を受けないことが明らかになった。 γ 線非照射のパン酵母は酸性溶液中の Pd (II) イオンを分離除去する機能を備えていることが報告されており [1]、放射線環境下においてもパン酵母を Pd (II) イオン等分離剤として応用できる可能性が FT-IR-ATR 分析結果から示唆された。

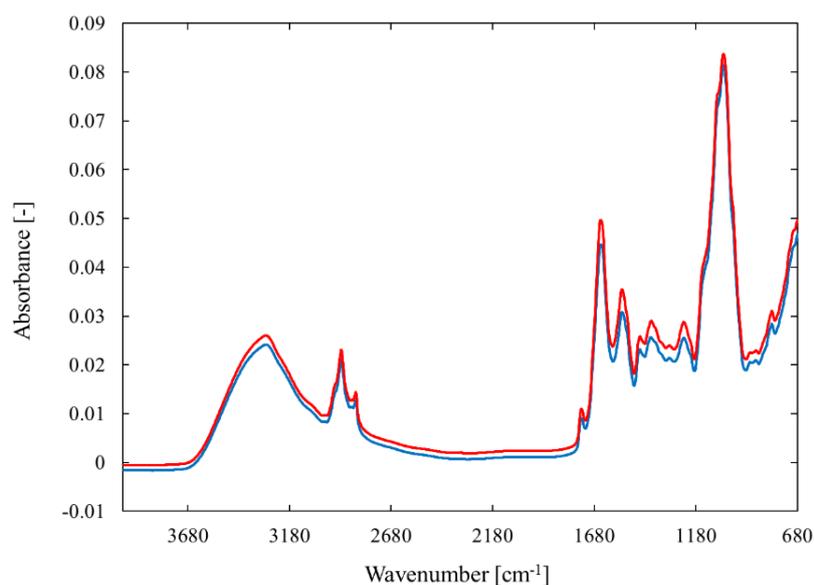


図 3.3-1 γ 線非照射パン酵母（試料Ⅰ）および γ 線照射パン酵母（試料Ⅱ）に対する FT-IR-ATR 吸収スペクトル（青：非照射試料Ⅰ、赤：3.0 kGy 照射試料Ⅱ）

表 3.3-1 γ 線非照射パン酵母（試料Ⅰ）の FT-IR-ATR 分析における主な吸収帯

吸収帯	官能基
3600-3000 cm^{-1} 付近	NH および OH 伸縮振動
2925 cm^{-1} , 2855 cm^{-1} 付近	CH 伸縮振動
1740 cm^{-1} 付近	C=O 伸縮振動（エステル、アミノ酸）
1645 cm^{-1} 付近	C=O 伸縮振動（アミドⅠ）および NH_3^+ 変角振動（アミノ酸）
1535 cm^{-1} 付近	NH 変角振動および C-N 伸縮振動（アミドⅡ）
1455 cm^{-1} 付近	NH_3^+ 変角振動（アミノ酸）および CH 変角振動
1370 cm^{-1} 付近	C-N 伸縮振動および NH 変角振動（アミドⅢ）
1245-1205 cm^{-1} 付近	P=O および P-O 伸縮振動
1045 cm^{-1} 付近	C-O 伸縮振動（アルコール、エーテル）
895 cm^{-1} 付近	C-H 変角振動あるいは環振動（ピラノース環）
890 cm^{-1} 付近	C-O 伸縮振動（アルコール）

(2) 硝酸の影響

高レベル放射性廃液は硝酸水溶液であることから、2.0 mol/L 硝酸水溶液に暴露させたパン酵母（試料Ⅲ）ならびに対照試料（試料Ⅰ）に対して FT-IR-ATR 分析を行った結果を図 3.3-2 に示す。硝酸処理による吸収スペクトルの変化として、以下の傾向が認められた。

- ① 3400 cm^{-1} (OH 伸縮振動) 付近の増加
- ② 3295 cm^{-1} (アミノ酸の OH 伸縮振動) の吸収強度の減少
- ③ 1740 cm^{-1} (C=O 伸縮振動) 付近の吸収強度の減少
- ④ 1650 cm^{-1} (NH 変角振動および C=O 伸縮振動) の吸収強度の減少および 1630 cm^{-1} (C=O 伸縮振動) 付近への変化
- ⑤ 1545 cm^{-1} 付近 (NH 変角振動、C-N 伸縮振動およびカルボン酸塩) の吸収強度の減少および 1535 cm^{-1} 付近へのシフト
- ⑥ 1455 cm^{-1} (NH および CH 変角振動) の吸収強度の減少
- ⑦ 1400 cm^{-1} (C-N 伸縮振動、NH 変角振動およびカルボン酸塩) の吸収強度の減少および 1370 cm^{-1} 付近への変化
- ⑧ 1240 cm^{-1} (P=O および P-O 伸縮振動) 付近の吸収強度の減少
- ⑨ 990 cm^{-1} (P-O 伸縮振動) 付近の吸収強度の減少

上記のピークシフトや吸収強度の減少から、パン酵母細胞を硝酸水溶液に暴露させた影響としては脂質やアミノ酸の減少が考えられるが、その影響が顕著に現れていない。

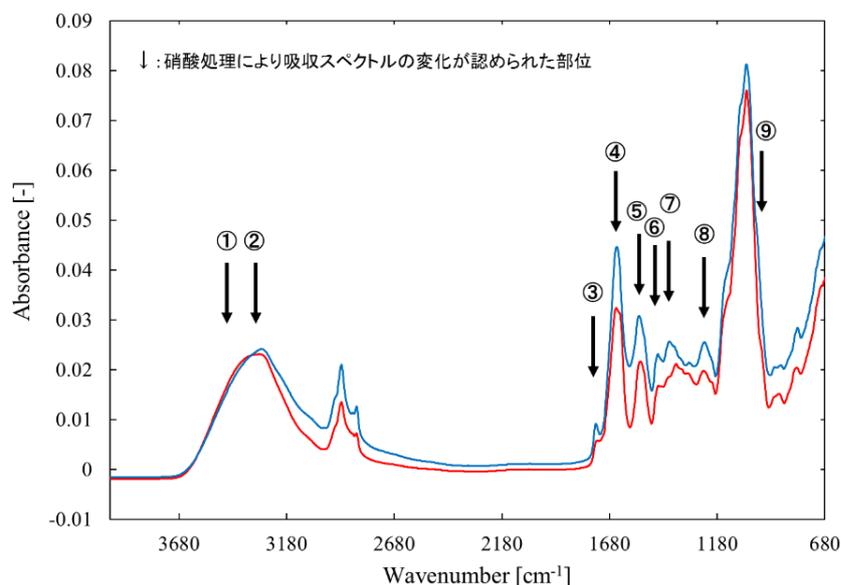


図 3.3-2 硝酸水溶液に暴露したパン酵母（試料Ⅲ）および超純水に暴露したパン酵母（試料Ⅰ）に対する FT-IR-ATR 吸収スペクトル（青：対照試料Ⅰ、赤：硝酸暴露試料Ⅲ）

(3) Pd (II) イオンおよび Mo (VI) イオン分離除去に関する官能基

Pd (II) イオン、Mo (VI) イオンの分離除去に寄与する酵母細胞表層の官能基を同定するために、上述の酵母試料Ⅲ～酵母試料Ⅵに対する FT-IR-ATR 吸収スペクトルを比較した結果を図 3.3-3 に示す。とくに、図 3.3-3(a) に描いた FT-IR-ATR 吸収スペクトルの波数領域を、 $1,700\sim 1,450\text{ cm}^{-1}$ に限定したスペクトルを図 3.3-3(b)、 $1,000\sim 800\text{ cm}^{-1}$ に限定したスペクトルを図 3.3-3(c) にそれぞれ示す。

酵母試料Ⅲ～酵母試料Ⅵのうちで、Pd (II) イオンを吸着した酵母細胞（試料Ⅳ、試料Ⅵ）のみに認められた吸収スペクトル変化は(i)～(iii)である（図 3.3-3(a)、(b)）。また、Mo (VI) イオンを吸着した酵母細胞（試料Ⅴ、試料Ⅵ）だけに認められた吸収スペクトル変化は(iv)である（図 3.3-3(c)）。

- (i) 3311 cm^{-1} (NH および OH 伸縮振動) ピークの $3300\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ への広がり (ブロード化)
- (ii) 1630 cm^{-1} (C=O 伸縮振動) ピークの 1650 cm^{-1} 付近への変化 (シフト)
- (iii) 1535 cm^{-1} (NH 変角振動および C-N 伸縮振動) ピークの 1516 cm^{-1} 付近への変化 (シフト)
- (iv) 906 cm^{-1} 付近において新たな吸収スペクトルの出現

このように、Pd (II) イオンを吸着した酵母細胞と Mo (VI) イオンを吸着した酵母細胞とでは吸収スペクトルの変化位置が完全に異なることが明らかになった。したがって、パン酵母によるガラス固化妨害金属イオンの分離除去において、Pd (II) イオン吸着に寄与する官能基と Mo (VI) イオン吸着に寄与する官能基が異なることが示唆された。

Pd (II) イオン吸着に起因する吸収スペクトルの変化は、具体的には(i)はカルボキシル基、(ii)はカルボン酸、(iii)はアミドに由来する吸収スペクトルの変化である。したがって、硝酸水溶液において $[\text{Pd}(\text{NO}_3)_4]^{2-}$ 錯体[2]として存在する Pd (II) イオンは、パン酵母によって分離除去に伴い、酵母細胞表層に存在するタンパク質中のアミノ基およびカルボキシル基に配位（図 3.3-4）、またアミノ酸におけるカルボン酸と塩形成（図 3.3-5）していると考えられる。

Mo (VI) イオン吸着に起因する吸収スペクトル変化(iv)は、Mo-O 伸縮振動に由来することが報告されている[3]。Mo (VI) イオンは、硝酸水溶液において $[\text{MoO}_2]^{2+}$ や $[\text{Mo}_2\text{O}_5]^{2+}$ として存在していることから[4]、これらオキソカチオン錯体の状態でパン酵母に吸着されている可能性がある。また、Mo (VI) イオン吸着に寄与する官能基を FT-IR-ATR 分析によって検出できなかったことから、赤外不活性原子でありパン酵母に存在する元素として硫黄が関与している可能性も考えられる。さらに Mo (VI) イオンと硫黄は結合することが報告されていることから[5]、パン酵母におけるタンパク質中のシステインやメチオニン[6]のような含硫黄アミノ酸と Mo (VI) イオンが結合している可能性がある。

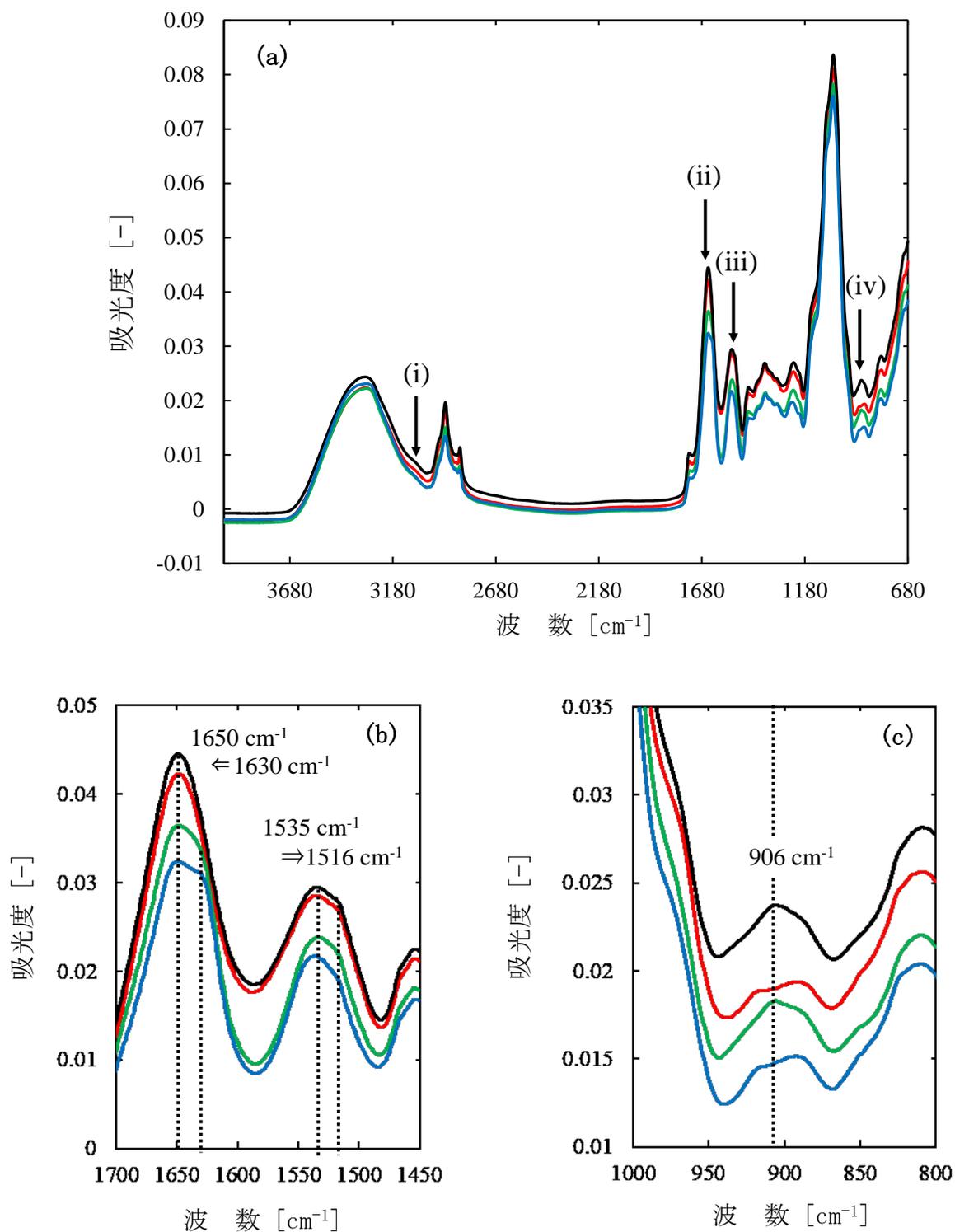


図 3.3-3 Pd (II) /Mo (VI) イオンを吸着したパン酵母 (試料VI)、Pd (II) イオンを吸着したパン酵母 (試料IV)、Mo (VI) イオンを吸着したパン酵母 (試料V)、硝酸水溶液に暴露させたパン酵母 (試料III) に対する FT-IR-ATR 吸収スペクトル
(黒：試料VI、赤：試料IV、緑：試料V、青：試料III)

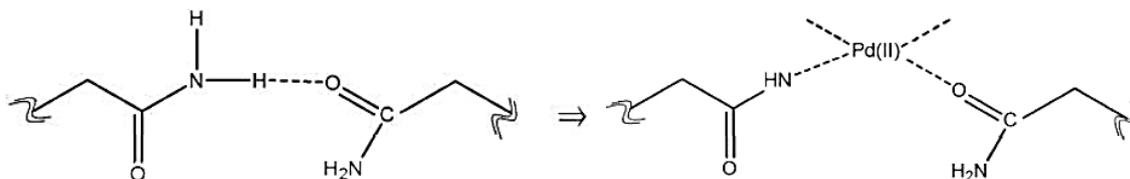


図 3.3-4 Pd (II) イオンのタンパク質におけるアミノ基およびカルボキシル基（酵母細胞表層）への配位（推定）

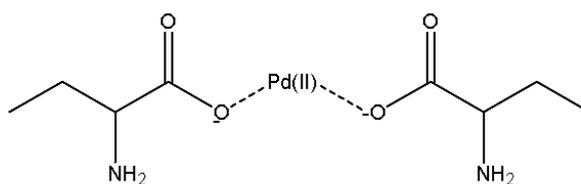


図 3.3-5 Pd (II) イオンのアミノ酸におけるカルボン酸（酵母細胞表層）との塩形成（推定）

3.3.2 パン酵母細胞表層の化学修飾による官能基導入のプロトコルに関する検討【R2】

一般的にリン酸基は各種金属イオンの分離除去に有効に作用する官能基であることが知られていることから、各種バイオマスの化学修飾によって人為的にリン酸基を導入したバイオ吸着剤が研究開発されている [7-9]。上述したように、パン酵母（野生型）細胞表層にもリン酸基の存在が FT-IR-ATR 分析に確認されているが、硝酸水溶液中の妨害金属イオン (Pd (II)、 Mo (VI)、 Ru (III)、 Rh (III)) 分離除去にはリン酸基が効果的に使われていない。そこで、パン酵母（野生株）の細胞表層を人為的に化学修飾してリン酸基を人為的に多量に導入するプロトコルを検討することにした。

本研究では、セルロースをリン酸化する化学修飾方法[8]を基に、パン酵母の細胞表層にリン酸基を導入する実験手順を開発した。具体的には、乾燥パン酵母（野生型）を超純水で洗浄した後、酵母細胞を 70%エタノール水溶液に加えて室温で 2 h の攪拌を行った。次にエタノール水溶液から酵母細胞を遠心分離 (10 min, 10,000 rpm) により集菌し、超純水による洗浄を行った。その後、酵母細胞を 20 wt% $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ (トリメタリン酸ナトリウム) 水溶液に添加して液相攪拌を開始し、温度 50 °C で 5 日間かけてリン酸化反応を行った。この間、反応溶液 pH 値を pH 12 の一定値に維持するために、溶液 pH を測定しながら適宜 50% NaOH 水溶液を添加した。

リン酸化反応の終了後、パン酵母を遠心分離 (10 min, 10,000 rpm) により集菌し、これを超純水で洗浄した後、水中に懸濁した酵母細胞を再び遠心分離により集菌した。この操作を 2 回繰り返した後、真空デシケータ内で 3 日間かけてパン酵母細胞を乾燥することにより、パン酵母（リン酸修飾株）を調製した。

パン酵母の全リン含有量をモリブデンブルー吸光光度法によって実測した。具体的には、酵母試料の0.1~0.2 gを精秤してコニカルビーカーにとり、そこに混酸（硫酸/硝酸/過塩素酸）を加えて加熱分解した。この試料溶液を分取して、モリブデンブルー吸光光度法により、試料溶液中の全リン濃度を測定し、細胞試料中の全リン含有量に換算した。吸光度は、分光光度計（日本分光 V-530）を用いて、測定波長 880 nm で測定した。その結果、パン酵母の全リン含有量は、野生型細胞では 7 mg/g-dry cells であるのに対し、リン酸基修飾細胞では 30 mg/g-dry cells と著しく増加していた。この全リン定量分析データから、パン酵母のリン酸化学修飾方法が妥当であることが明らかになった。

3.3.3 金属イオン選択性付与に関する検討【R2-R3】

バイオ分離剤に用いる各種酵母としては、パン酵母（野生株、化学修飾株）の他に、飼料用の乾燥酵母として市販（三輪製薬(株)）されているトルラ酵母、セレン酵母 2000ppm、セレン酵母 1000ppm、クロム酵母、脱核酵母（パン酵母から核酸を抽出した後の細胞残渣）、ビール酵母を使用した。特にトルラ酵母（*Candida utilis*）は、耐塩性酵母であり、第二次世界大戦中にドイツがたんばく質資源として製造を始めて以来、現在は世界各国で数多くの食品に利用されている（米国連邦食品医薬品局が安全性を認めている）。また、耐酸性・耐塩性酵母として、しょう油酵母（*Candida krusei*）に着目した。本研究では、*C. krusei* (IMF 59121 株)の乾燥細胞をバイオ分離剤として使用した。

模擬廃液としては、5 種類の初期組成を持つ硝酸水溶液を使用した。表 3.3-2 に示すように、Ru/Rh 系模擬廃液は 5.0 mmol/L の $\text{Ru}(\text{NO}_3)_3$ と $\text{Rh}(\text{NO}_3)_3$ を含む硝酸水溶液（硝酸濃度 0.01~0.1 mol/L）、Mo/Ru/Rh 系模擬廃液は 5.0 mmol/L の $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ru}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Rh}(\text{NO}_3)_3$ を含む 2.0 mol/L 硝酸水溶液である。また、Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液はガラス固化妨害元素のみ、Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液はガラス固化妨害元素、希土類元素 Nd、長寿命核分裂生成物 Zr を含む硝酸水溶液である。これらの模擬廃液を対象に、各種酵母を分離剤として用いてガラス固化妨害金属イオン（Pd (II)、Ru (III)、Rh (III)、Mo (VI)）除去実験を行い、妨害金属イオン除去に対する選択性（優先順位）について検討した。

表 3.3-2 模擬廃液の化学組成

模擬廃液	Pd [mmol/L]	Ru [mmol/L]	Rh [mmol/L]	Mo [mmol/L]	Zr [mmol/L]	Nd [mmol/L]	HNO_3 [mol/L]
Ru/Rh 系	-	5.0	5.0	-	-	-	0.01 ~0.1
Mo/Ru/Rh 系	-	5.0	5.0	5.0	-	-	2.0
Pd/Mo/Ru/ Rh 系	5.0	5.0	5.0	5.0	-	-	2.0
Pd/Mo/Ru/ Rh/Zr/Nd 系	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.0
Pd/Mo/Ru/ Rh/Zr/Nd 系	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0

(1) パン酵母（野生株）に対する妨害金属イオン除去の選択性【R2】

Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液（硝酸濃度 2.0 mol/L）からのガラス固化妨害金属イオン分離除去における選択性を図 3.3-6 に示す。なお、パン酵母（野生株）の添加量は 18 g/L である。妨害金属イオンのうちで Pd (II) イオン、その次に Mo (VI) イオンが優先的に分離除去されて、120 min のバッチ操作において Pd (II) イオン除去率は 72%、Mo (VI) イオン除去率は 22%であった。この場合には、Pd/Mo 分離係数 $\beta_{Pd/Mo}$ (= (細胞内 Pd 質量/液相 Pd 質量)/(細胞内 Mo 質量/液相 Mo 質量)) が 9.1 となり、パン酵母をバイオフィン剤として用いて Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液から Pd (II) イオンを選択的に除去できる可能性が示された。また、妨害金属イオン (Ru (III)、Rh (III)) については、パン酵母による除去率は低レベルであり、120 min のバッチ操作において Ru (III) イオン除去率は 4%、Rh (III) イオン除去率は 0%であった。

Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液から Pd (II) イオンを選択的に分離除去できることがわかったことから、Mo/Ru/Rh 系模擬廃液（硝酸濃度 2.0 mol/L）からのガラス固化妨害金属イオンのバイオフィン除去実験を行った結果を図 3.3-7 に示す。なお、パン酵母（野生株）の添加量は 72 g/L である。Mo/Ru/Rh 系模擬廃液にパン酵母を添加するに伴って Mo (VI) イオンの分離除去が急速に進行し、Mo (VI) 除去率は 10 min 後には 65%に達した。また、Ru (III) イオン除去率は漸増し、60 min 後には 15%になった。ただし、60 min 間のバッチ操作では Rh (III) イオンはバイオフィン除去できなかった。この場合、Mo/Ru 分離係数 $\beta_{Mo/Ru}$ (= (細胞内 Mo 質量/液相 Mo 質量)/(細胞内 Ru 質量/液相 Ru 質量)) が 10.5 となり、パン酵母をバイオフィン剤として用いて Mo/Ru/Rh 系模擬廃液から Mo (VI) イオンを選択的に除去できる可能性が示された。

また、Ru/Rh 系模擬廃液（硝酸濃度 2.0 mol/L）を対象にバイオフィン除去実験を行った。パン酵母（野生株）の添加量が 72 g/L の場合、Ru (III) イオン除去率は 200 min 後には 20%になり、24 h 後には 26%まで増加した。さらに、パン酵母による Rh (III) イオン除去率は漸増し、24 h のバッチ操作によって 12%であった。

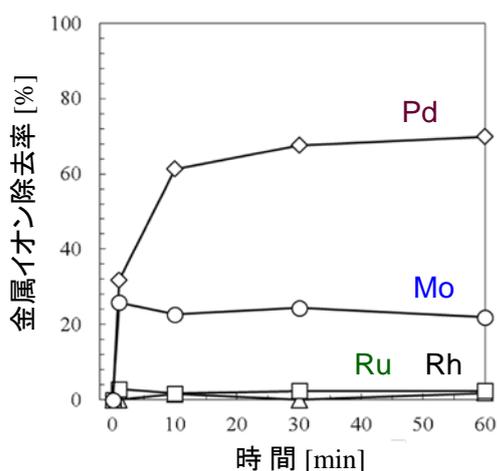


図 3.3-6 パン酵母（野生株）による Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去（酵母添加量 18 g/L、硝酸濃度 2.0 mol/L）

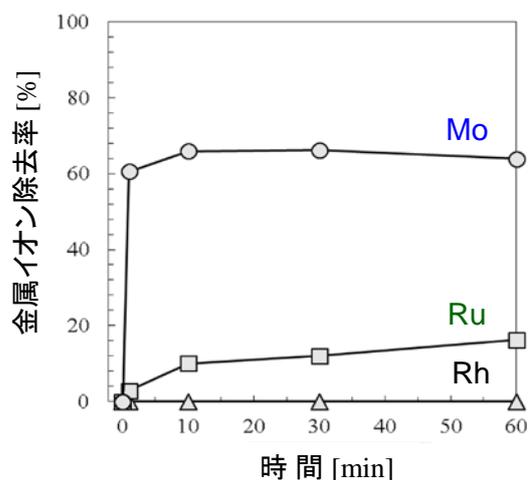


図 3.3-7 パン酵母（野生株）による Mo/Ru/Rh 系模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去（酵母添加量 72 g/L、硝酸濃度 2.0 mol/L）

以上の実験結果から、2.0 mol/L 硝酸水溶液中のガラス固化妨害金属イオンに対して、パン酵母(野生株)による分離除去の選択性は次の序列



になることが明らかになった。ただし、妨害金属イオン (Ru (III)、Rh (III)) 除去率は、バイオ分離剤としてパン酵母 (野生株) を用いた場合には低レベルであったことから、その改善策を講じる必要がある。

(2) パン酵母 (化学修飾株) に対する妨害金属イオン除去の選択性【R3】

妨害金属イオン (Ru (III)、Rh (III)) 除去率の向上策として、前年度に確立したプロトコル (3.3.2 参照) に従ってパン酵母 (野生株) 細胞表層にリン酸基を導入したパン酵母 (化学修飾株) を調製し、バイオ分離剤としての有効性を以下の実験によって確認した。

Ru/Rh 系模擬廃液 (Ru 濃度 5.0 mmol/L、Rh 濃度 5.0 mmol/L、硝酸濃度 0.1 mol/L (pH 1.0) または 0.032 mol/L (pH 1.5)) を対象に、パン酵母 (野生株、化学修飾株) が備える妨害金属イオン除去機能を比較した結果を表 3.3-3 に示す。野生株に比べて、化学修飾株の方は妨害金属イオン除去率が高くなるのがわかる。特に、硝酸濃度が 0.1 mol/L から 0.032 mol/L に低下するに伴い、両株が備える妨害金属イオン除去機能に大きな相違があることが明確になった。模擬廃液 (硝酸濃度 0.032 mol/L) に対する 120 min のバッチ操作において、化学修飾株による Ru (III) イオン除去率は 79%、Rh (III) イオン除去率は 53%にまで増加するのに対し、野生株による両金属イオン除去率は 14%以下であった。したがって、妨害金属イオン (Ru (III)、Rh (III)) 除去率を向上させる方策の一つとして、パン酵母 (野生株) 細胞表層にリン酸基を導入したパン酵母 (化学修飾株) を利用することが有効であることが明らかになった。

図 3.3-8 は、Ru/Rh 系模擬廃液 (Ru 濃度 5.0 mmol/L、Rh 濃度 5.0 mmol/L、硝酸濃度 0.032 mol/L (pH 1.5)) を対象に、回分式バイオ除去実験を 2 回繰り返した結果を示したものである。なお、各バイオ除去実験における乾燥酵母の添加量は 36 g/L である。2 回バイオ除去操作による

表 3.3-3 パン酵母(野生株、化学修飾株)による Ru/Rh 系模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去率に及ぼす初期 pH およびバッチ操作時間の影響 (細胞濃度 36 g/L)

除去率 [%]	パン酵母	初期 pH 1.0		初期 pH 1.5	
		30 min	120 min	30 min	120 min
Ru	化学修飾株	14	28	60	79
	野生株	11	17	8	19
Rh	化学修飾株	3	14	37	53
	野生株	2	6	2	7

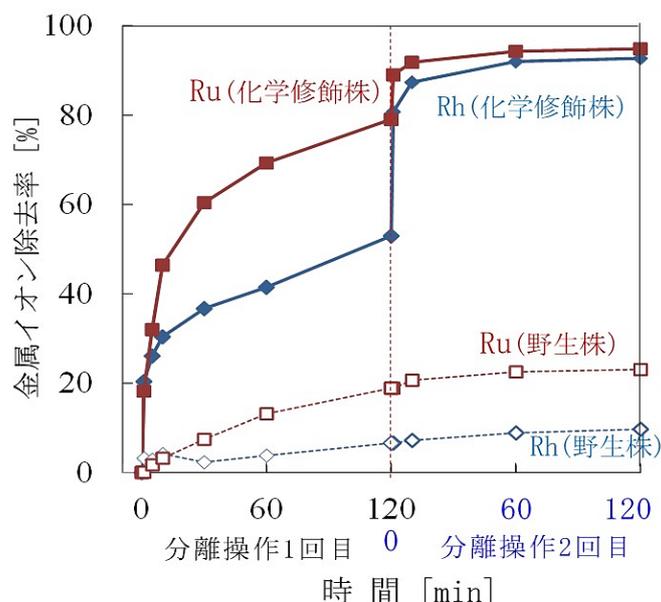


図 3.3-8 反復バッチ操作におけるパン酵母(化学修飾株、野生株)による Ru/Rh 系模擬廃液からの妨害金属イオン(Ru (III)、Rh (III))除去率の経時変化 (廃液初期 pH 1.5、各バッチ操作の酵母添加量 36 g/L)

妨害金属イオン総括除去率は、野生株では Ru が 21%、Rh が 10%であるのに対し、化学修飾株では Ru が 97%、Rh が 94%にまで増加した。以上の実験結果から、妨害金属イオン (Ru (III)、Rh (III)) の除去率を高める方策の一つとして、パン酵母 (化学修飾株) をバイオ分離剤として適用することが有効な手段であることが明らかになった。

(3) 各種酵母を用いる妨害金属イオン除去の選択性【R3】

Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) を対象に、バイオ分離剤として 4 種酵母 (トルラ酵母、ビール酵母、脱核酵母、パン酵母) を用いて測定した金属イオン除去率の経時変化を図 3.3-9 に示す。なお、各種酵母による除去率が 2%以下となった金属イオン (Ru (III)、Rh (III)、Nd (III)) に対する実験データの記載については割愛した。6 種金属イオンのうちで 3 種金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) のバイオ分離除去が迅速に起こり、4 種酵母ともに 30 min 以内のバッチ操作において、金属イオン除去率が時間的に変化しない平衡状態に到達することが確認できた。

各種酵母を用いて測定した 3 種金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) 除去率 (平衡値) を図 3.3-10、図 3.3-11 に示す。金属イオン除去の選択性は、パン酵母 (野生株) と同様に、Pd (II) > Zr (IV) > Mo (VI) の序列であることがわかる。これら 3 種金属イオンに対して各種酵母 (脱核酵母、ビール酵母、トルラ酵母、セレン酵母 2000ppm、セレン酵母 1000ppm、クロム酵母、しょう油酵母、パン酵母(化学修飾株)が備える除去機能は、パン酵母 (野生株) と比較して、同程度またはそれ以上であった。特に、トルラ酵母の金属イオン除去機能が最も優れており、30 min のバッチ操作において Pd (II) イオン除去率が 94%、Zr (IV) イオン除去率が 92%、Mo

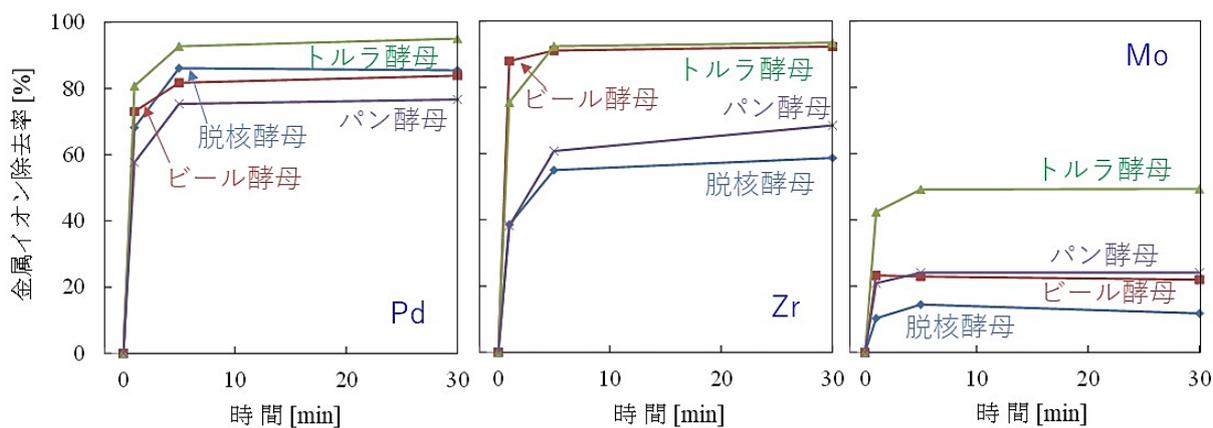


図 3.3-9 4 種酵母による Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去率の経時変化 (酵母添加量 36 g/L)

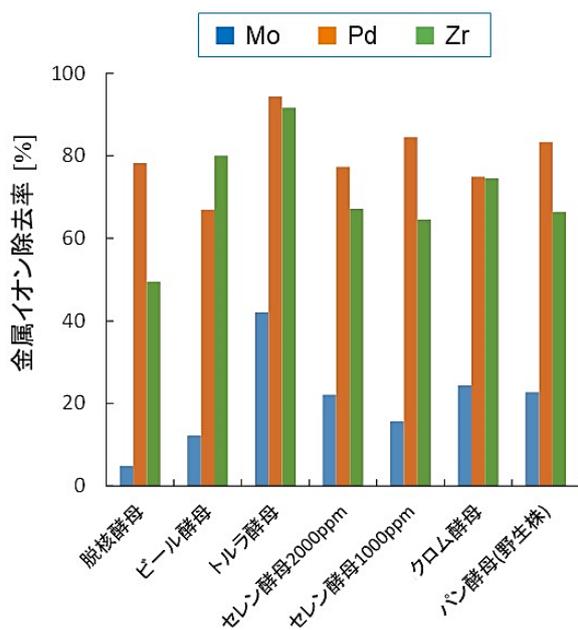


図 3.3-10 7 種酵母による Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) からの妨害金属イオン (Pd(II)、Zr(IV)、Mo(VI)) 除去率 (酵母添加量 36 g/L、時間 30 min)

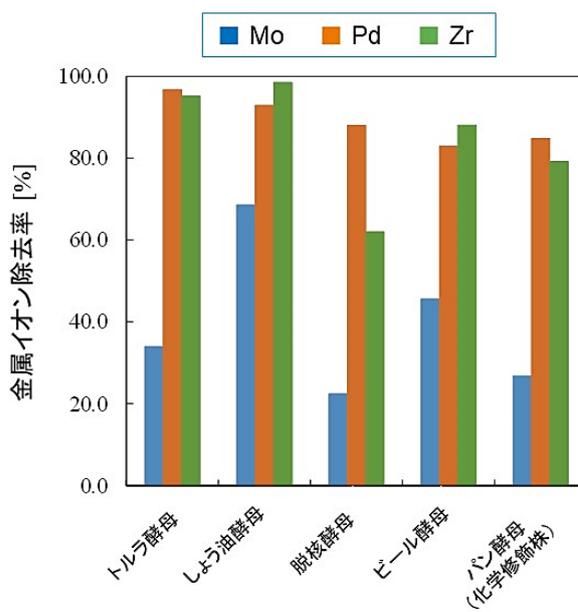
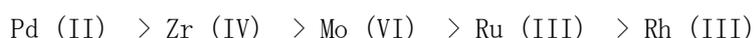


図 3.3-11 5 種酵母による Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液 (1.0 mol/L 硝酸水溶液) からの妨害金属イオン (Pd(II)、Zr(IV)、Mo(VI)) 除去率 (酵母添加量 36 g/L、時間 30 min)

(VI) イオン除去率が 42% であることが明らかになった。トルラ酵母は、飼料用酵母として利用されており、その酵母細胞に含まれる豊富なたんぱく質が金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) 除去率の向上に寄与したものと推測される。

しかしながら、他種の妨害金属イオン (Ru (III)、Rh (III)) に関しては、本実験条件下 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) では各種酵母による除去率が 2%以下 (実験データの記載を割愛) となり、その除去率を向上させる方策が必要となる。一般論として処理液中の酸性度が高い場合には分離剤の官能基 (リン酸、カルボン酸等) の解離が抑制されるため、金属イオンの捕集能力が低下する傾向にある。そこで、模擬廃液中の硝酸濃度を 2.0 mol/L から大幅に低下させた条件下で、各種酵母を用いて Ru/Rh 系模擬廃液からの妨害金属イオン除去率を測定した結果を図 3.3-12、図 3.3-13 に示す。ただし、模擬廃液の Ru (III) 初期濃度は 5.0 mmol/L、Rh (III) 初期濃度は 5.0 mmol/L であり、その硝酸濃度は 0.1 mol/L (pH 1.0) または 0.01 mol/L (pH 2.0) である。パン酵母 (野生株) を除いて、パン酵母 (化学修飾株) とともに、6 種の飼料用酵母 (脱核酵母、ビール酵母、トルラ酵母、セレン酵母 2000ppm、セレン酵母 1000ppm、クロム酵母) が備える妨害金属イオン (Ru (III)、Rh (III)) 除去機能が優れていることがわかる。特に、模擬廃液の硝酸濃度が 0.1 mol/L (pH 1.0) から 0.01 mol/L (pH 2.0) に低下するに伴い、パン酵母 (野生株) との相違は一段と大きくなった。模擬廃液 (硝酸濃度 0.01 mol/L) に対する 120 min のバッチ操作において、3 種酵母 (脱核酵母、トルラ酵母、セレン酵母 1000ppm) による妨害金属イオン (Ru (III)、Rh (III)) 除去率が 80% 前後にまで増加するのに対し、パン酵母 (野生株) による両金属イオン除去率は 10%以下であった。したがって、妨害金属イオン (Ru (III)、Rh (III)) の効率的な除去には、処理液の硝酸濃度を 0.01 mol/L (pH 2.0) 程度に調整したうえで、パン酵母 (野生株) とは異なる各種酵母 (脱核酵母、トルラ酵母、セレン酵母 1000ppm、パン酵母 (化学修飾株)) をバイオ分離剤として適用することが有効な手段であることが明らかになった。

以上の実験結果から、酸性模擬廃液中の 5 種金属イオンについては、各種酵母による分離除去の選択性が次の序列



に従って変化することが結論として得られた。高レベル放射性廃液には、Zr がガラス固化妨害元素である白金族金属 (Pd、Ru、Rh)、Mo と共存している。放射性廃液に含まれる Zr と Mo は不溶性モリブデン酸ジルコニウム ($\text{ZrMo}_2(\text{OH})_2$) を形成して配管内への付着等を引き起こすため、ガラス溶融時の操作性や固化体の化学的性質に悪影響を与える [10、11]。このため、放射性廃液中の白金族金属 (Pd、Ru、Rh)、Mo および Zr をガラス溶融炉に放射性廃液を投入する前に分離除去することは、高品質・高充填率のガラス固化体を形成するうえで意義深い。そのうえ、高レベル放射性廃液に含まれる Pd (^{107}Pd 半減期 650 万年) と Zr (^{93}Zr 半減期 153 万年) は長寿命核分裂生成物であることから、これら両元素 (Pd、Zr) を選択的にバイオ除去できる点は放射性廃棄物の有害度低減を図るうえでも好都合である。以下では、白金族金属 (Pd、Ru、Rh) および Mo の 4 元素に Zr を加えた 5 元素を、ガラス固化妨害元素として再定義することにした。

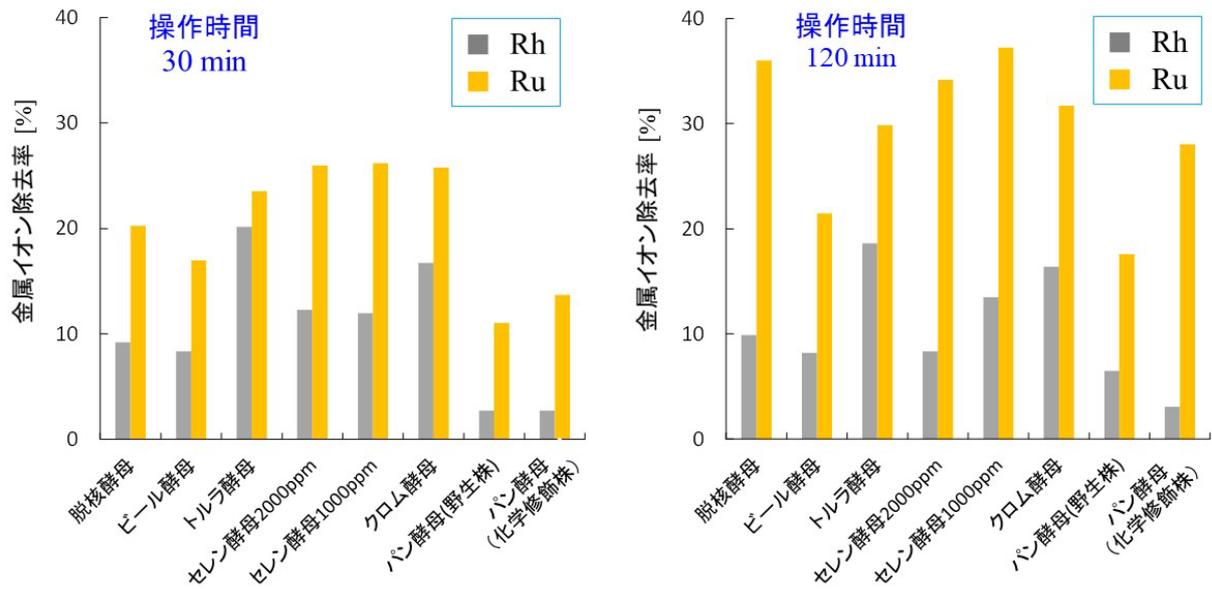


図 3.3-12 8 種酵母による Ru/Rh 系模擬廃液 (0.1 mol/L 硝酸水溶液) からのガラス固化妨害金属イオン除去 (酵母添加量 36 g/L)

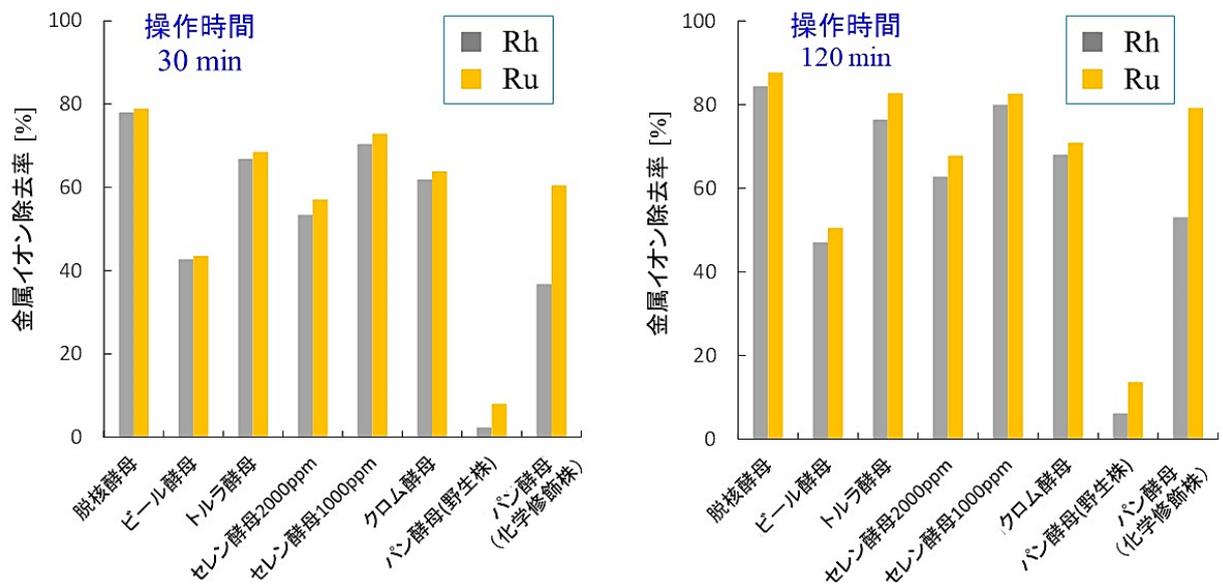


図 3.3-13 8 種酵母による Ru/Rh 系模擬廃液 (0.01 mol/L 硝酸水溶液) からのガラス固化妨害金属イオン除去 (酵母添加量 36 g/L)

(4) 長寿命核種 (Pd、Zr) と短寿命核種 (Ru、Rh) の選択的分離【R3】

Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からの長寿命核種 (Pd、Zr) と短寿命核種 (Ru、Rh) の選択的分離実験を行うにあたり、上述の実験データ (図 3.3-10～図 3.3-13) に基づいて、バイオ分離剤として使用する酵母種をトルラ酵母およびパン酵母 (化学修飾株) とした。その選定理由は、ガラス固化妨害金属イオンに対する分離機能が優れた酵母である点とともに、当研究室において実験試料として入手が容易である点である。

長寿命核種 (Pd、Zr) と短寿命核種 (Ru、Rh) の選択的分離を目的として、分離剤としてトルラ酵母およびパン酵母 (化学修飾株) を用いて、Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) に対して多回バッチ除去実験を行った。具体的には、1 バッチの酵母添加量は 36 g/L の一定値であり、各回のバッチ除去実験を行った後、酵母細胞 (妨害金属イオン含有) を遠心分離して取り除き、新しい乾燥酵母を添加して次のバッチ除去実験を開始した。前半 3 回のバッチ操作は長寿命核種 (Pd、Zr) を選択的分離するために実施するものであり、その操作条件は廃液の硝酸濃度が 2.0 mol/L、操作時間が 30 min である。後半 2 回のバッチ操作では、短寿命核種 (Ru、Rh) を選択的分離することが目的であり、前半 3 回のバッチ除去操作後に pH 調整 (脱硝) により廃液硝酸濃度を 0.01 mol/L に低下させた。後半 2 回の操作時間は 120 min である。

パン酵母 (化学修飾株) を分離剤として用いて Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) を対象に、5 回バッチ除去実験を行った。なお、各バッチ操作の酵母添加量 36 g/L である。パン酵母 (化学修飾株) を用いる前半 3 回バッチ除去操作によって、長寿命核種 (Pd、Zr) の総括除去率は Pd が 99%、Zr が 98% に達することがわかった。この場合、ガラス固化妨害元素 (Mo) の総括除去率は 83% に増加したが、短寿命各種 (Rh、Ru) の総括除去率は 5% 以下であった。その後、pH 調整 (脱硝) を行って実施した後半 2 回のバッチ除去では、短寿命核種 (Rh、Ru) の総括除去率は Ru が 79%、Rh が 53% と中程度にとどまった。

次に、トルラ酵母を用いる 5 回バッチ除去実験を行った結果を表 3.3-4 に示す。Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/ Nd 系模擬廃液 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) を対象にした前半 2 回のバッチ除去操作によって、長寿命核種 (Pd、Zr) の総括除去率が 99% 以上にまで増加するのに対して、短寿命核種 (Rh、Ru) の総括除去率は 7% 以下と低レベルに抑えられた。このような前半 2 回のバッチ

表 3.3-4 Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) における長寿命核種 (Pd、Zr) と短寿命核種 (Ru、Rh) の選択的分離 (各バッチ操作のトルラ酵母添加量 36 g/L)

総括 除去率 [%]	バッチ操作 回数					
	1 回目 (30 min)	2 回目 (30 min)	3 回目 (30 min)	pH 調整後	4 回目 (120 min)	5 回目 (120 min)
Pd	95	> 99	> 99	> 99	> 99	> 99
Zr	95	> 99	> 99	> 99	> 99	> 99
Mo	52	90	93	95	95	95
Ru	0	7	15	39	83	96
Rh	0	0	0	0	76	92

除去操作によって、長寿命核種 (Pd、Zr) が高効率に選択的除去できるだけでなく、ガラス固化妨害元素 (Mo) の 90%も除去できることが明らかになった。さらに、pH 調整後に後半 2 回 (合計 5 回) のバイオ除去操作を実施することにより、短寿命核種の総括除去率は Ru が 96%、Rh が 92% にまで増加することがわかった。すなわち、pH 調整後の後半 2 回のバイオ除去操作において、短寿命核種 (Rh、Ru) の選択的除去・資源化の可能性が示唆された。

参考文献

- [1] Saitoh, N., Fujimori, R., Tanaka, H., Kondoh, A., Nomura, T. & Konishi, Y. Microbial recovery of palladium by baker's yeast through bioreductive deposition and biosorption. *Hydrometallurgy* 196, 105413 (2020).
- [2] Watanabe, S., Sato, T., Yoshida, T., Nakaya, M., Yoshino, M., Nagasaki, T., Inaba, Y., Takeshita, K. & Onoe J. Spectroscopic and first-principles calculation studies of the chemical forms of palladium ion in nitric acid solution for development of disposal of high-level radioactive nuclear wastes. *AIP Advances* 8, 045221 (2018).
- [3] Weber, Th., Muijsers, J. C., Wolput van, J. H. M. C., Verhagen, C. P. J. & Niemantsverdriet, J. W. Basic reaction steps in the sulfidation of crystalline MoO₃ to MoS₂, as studied by X-ray photoelectron and infrared emission spectroscopy. *J. Phys. Chem.* 100, 14144-14150 (1996).
- [4] Saeki, M., Yomogida, T., Matsumura, D., Saito, T., Nakanishi, R., Tsuji, T., Okamoto, Y. & Hironori O. Speciation of isopolymolybdate(VI) in a highly concentrated HNO₃ solution by Raman and EXAFS. 分子科学会 spectroscopies <http://www.molsci.jp/2018/block/oral/3day/3B01-3B09.pdf> (2018).
- [5] Schwarz, G., Mendel, R. R. & Ribbe, M. W. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. *NATURE* 460, 839-847 (2009).
- [6] Lampen J. O., External enzymes of yeast: their nature and formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 34, 1-18 (1968).
- [7] Illy, N. et al. Phosphorylation of bio-based compounds: the state of the art. *Polym. Chem.* 6, 6257-6291 (2015).
- [8] Inoue, H., Baba, Y. & Tsuhako, M. Phosphorylation of cellulose with cyclo-Triphosphate. *Chem. pharm. bull.* 43, 677-678 (1995).
- [9] Inoue, H., Nakayama, H. & Tsuhako, M. Phosphorylation of organic compounds by inorganic cyclo-triphosphate. *Recent Res. Dev. Chem. Pharm. Sci.* 2, 31-46 (2002).
- [10] 吉田一雄、石川 淳、阿部 仁. 再処理施設の蒸発乾固事故での放射性物質の移行挙動解析. 日本原子力学会和文論文誌. 14, 213-226 (2015).
- [11] 河野壮馬、新井 剛、鷹尾康一郎. 高レベル放射性廃液からの Mo(VI)、Zr(IV) の効率的除去へ向けた [Habit][Tf2N] の抽出特性の基礎研究. 日本イオン交換学会誌. 29, 25-34 (2018).

3.4 ガラス固化妨害成分のバイオ分離・除去操作の確立

3.4.1 パン酵母による妨害成分バイオ分離への影響因子に関する検討【R2-R3】

バイオ分離剤としては、市販の乾燥酵母（オリエンタル酵母（株）、三輪製薬（株））を使用した。模擬廃液としては、4種類の初期組成を持つ硝酸水溶液を使用した。表 3.4-1 に示すように、Pd 系模擬廃液は 1.0~2.1 mmol/L の Pd(NO₃)₂ 水溶液（硝酸濃度 0.1~2.0 mol/L）、Pd/Mo 系模擬廃液は 5.0 mmol/L の Pd(NO₃)₂ と (NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O を含む 2.0 mol/L 硝酸水溶液、Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液は 5.0 mmol/L の Pd(NO₃)₂、Ru(NO₃)₃、Rh(NO₃)₃、(NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O を含む 2.0 mol/L 硝酸水溶液である。また、Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液は、5.0 mmol/L の Pd(NO₃)₂、Ru(NO₃)₃、Rh(NO₃)₃、(NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O、ZrO(NO₃)₂·2H₂O、Nd(NO₃)₃ を含む 2.0 mol/L 硝酸水溶液である。さらに、表 3.4-2 に化学組成を示す 23 金属元素模擬廃液（硝酸濃度 2.0 mol/L）も使用した。

ガラス固化妨害金属イオン（Pd (II)、Rh (III)、Ru (III)、Mo (VI)、Zr (IV)）のバイオ分離除去実験は、大気開放下において、所定量の試験溶液とパン酵母をガラス容器に仕込み、温度 34 °C の一定条件下においてバッチ操作によって行った。パン酵母の添加から所定時間ごとに液試料を採取し、その液相金属濃度を ICP-AES 分析装置を用いて測定した。なお、液相細胞濃度はヘマトメーター法で測定した。また、パン酵母による試験廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去率は、バイオ分離前後における液相金属濃度の減少量に基づいて物質収支から算出した。

表 3.4-1 模擬廃液の化学組成

	Pd [mmol/L]	Ru [mmol/L]	Rh [mmol/L]	Mo [mmol/L]	Zr [mmol/L]	Nd [mmol/L]	HNO ₃ [mol/L]
Pd 系	1.0	-	-	-	-	-	0.1~2.0
Pd 系	2.1	-	-	-	-	-	1.0
Pd/Mo 系	5.0	-	-	5.0	-	-	2.0
Pd/Mo/Ru/Rh 系	5.0	5.0	5.0	5.0	-	-	2.0
Pd/Mo/Ru/Rh/ Zr/Nd 系	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0

表 3. 4-2 23 金属元素模擬廢液（硝酸濃度 2.0 mol/L）の化学組成

元 素	液相濃度		試 薬
	[mmol/L]	[mg/L]	
Na	5.0	115.0	NaNO ₃
Cr	5.0	260.0	Cr(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O
Fe	5.0	279.3	Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O
Ni	5.0	293.5	Ni(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O
Rb	5.0	427.4	RbNO ₃
Sr	5.0	438.1	Sr(NO ₃) ₂
Y	5.0	444.6	Y(NO ₃) ₃ · 6H ₂ O
Zr	5.0	456.1	ZrO(NO ₃) ₂ · 2H ₂ O
Mo	5.0	479.7	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O
Ru	5.0	505.5	RuNO(NO ₃) ₃
Rh	4.9	507.3	Rh(NO ₃) ₃
Pd	4.8	507.5	Pd(NO ₃) ₂ · 2H ₂ O
Te	5.0	638.0	H ₂ TeO ₄ · 2H ₂ O
Cs	5.0	664.5	CsNO ₃
Ba	5.0	686.5	Ba(NO ₃) ₂
La	5.0	694.5	La(NO ₃) ₃ · 6H ₂ O
Ce	5.0	700.5	Ce(NO ₃) ₃ · 6H ₂ O
Pr	5.0	704.5	Pr((NO ₃) ₃ · 6H ₂ O
Nd	5.0	721.0	Nd(NO ₃) ₃ · 6H ₂ O
Sm	5.0	752.0	Sm(NO ₃) ₃ · 6H ₂ O
Eu	5.0	760.0	Eu(NO ₃) ₃ · 6H ₂ O
Gd	5.0	786.5	Gd(NO ₃) ₃ · 6H ₂ O
Re	5.0	931.0	NH ₄ ReO ₄

(1) バイオ分離剤としての乾燥パン酵母の使用前処理【R2】

乾燥パン酵母をガラス固化妨害金属イオンの分離剤として使用するにあたり、乾燥細胞の再水和の効果について検討した。高レベル放射性廃液が硝酸水溶液であるので、乾燥細胞を硝酸水溶液 (0.2 mol/L、2.0 mol/L) に添加し、この細胞懸濁液を温度 34 °C で 180 min の振とう攪拌を行うことより再水和パン酵母を調製した。

乾燥パン酵母の再水和時の硝酸濃度が Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からの Pd (II) イオン除去率および Zr (IV) イオン除去率に及ぼす影響を図 3.4-1 に示す。なお、酵母添加量は 18 g/L (細胞濃度 5.0×10^{14} cells/m³) である。模擬廃液へのパン酵母の添加に伴って金属イオン吸着が迅速に起こり、60 min 後には吸着平衡状態に達して金属イオン除去率は一定値を示した。Pd (II) イオン除去率の平衡値は、水和時の硝酸濃度 2.0 mol/L では 55%、硝酸濃度 0.2 mol/L では 58%、乾燥細胞を添加した場合には 63%であった。また、Zr (IV) イオン除去率の平衡値は、水和時の硝酸濃度 2.0 mol/L では 41%、乾燥細胞を添加した場合には 44%であった。このように硝酸水溶液による乾燥パン酵母の再水和は、パン酵母の Pd (II) イオン等の分離機能を低下させるとともに、バイオ分離の前処理として工程数を増やすことにもなる。したがって、以下のバイオ分離除去実験では、硝酸水溶液による乾燥細胞の水和処理を行わずに、乾燥パン酵母を模擬廃液に添加することにした。

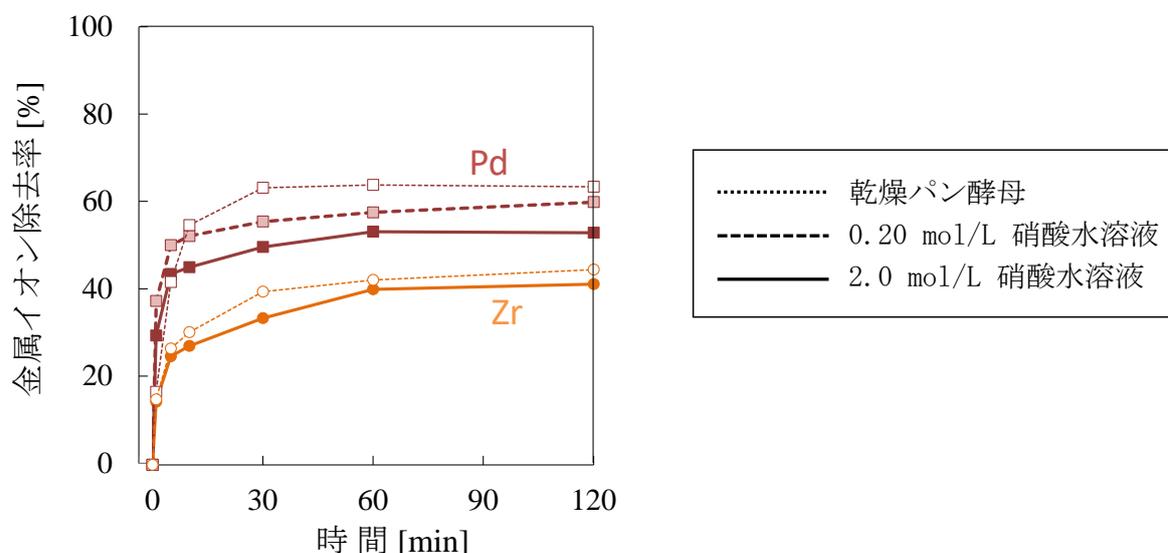


図 3.4-1 Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からの金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)) 除去率に及ぼす乾燥パン酵母の再水和条件 (硝酸濃度) の影響 (酵母添加量 18 g/L)

(2) 硝酸濃度の影響【R2-R3】

高レベル放射性廃液が硝酸水溶液であることを踏まえて、パン酵母の Pd (II) イオン分離機能に及ぼす硝酸濃度の影響について検討した。図 3.4-2 は、パン酵母による Pd (NO₃)₂ 水溶液からの Pd (II) イオン除去率に及ぼす硝酸濃度の影響を示したものである。ただし、Pd (II) 初期濃度

1 mmol/L、酵母添加量（細胞濃度）9 g/L (2.5×10^{14} cells/m³) である。パン酵母を Pd(NO₃)₂ 水溶液に添加した後、バイオ分離除去は 120 min 以内に平衡状態に達し、各硝酸濃度において Pd (II) イオン除去率は時間に関して一定値を示した。硝酸濃度が 0.1 mol/L から 2.0 mol/L に増加するに伴い、Pd (II) イオン除去率の平衡値が 90% から 51% に半減することがわかった。この硝酸濃度の増加に伴う Pd (II) イオン除去率の低下は、硝酸濃度が高い場合にはパン酵母細胞表面に存在する脂質やアミノ酸 (Pd (II) イオン捕集に関与する生体物質) からのプロトン遊離が抑制されるとともに、脂質やアミノ酸の一部が損傷を受けることに起因すると考えられる。

(3) 酵母添加量（細胞濃度）の影響【R2-R3】

2.0 mol/L 硝酸水溶液からの Pd (II) イオン除去率を高めるために、バイオ分離剤であるパン酵母の添加量（細胞濃度）を増加させてバイオ分離除去実験を行った。図 3.4-3 に示すように、パン酵母の添加量（細胞濃度）を 3.6 g/L (1.0×10^{14} cells/m³) から 18 g/L (5.0×10^{14} cells/m³) に増加させることによって、Pd(NO₃)₂ 水溶液からの Pd (II) イオン除去率（60 min のバッチ操作における平衡値）を 26% から 80% に高めることができる。

Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液におけるガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Mo (VI)) 除去率に及ぼす酵母添加量の影響を図 3.4-4、図 3.4-5 に示す。なお、120 min のバッチ操作において Ru (III) イオン除去率は 3% 以下、Rh (III) イオン除去率は 0% であったため、実験データの提示は割愛した。模擬廃液への酵母添加量（細胞濃度）が 3.6 g/L (1.0×10^{14} cells/m³) から 36 g/L (1.0×10^{15} cells/m³) に増加するに伴い、Pd (II) イオン除去率が 18% から 76% に、また Mo (VI) イオン除去率が 3% から 40% に増加することがわかった。

Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液におけるガラス固化妨害金属イオン除去率に及ぼす酵母添加量の影響を図 3.4-6 に示す。Pd (II) イオンおよび Mo (VI) イオンは、30 min 以内のバッチ操作で除去率が時間的に変化しない平衡状態に到達した。酵母添加量が 9.0 g/L から 36 g/L に増加するに伴い、Pd (II) イオン除去率（平衡値）は 40% から 82% に倍増した。Mo (VI) イオンに関しては、酵母添加量 9.0 g/L の場合には分離除去は起こらないが、酵母添加量を 36 g/L に高めた場合には除去率が 20% に増加した。これに対して Zr (IV) イオン除去は比較的進行が遅く、酵母添加量 36 g/L の場合には Zr (IV) イオン除去率が 30 min 後には 65% に、120 min 後には 75% に漸増した。酵母添加量の 9.0 g/L から 36 g/L への増加に伴って、Zr (IV) イオン除去率（操作時間 120 min）は 17% から 75% にまで著しく増加した。このように、酵母添加量はガラス固化妨害金属イオン除去率を高めるうえで重要な操作因子であることを確認できた。

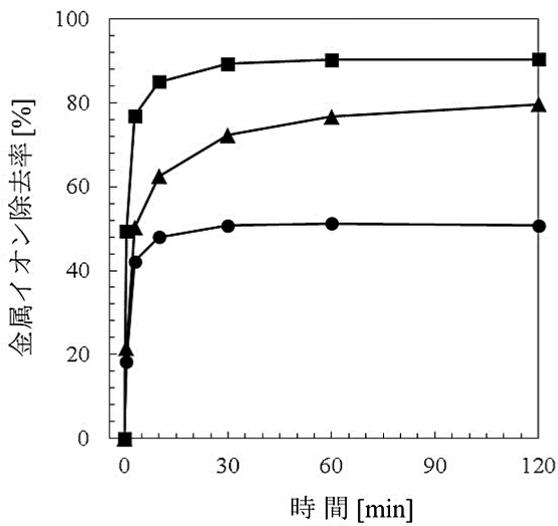


図 3.4-2 パン酵母による $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 水溶液からの Pd (II) イオン除去率に及ぼす硝酸濃度の影響 (Pd (II) 初期濃度 1.0 mmol/L、酵母添加量 9 g/L) . (■) 0.1 mol/L、(▲) 1.0 mol/L、(●) 2.0 mol/L

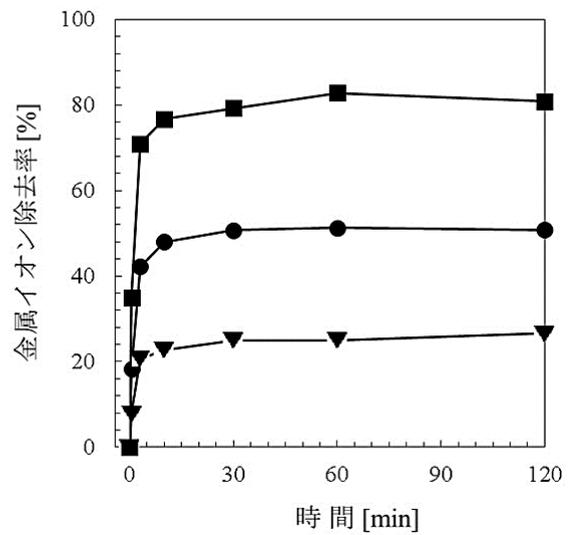


図 3.4-3 パン酵母による $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 水溶液からの Pd (II) イオン除去率に及ぼす酵母添加量の影響 (Pd (II) 初期濃度 1.0 mmol/L、硝酸濃度 2.0 mol/L) . (■) 18 g/L、(●) 9 g/L、(▼) 3.6 g/L

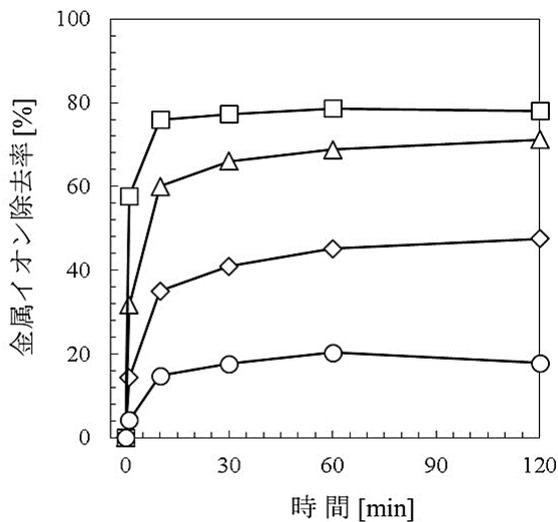


図 3.4-4 パン酵母による Pd/Mo/Ru/Rh 系 4 成分模擬廃液からの Pd (II) イオン除去率に及ぼす酵母添加量の影響 (Pd (II) 初期濃度 5.0 mmol/L、硝酸濃度 2.0 mol/L) . (□) 36 g/L、(△) 18 g/L、(◇) 9 g/L、(○) 3.6 g/L

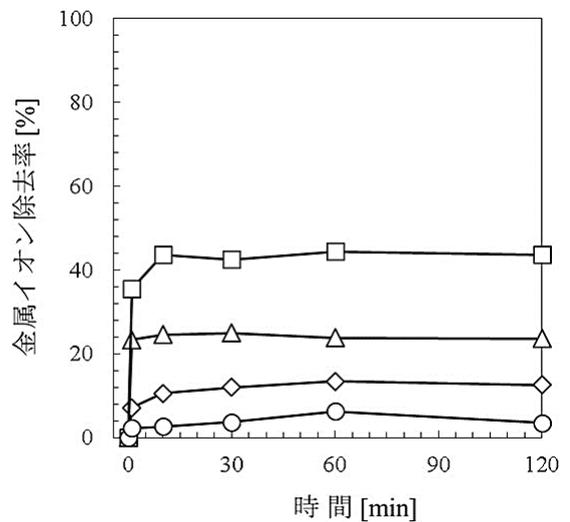


図 3.4-5 パン酵母による Pd/Mo/Ru/Rh 系 4 成分模擬廃液からの Mo (VI) イオン除去率に及ぼす酵母添加量の影響 (Mo (VI) 初期濃度 5.0 mmol/L、硝酸濃度 2.0 mol/L) . (□) 36 g/L、(△) 18 g/L、(◇) 9 g/L、(○) 3.6 g/L

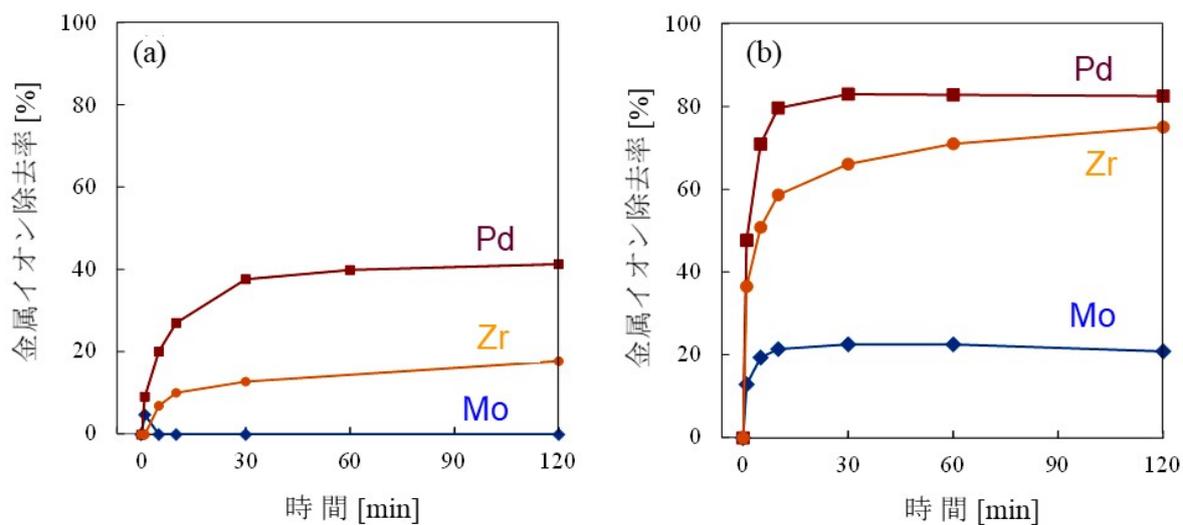


図 3.4-6 パン酵母による Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からの金属イオン(Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI))除去率に及ぼす酵母添加量の影響. (a) 9 g/L、(b) 36 g/L

(4) 共存金属イオンの影響【R3】

以上の研究結果から、パン酵母（野生株）による模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去において、Pd (II) イオンに対する選択性が最も高いことが明らかになった。そこでPd (II) イオンに対するパン酵母細胞-液相間の分配平衡に及ぼす共存金属イオンの影響を、Pd/Mo/Ru/Rh系模擬廃液とPd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd系模擬廃液（表 3.4-1）に対する実験データに基づいて調べた。図 3.4-7 は、Pd (II) イオン分離除去の平衡状態における液相 Pd 濃度 C [g/L] に対してパン酵母細胞 Pd 濃度 q [g/kg-dry cells] をプロットした結果を示す。縦軸の酵母細胞 Pd 濃度 q は、バイオ分離除去による液相 Pd 濃度の減少量に基づいて物質収支から算出した。図中の実線は、Pd/Mo/Ru/Rh系実験データに対してラングミュア型吸着等温式 ($q = q_m KC / (1 + KC)$) を用いてカーブフィッティングを行って求めた相関線を表す。なお、最大吸着量として $q_m = 160$ g-Pd/kg-dry cells、吸着平衡定数として $K = 0.92$ L/g と定まった。Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd系模擬廃液の実験データは、Pd/Mo/Ru/Rh系模擬廃液の相関線に対して概ね±20%の相対誤差範囲に収まることから、Pd (II) イオン吸着平衡関係は共存金属イオン (Zr (IV)、Nd (III)) の影響を大きく受けないことが明らかになった。なお、参考までに23金属元素模擬廃液（表 3.4-2）におけるPd (II) イオン吸着平衡データ（1点のみ）をプロットしたが、上記の相関線からの偏倚は下方に20%程度であったことから、多種類の共存イオンの影響は顕著に現れないこともわかった。

ガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Mo (VI)) 除去率に及ぼす共存金属イオンの影響を調べるために、Pd/Mo/Ru/Rh系模擬廃液とPd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd系模擬廃液に対する実験結果を比較した。表 3.4-3 に示すように、Pd/Mo/Ru/Rh系の場合と比較して、Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd系におけるPd (II) イオン除去率は $65 \pm 1\%$ と同程度であるが、Mo (VI) イオン除去率は23%から4%にまで著しく低下した。また、Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd系ではMo (VI) イオン除去率が4%にまで抑制されるのに対し、Zr (IV) イオン除去率は40%に達している。したがって、パン酵母の吸着サイト（酵母細胞表層に存在する金属イオンと親和性のある官能基）に関しては、Pd (II) イオンはMo (VI) イオンやZr (IV) イオンとは異なる官能基に作用するが、Mo (VI) イオンとZr (IV) イオンは共通の官能基に作用するために競争的な捕集現象が生じたものと考えられる。なお、模擬廃液 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) 中のMo (VI) イオンはジオキソモリブデンイオン (MoO_4^{2-})、またZr (IV) イオンはジルコニルイオン (ZrO_4^{2-}) としてオキソカチオンで存在していると推測される。

さらにPd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd系模擬廃液と23金属元素模擬廃液（表 3.4-2）に対する実験結果を比較し、パン酵母（野生株）等の各種酵母によるガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) 除去率に及ぼす共存金属イオンの影響を調べた。図 3.4-8、図 3.4-9 は、パン酵母（野生株）等の各種酵母によるガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) 除去率を示したものである。なお、酵母添加量は36 g/L、バッチ操作時間は30 min、模擬廃液の硝酸濃度は2.0 mol/Lである。6金属元素系の場合と比べて、23金属元素系においてもバイオ分離除去の選択性はPd (II) > Zr (IV) > Mo (VI) の序列であり、3種妨害金属イオン除去率は両模擬廃液において大差ないことがわかる。したがって、少なくとも3種妨害金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) のバイオ分離除去は、23金属元素模擬廃液中の17種元素 (Na、Cr、Fe、Ni、Rb、Sr、Y、Te、Cs、Ba、La、Ce、Pr、Sm、Eu、Gd、Re) の影響を大きく受けないと見なし差し支えないことが明らかになった。

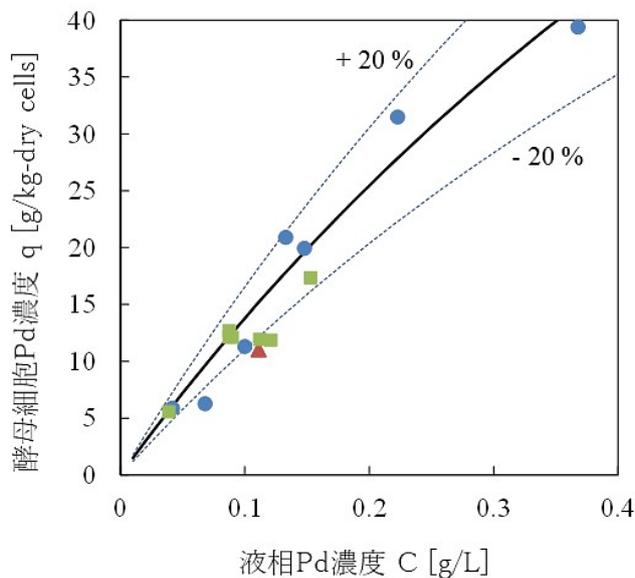


図 3.4-7 パン酵母（野生株）による Pd(II) イオン吸着分離における酵母細胞-液相間の分配平衡に及ぼす共存金属イオンの影響.

(●)Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液、(■)Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液、(▲)23 金属元素模擬廃液

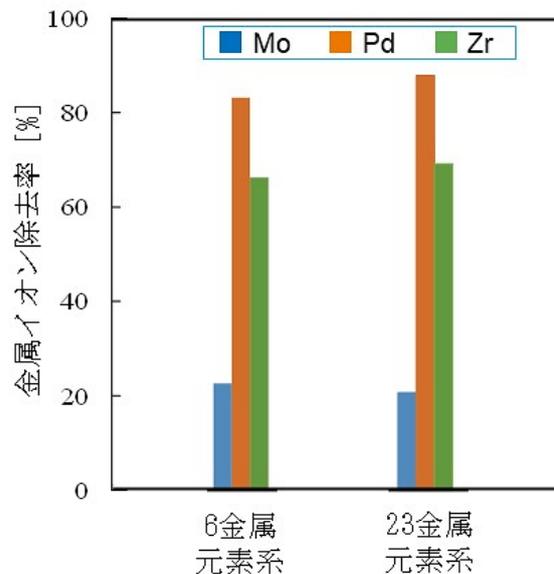


図 3.4-8 パン酵母（野生株）によるガラス固化妨害金属イオン（Pd (II)、Zr(IV)、Mo (VI)）除去率に及ぼす共存金属イオンの影響（酵母添加量 36 g/L、操作時間 30 min）

表 3.4-3 Pd/Mo/Ru/Rh 系模擬廃液および Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液におけるパン酵母（野生株）による金属イオン（Pd (II)、Mo (VI)、Zr (IV)）除去率（酵母添加量 18 g/L、操作時間 30 min、廃液の硝酸濃度 2.0 mol/L）

模擬廃液	金属イオン除去率 [%]		
	Pd(II)	Mo(VI)	Zr(IV)
Pd/Mo/Ru/Rh 系	66	23	—
Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系	64	4	40

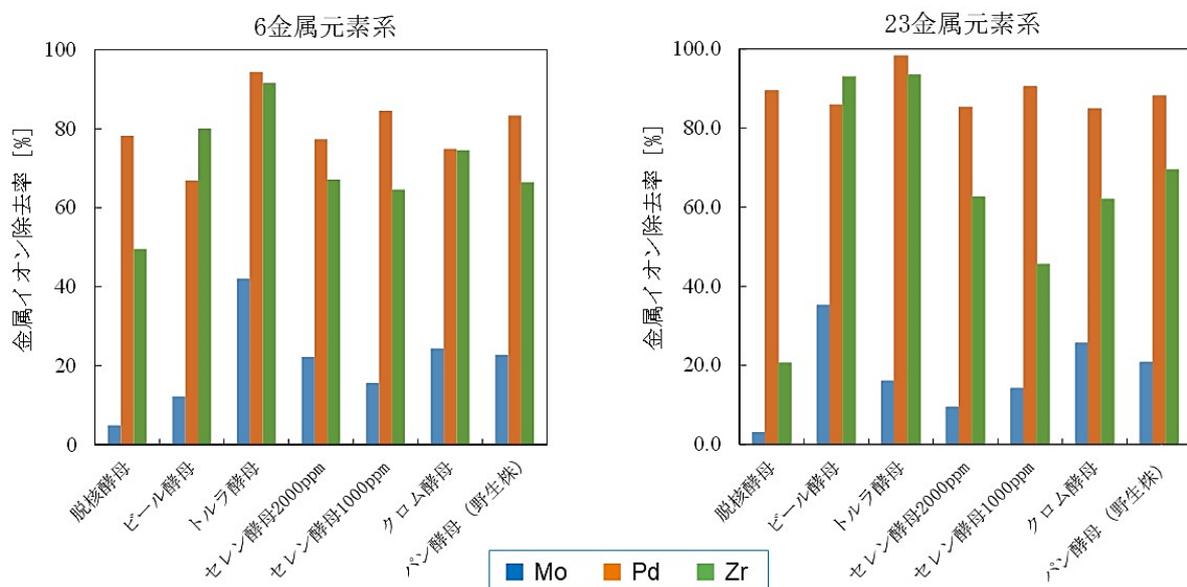


図 3.4-9 各種酵母によるガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) 除去率に及ぼす共存金属イオンの影響 (酵母添加量 36 g/L、操作時間 30 min)

(5) パン酵母を用いる妨害金属イオン分離除去における問題点とその改善策【R3】

上述したように、パン酵母 (野生株) 等の各種酵母によるガラス固化妨害金属イオン (Ru (III)、Rh (III)) 除去においては、1回バッチ操作による除去率が非常に低レベルであることが問題点として残っている。そこで第一の改善策としてバッチ除去実験を繰り返す多回除去方式を採用し、その効果の程度を 23 金属元素模擬廃液 (表 3.4-2) に対するバイオ除去実験によって検証した。具体的には、1バッチあたりの酵母添加量は 36 g/L の一定値とし、各回のバッチ除去実験を行った後、酵母細胞 (妨害金属イオン含有) を遠心分離して取り除き、新しい乾燥酵母の所定量を添加して次のバッチ除去実験を開始した。3 回目の除去実験後、酵母細胞を取り除いた残液に 12 mol/L NaOH 水溶液を添加し、硝酸濃度を 2.0 mol/L から 0.01 mol/L に低下させた。この pH 調整 (脱硝操作) の後、引き続いて後半 2 回のバッチ除去実験を行った。前半 3 回の操作条件は、模擬廃液の硝酸濃度が 2.0 mol/L、操作時間が 30 min である。後半 2 回の操作条件は、廃液の硝酸濃度が 0.01 mol/L、操作時間 120 min である。

23 金属元素模擬廃液 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) を対象に、パン酵母 (野生株) を分離剤として用いて 5 回バッチ除去操作を行った結果を図 3.4-10 に示す。金属元素の総括除去率は、①バッチ除去操作 1~3 回目の除去率の合計値 (図中の黄緑色)、②pH 調整 (硝酸濃度 2.0 mol/L から 0.01 mol/L) に伴う沈澱除去率 (図中の紫色)、③バッチ除去操作 4~5 回目の除去率の合計値 (図中の橙色) の和である。パン酵母 (野生株) によるガラス固化妨害元素の分離除去における①~③の寄与は、概ね次のような割合である。

- Pd : ①の寄与が 90%以上
- Zr : ①の寄与が 90%以上
- Mo : ①の寄与が約 70%、②と③の寄与がそれぞれ 15%程度
- Ru : ③の寄与が約 70%、①と②の寄与がそれぞれ 15%程度
- Rh : ③の寄与が 90%以上

合計 5 回のバッチ除去操作により、各ガラス固化妨害元素の総括除去率は Pd が 99%、Zr が 98%、Mo が 83%、Ru が 58%、Rh が 32% に増加することがわかった。このように多回バッチ除去操作を採用することによって、妨害元素 (Pd、Zr、Mo) を高効率に選択的除去することができた。しかしながら、妨害元素 (Ru、Rh) の総括除去率をさらに高める改善策が必要である。

上述の実験データ(図 3.3-9～図 3.3-13)を踏まえて、第二の改善策として妨害金属イオン (Ru (III)、Rh (III)) 除去機能がパン酵母 (野生株) よりも勝っているトルラ酵母に着目した。バイオ分離剤としてトルラ酵母を応用するプラス効果を検証するために、23 金属元素模擬廃液 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) を対象に 5 回バッチ除去操作を行った。トルラ酵母を用いる実験方法 (バッチ除去、pH 調整) およびその操作条件は、パン酵母 (野生株) の場合 (図 3.4-10) と同様である。図 3.4-11 は、模擬廃液からの各種金属元素 (白金族元素、希土類元素、アルカリ金属元素、アルカリ土類金属元素、遷移金属元素) の総括除去率を示したものである。また、表 3.4-4 は、トルラ酵母を用いるガラス固化妨害 5 元素の総括除去率とバッチ除去操作回数との関係を纏めたものである。妨害 5 元素に関しては、2 回バッチ除去操作によって Pd と Zr が 99%以上、5 回バッチ除去操作によって Mo が 99%以上、Ru が 96%、Rh が 92% と、極めて高い総括除去率を達成することができた。模擬廃液中の 23 元素のうちで、ガラス固化妨害 5 元素 (Pd、Zr、Mo、Ru、Rh) に加えて、13 元素 (Rb、Cs、Ba、Y、La、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu、Gd、Cr、Fe) については、5 回バッチ除去操作によって 60%以上の総括除去率に達することもわかった。

ガラス固化妨害 5 元素に対する総括除去率は、バッチ除去操作 1～3 回目の除去率の合計値 (図中の黄緑色)、pH 調整 (硝酸濃度 2.0 mol/L から 0.01 mol/L) に伴う沈澱除去率 (図中の紫色)、バッチ除去操作 4～5 回目の除去率の合計値 (図中の橙色) の和である。トルラ酵母によるガラス固化妨害元素の分離除去における①～③の寄与は、概ね次のような割合である。

- Pd : ①の寄与が 100%
- Zr : ①の寄与が 100%
- Mo : ①の寄与が約 80%、②と③の寄与がそれぞれ 10%程度
- Ru : ③の寄与が約 60%、②の寄与が 30%、①の寄与が 10%程度
- Rh : ③の寄与が 100%

このように 23 金属元素模擬廃液 (表 3.4-2) を対象に、操作方式として 5 回バッチ除去を採用するとともに、バイオ分離剤としてトルラ酵母を用いることによって、妨害元素 (Ru、Rh) 総括除去率を 92%以上に高めることに成功した。さらに、模擬廃液中の 23 金属元素のうちで、ガラス固化妨害元素 (Pd、Zr、Mo、Ru、Rh)、希土類元素 (Y、La、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu、Gd)、アルカリ金属元素 (Rb、Cs)、アルカリ土類金属元素 (Ba)、遷移金属元素 (Cr、Fe) の合計 18 元素の総括除去率が 60%以上になることも明らかにした。

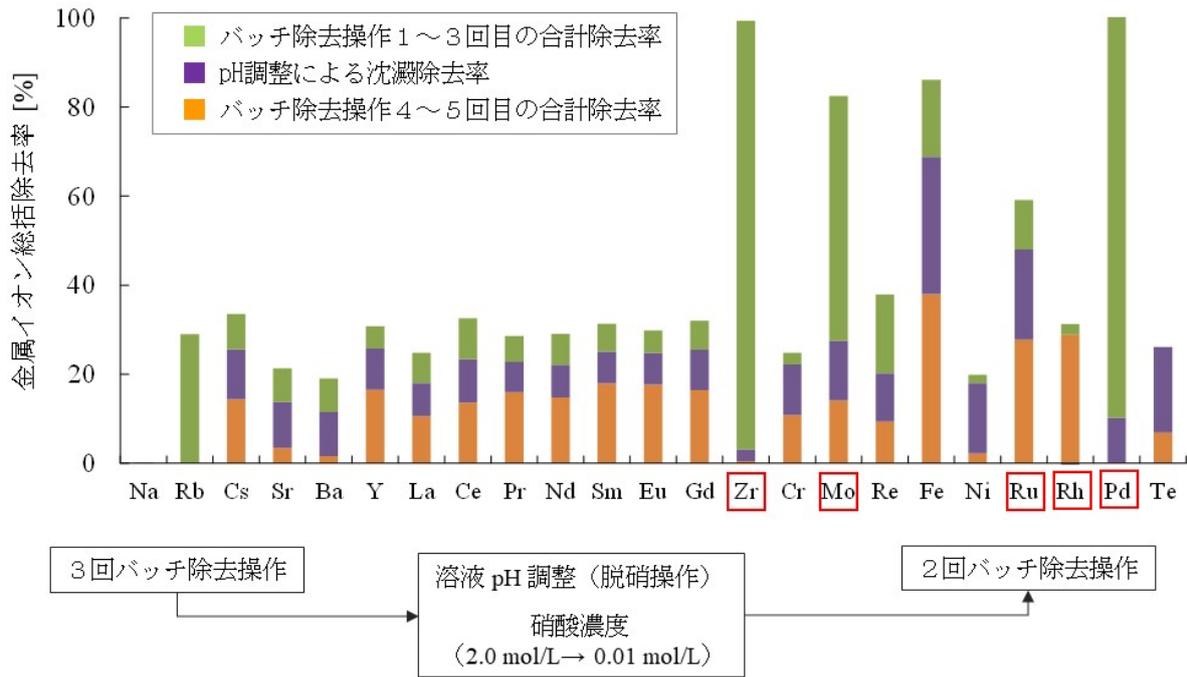


図 3.4-10 パン酵母（野生株）を用いる 23 金属元素模擬廃液（2.0 mol/L 硝酸水溶液）からの各種金属元素の総括除去率（5 回バッチ除去操作、各バッチ操作の酵母添加量 36 g/L）

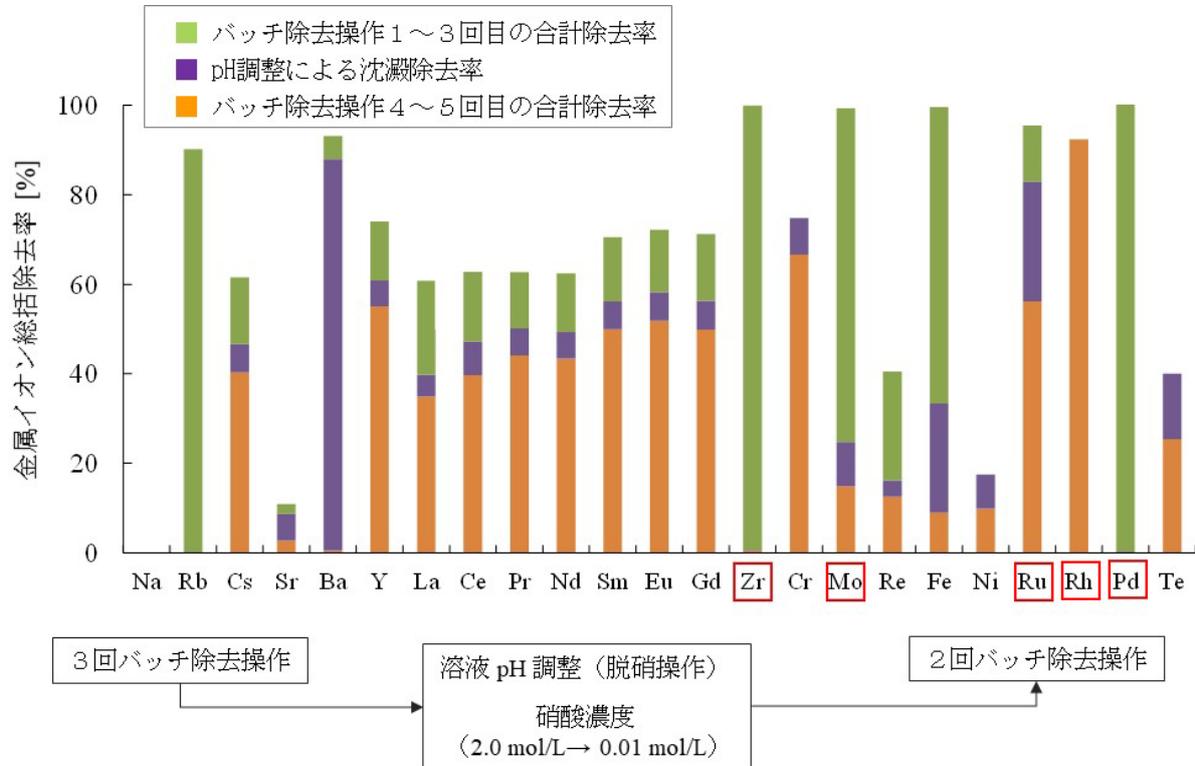


図 3.4-11 トルラ酵母を用いる 23 金属元素模擬廃液（2.0 mol/L 硝酸水溶液）からの各種金属元素の総括除去率（5 回バッチ除去操作、各バッチ操作の酵母添加量 36 g/L）

表 3.4-4 トルラ酵母を用いる 23 金属元素模擬廃液 (2.0 mol/L 硝酸水溶液) からのガラス固化妨害 5 元素総括除去率とバッチ除去操作回数との関係 (各バッチ操作の酵母添加量 36 g/L)

総括 除去率 [%]	回数					
	1 回目 (30 min)	2 回目 (30 min)	3 回目 (30 min)	pH 調整後	4 回目 (120 min)	5 回目 (120 min)
Pd	98	> 99	> 99	> 99	> 99	> 99
Zr	95	> 99	> 99	> 99	> 99	> 99
Mo	24	56	75	85	97	99
Ru	3	8	13	39	83	96
Rh	0	0	0	0	76	92

(6) 従来分離技術との比較検討【R3】

放射性廃液からガラス固化妨害元素である白金族金属およびモリブデンを分離除去する各種方法については、数多くの研究が活発に行われてきた。吸着法では、分離剤としてイオン交換樹脂、各種の無機系吸着剤（ゼオライト、フェロシアン化合物など）が研究開発されてきたが、廃液処理に伴う 2 次放射性廃棄物の発生が大きな課題となっている。また有機溶剤に溶解させた大環状化合物（複雑な環状構造をもつ有機物）等を抽出剤として用いる溶媒抽出法では、各種の金属イオンに対して高い選択性が保証されるが、後処理が困難な放射性有機廃液（抽出剤の希釈剤）を多量に排出する課題が顕在化している。これら従来の吸着法や溶媒抽出法の改善策として、溶媒抽出剤（液体）を担持させた多孔性シリカ/ポリマー複合粒子（粒径 50~100 μm ）を分離剤に用いる抽出クロマトグラフィが開発されているが、その実用化技術を開発するまでには至っていないのが現状である。

ここでは、原子力分野における従来分離技術として吸着法（無機系吸着剤）、溶媒抽出法、抽出クロマトグラフィに着目する。これらの従来分離法と新規バイオ分離法（分離剤として酵母を活用）との比較検討を、「分離効率」、「操作の簡便性」、「放射性廃液の大量処理」、「コスト」、「2 次放射性廃棄物の性状と発生量」の評価項目について行い、その結果を表 3.4-5 にまとめた。ただし、市販酵母が備える白金族金属の分離機能に対する検証は、硝酸環境下で γ 線照射 3.0 kGy 以下と限定されているとともに、23 金属元素（白金族元素、希土類元素、アルカリ金属元素、アルカリ土類金属元素、遷移金属元素）を含む模擬廃液を対象にしている。

表 3.4-5 に示すように、新規バイオ分離法については、分離剤として安価で大量入手が容易な市販酵母を用いて、模擬廃液 (2.0 mol/L) から白金族金属 (Pd) の高速・高効率な分離除去が簡便な操作で達成できる点、また汚染した酵母の乾燥・焼成によって 2 次放射性廃棄物の発生量を大幅に削減できる点が主な長所として期待できる。一方の短所としては、市販酵母を用いて白金族金属 (Ru, Rh) を効率よく分離除去するためには、脱硝操作（硝酸濃度を 2.0 mol/L から 0.01 mol/L に低減）が必要となる点が挙げられる。しかしながら、脱硝操作後の模擬廃液からは白金族金属 (Ru, Rh) を高効率にバイオ分離除去できることは注目に値する点である。

表 3.4-5 白金族金属 (Pd、Ru、Rh) に対する既存の湿式分離法と新規バイオ分離法の比較
(廃液中の白金族金属濃度：50～5000 mg/L を想定)

比較項目		新規バイオ 分離法	吸着法 (無機系吸着剤)	溶媒抽出法	抽出クロマト グラフィ
分離 効率	回収 速度	高	低 (吸着剤の細孔 内拡散が律速)	高	低 (吸着剤の細孔 内拡散が律速)
	回収率	Pd：高 Ru/Rh：低	Pd：高 Ru/Rh：低	Pd：高 Ru/Rh：低	Pd：高 Ru/Rh：低
操作 の 簡 便 性	分離	○ (槽型装置では 操作が簡便)	△ (カラム型装置で は操作が煩雑)	○ (槽型装置では操 作が簡便)	△ (カラム型装置で は操作が煩雑)
	分離後 の工程	△ (汚染した酵母 の固液分離法の 開発が必要)	△ (カラム装置では 汚染した吸着剤の 取出しが煩雑)	△ (抽出と逆抽出の 両操作が必要)	△ (吸着と溶離の両 操作が必要)
放射性廃液の 大量処理		○ (回収速度が高い ため、連続操作に よる大量処理 が容易)	△ (回収速度が低い ため、大型装置で の大量処理 となる)	○ (回収速度が高い ため、連続操作に よる大量処理 が容易)	△ (回収速度が低い ため、大型装置で の大量処理 となる)
コスト	分離剤	低 (市販の安価な 酵母を活用)	中 (吸着剤の化学合 成が必要)	高 (抽出剤の合成が 必要かつ高価)	高 (抽出剤の合成が 必要かつ高価)
	装置	○ (回収速度が高い ため、小型装 置で対応可能)	△ (回収速度が低い ため、装置が大型 化する)	○ (回収速度が高い ため、小型装置で 対応可能)	△ (回収速度が低い が、抽出剤が高密 度充填されるので 中型装置で対応)
二次 放射 性 廃棄物	性 状	微生物細胞	固体の吸着材	有機溶媒 (抽出 剤+希釈剤)	固体の吸着材、 溶離剤
	発生量	少 (乾燥/焼成で大 幅に減量可能)	中	多 (希釈剤が大量)	中

3.4.2 廃液の連続処理に関する検討【R2-R3】

実用化操業における放射性廃液の大量処理を想定し、連続槽型バイオ分離装置を用いて、パン酵母（野生株）による模擬廃液からのガラス固化妨害金属イオン除去機能を評価した。

令和2年度には、連続操作（攪拌槽への模擬廃液と乾燥パン酵母の連続的な供給・排出）によるバイオ分離実験装置を組み上げて試運転を行った。

令和3年度には、前年度に作製した実験装置を用いて連続操作による妨害イオンのバイオ分離除去実験を行い、平均滞留時間等の操作因子が妨害イオン除去速度に及ぼす影響について検討した。また、バイオ分離剤であるパン酵母（妨害金属イオン含有）の固液分離を簡便にするツールとして、パン酵母を予め内包したシームレスカプセルや不織布バッグの有効性について検討した。

(1) 連続槽型バイオ分離装置の準備【R2】

図3.4-12に連続槽型バイオ分離装置の概略図を示す。連続操作では、大気開放の恒温条件下において、攪拌槽（容積200 mL、液相攪拌回転数500 rpm）に模擬廃液およびパン酵母（乾燥酵母）を連続的に供給する。これと同時に、供給速度と同一の速度で、攪拌槽内の酵母懸濁液を系外に連続的に排出する。このため、攪拌槽内の酵母懸濁液の体積は一定に維持され、安定に連続操作を継続できる。連続操作において重要な操作因子は平均滞留時間（空間時間）であり、その定義は連続槽の容積[m³]を模擬液の供給・排出速度（通液速度）[m³/min]で除したものである。

本バイオ分離実験装置の試運転をPd/Mo系模擬廃液とパン酵母（乾燥細胞）を用いて行った。連続操作条件としては、模擬廃液の平均滞留時間は120 min、槽内パン酵母濃度は36 g/L（ 1.0×10^{15} cells/m³）、温度23±2 °Cである。攪拌槽に模擬廃液および乾燥酵母を一定速度で連続的に供給した後、所定の操作時間ごとに連続槽からの排出液の金属イオン濃度を測定する。模擬廃液の妨害金属イオン（Pd(II)、Mo(VI))除去率は、供給液と排出液の金属イオン濃度の差に基づいて物質収支から算出した。攪拌槽に模擬廃液とパン酵母の供給を開始してから360 min（平均滞留時間の3倍）が経過した後、排出液の妨害金属イオン濃度は一定値を示すようになり、

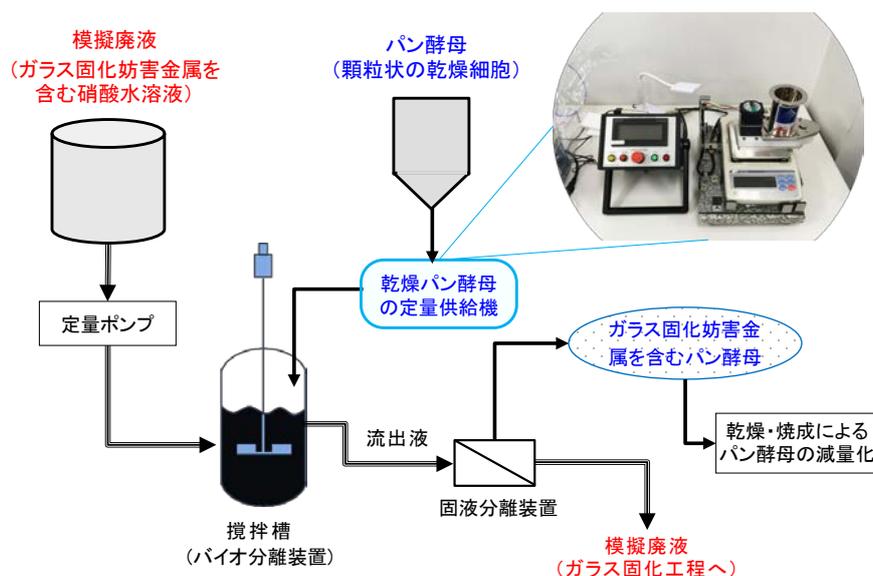


図3.4-12 連続槽型バイオ分離装置の概略図

連続操作におけるバイオ除去が定常状態に到達したことがわかった。定常状態における Pd (II) イオン除去率は 72%、Mo (VI) イオン除去率は 20%になることを確認した。

(2) 連続操作におけるガラス固化妨害金属イオン分離除去【R3】

連続槽型バイオ分離実験装置を用いて、パン酵母による Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からの妨害金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) 除去実験をパン酵母濃度 36 g/L、温度 34 °C の一定条件下で行った。図 3.4-13 は、連続操作における平均滞留時間を 3 水準 (10、30、60 min) に変化させて測定した排出液金属イオン濃度、金属イオン除去率を操作時間に対してプロットしたものである。各種の妨害金属イオンに対する排出液濃度および除去率は、それぞれの平均滞留時間 (連続槽の容積/廃液の供給・排出速度) において一定値に収束しており、連続操作が定常状態にあることが確認できる。また、連続操作における妨害金属イオン除去率の大小関係は、上述のバッチ操作の場合と同様に、Pd (II) > Zr (IV) > Mo (VI) の順番になることも確認した。

連続操作における平均滞留時間がパン酵母による妨害金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) 除去率およびその除去速度に及ぼす影響を図 3.4-14 に示す。ただし、妨害金属イオン除去速度は次式から求めた。

$$\text{妨害金属イオン除去速度} = (C_{in} - C_{out})F/V$$

ここで、 C_{in} は供給液金属イオン濃度 [kg/m³]、 C_{out} は排出液金属イオン濃度 [kg/m³]、 F は供給・排出液の体積流量 [m³/h]、 V は連続槽の容積 [m³] を示す。図 3.4-14 に示すように、平均滞留時間を 10 min から 60 min の範囲で変化させても、妨害金属イオン除去率は概ね一定値を示した。これ

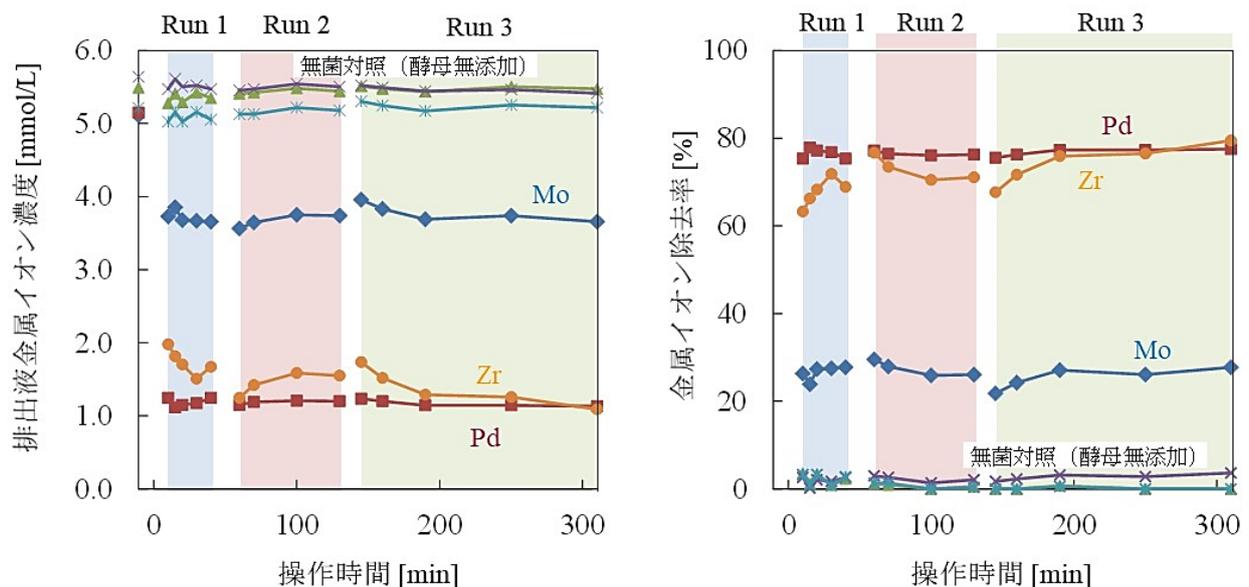


図 3.4-13 連続操作における Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からの妨害金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) バイオ分離除去 (槽内パン酵母濃度 36 g/L) .Run 1 : 平均滞留時間 10 min ; Run 2 : 平均滞留時間 30 min ; Run 3 : 平均滞留時間 60 min.

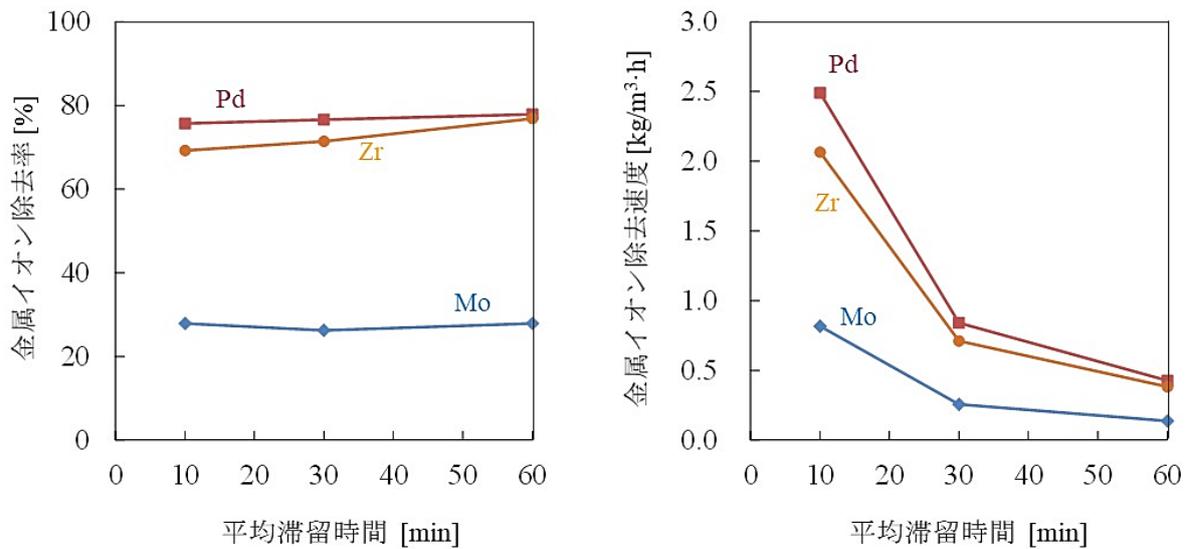


図 3.4-14 連続操作における Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液からの妨害金属イオン (Pd (II)、Zr (IV)、Mo (VI)) 除去率および除去速度に与える平均滞留時間の影響 (槽内パン酵母濃度 36 g/L)

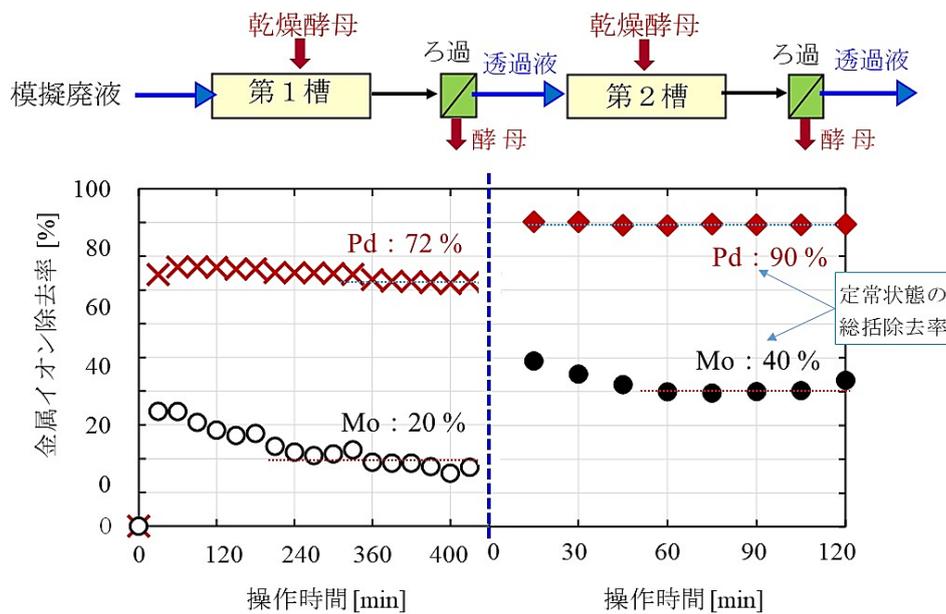


図 3.4-15 連続操作における Pd/Mo 系模擬廃液からの妨害金属イオン (Pd (II)、Mo (VI)) 総括除去率と連続槽台数の関係 (平均滞留時間 120 min、槽内パン酵母濃度 36 g/L)

は、パン酵母による妨害金属イオン除去が迅速に進行する現象であり、模擬廃液とパン酵母が接触して 10 min 以内の短時間で平衡状態に到達ことを示唆している。また、妨害金属イオン除去速度は平均滞留時間に逆比例して変化することがわかった。例えば Pd (II) イオンの場合には、平均滞留時間が 60 min から 10 min に減少するに伴い、除去速度は $0.43 \text{ kg/m}^3\cdot\text{h}$ から $2.5 \text{ kg/m}^3\cdot\text{h}$ に増加した。

連続操作における妨害金属イオン除去率を高める方策として、連続槽型バイオ分離装置を 2 台直列に連結したバイオ除去システムを構築し、その効果を定量的に把握した。本システムでは、第 1 槽からの透過液（排出液中のパン酵母を固液分離した後の溶液）を第 2 槽の供給液として用いて、第 1 槽と同様に連続操作によるバイオ除去実験を第 2 槽において行った。図 3.4-15 は、Pd/Mo 系模擬廃液からの妨害金属イオン（Pd (II)、Mo (VI)）除去率に及ぼす連続槽台数の影響を示したものである。模擬廃液の平均滞留時間は第 1 槽が 120 min、第 2 槽が 30 min であり、槽内パン酵母濃度は 36 g/L 、温度は $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ である。連続槽 2 台除去システムの妨害金属イオン総括除去率は、第 2 槽の排出液金属濃度と第 1 槽の供給液金属濃度の実測値を用いて、物質収支から算出した。連続槽を 1 台から 2 台に増加させるに伴い、Pd (II) イオンが 72%から 90%に増加するとともに、Mo (VI) イオンが 20%から 40%に倍増することが明らかになった。

(3) バイオ分離剤の固液分離を簡便にするツール【R3】

バイオ分離剤として各種酵母を用いて放射性廃液からガラス固化妨害元素を分離除去した後、廃液からの酵母細胞（妨害元素を含有）の固液分離を簡便にするツールとして、酵母細胞を封入した不織布バッグやシームレスカプセルを開発した。

① 不織布バッグ

パン酵母（野生株）を封入するバッグは、親水性不織布（開孔径 $< 1 \text{ } \mu\text{m}$ 、厚み $< 20 \text{ } \mu\text{m}$ 、日本バイリーン(株)製造）を封筒形状（ $15 \text{ mm} \times 55 \text{ mm}$ ）に成形したものである。この不織布バッグ内に所定量のパン酵母（野生型）を封入し、バッグ全体を生理食塩水中に浸漬した状態でコバルト 60γ 線を照射した。 γ 線照射実験は大阪府立大学放射線研究センターで実施し、その照射線量は 1.0 kGy および 3.0 kGy である。 γ 線照射後に生理食塩水から取り出した不織布バッグを水洗し、ガラス固化妨害金属イオン（Pd (II)）除去実験に供した。

Pd(II)イオン除去実験は、 γ 線照射した不織布バッグ（パン酵母を封入）を、ガラス製バイアル瓶に仕込んだ試験溶液（ 2.1 mmol/L 硝酸パラジウム水溶液、硝酸濃度 1.0 mol/L ）に浸漬させてバッチ操作で行った。操作条件は、空気開放下において、酵母添加量 18 g/L 、温度 $34 \text{ }^\circ\text{C}$ 、バッグと溶液の攪拌強度 120 rpm である。所定時間ごとに試験液の微量を採取し、液相 Pd (II) 濃度の経時変化を測定した。パン酵母による Pd(II)イオン除去率は、液相 Pd (II) 濃度の減少量から物質収支に基づき算出した。

線量範囲 $0 \sim 3.0 \text{ kGy}$ の γ 線を照射した不織布バッグ（パン酵母を封入）を用いて、Pd (II) イオン除去実験を行った結果を図 3.4-16 に示す。Pd (II) イオン除去率の経時変化は、不織布バッグ（パン酵母を封入）への γ 線照射（ $\leq 3.0 \text{ kGy}$ ）によって変化せず、30 min のバッチ操作で 30%に、120 min 後には 60%に達することがわかった。パン酵母とともに、バッグ素材である不織布自体も γ 線暴露（ $\leq 3.0 \text{ kGy}$ ）の影響を受けないことが明らかになった。

② シームレスカプセル

パン酵母（野生株）を内包させたシームレスカプセル（森下仁丹(株)製造）は、耐酸性・金属イオン透過性高分子皮膜から構成される球形粒子（直径 3 mm）である。このカプセルを生理食塩水中に浸漬した状態で、線量 1.0 kGy および 3.0 kGy のコバルト 60 γ 線を照射した。 γ 線照射後に生理食塩水から取り出したカプセルを水洗し、ガラス固化妨害金属イオン（Pd (II)）除去実験に供した。

Pd(II)イオン除去実験は、 γ 線を照射したシームレスカプセル（パン酵母を内包）を、ガラス製バイアル瓶に仕込んだ試験溶液（1.0 mmol/L 硝酸パラジウム水溶液、硝酸濃度 0.1 mol/L）に浸漬させてバッチ操作で行った。操作条件は、空気開放下において、酵母添加量 3.6 g/L、温度 34 °C、液相攪拌強度 120 rpm である。所定時間ごとに試験液の微量を採取し、液相 Pd (II) 濃度の経時変化を測定した。パン酵母による Pd(II)イオン除去率は、液相 Pd (II) 濃度の減少量から物質収支に基づき算出した。

シームレスカプセル（パン酵母を内包）による Pd (II) イオン除去率に及ぼす照射線量の影響を図 3.4-17 に示す。Pd (II) イオン除去率の経時変化は、カプセル（パン酵母を封入）への γ 線照射線量（ ≤ 3.0 kGy）に影響されずに急速に増加し、120 min 後には 61%に達した。シームレスカプセル（パン酵母を内包）が備える Pd (II) イオン分離機能は、 γ 線暴露（ ≤ 3.0 kGy）の影響を受けないことが明らかになった。

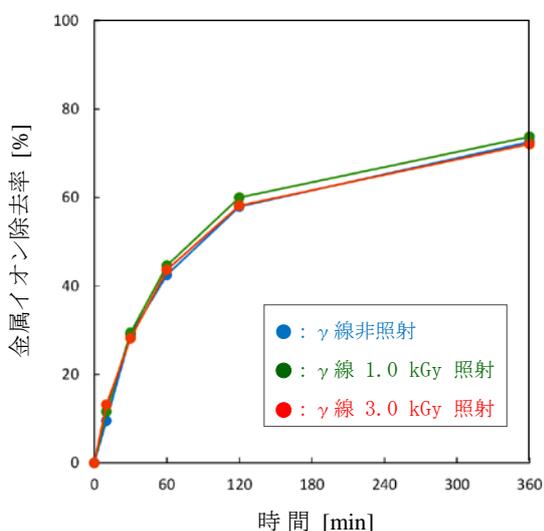


図 3.4-16 不織布バッグ(パン酵母封入)を用いる Pd(NO₃)₂ 水溶液からの Pd (II) イオン除去率に及ぼす γ 線照射の影響（液相 Pd 初期濃度 2.1 mmol/L、酵母添加量 18 g/L）

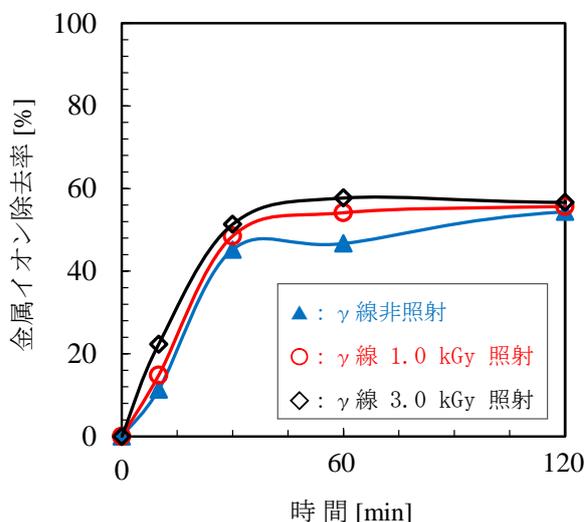


図 3.4-17 シームレスカプセル(パン酵母内包)を用いる Pd(NO₃)₂ 水溶液からの Pd (II) イオン除去率に及ぼす γ 線照射の影響（液相 Pd 初期濃度 1.0 mmol/L、酵母添加量 3.6 g/L）

3.5 研究推進【R2-R3】

本事業では、4名の研究者で研究組織を構成した。すなわち、化学工学・バイオ分離工学が専門の研究代表者がガラス固化妨害成分のバイオ分離除去操作に関する研究項目を担当した。また、放射線照射の生物影響評価を専門とする分担実施者がバイオ分離剤の妨害金属イオン分離機能に及ぼす放射線照射の影響評価、放射線化学・放射性廃棄物の減量化について研究実績を持つ分担実施者がガラス固化妨害成分を含むバイオ分離剤の脱水・減容化方法の確立、生物機能・バイオプロセス工学を専門とする分担実施者がバイオ分離剤の細胞表層の化学修飾による金属イオン選択性の発現を担当した。研究代表者の下で各研究項目の分担実施者との間で情報交換・議論を頻繁に行い、研究を進めた。

研究成果については、特許出願（特願 2021-135066 号）を令和3年8月20日に完了した後、令和3年9月10日には日本原子力学会 2021年「秋の大会」、令和4年3月17日には日本原子力学会 2022年「春の大会」において口頭発表した。

4. 結言

この研究では、模擬放射性廃液に含まれるガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Ru (III)、Rh (III)、Mo (VI)) を除去するための新しい分離剤としてパン酵母等の市販酵母に着目し、その分離機能に及ぼす放射線照射および硝酸酸性の影響について検証するとともに、妨害金属イオン除去率に及ぼす各種操作条件の影響について明らかにした。加えて、妨害金属イオンを含むパン酵母細胞の脱水・減容化方法、パン酵母 (野生株) 細胞表層に対して妨害金属イオン分離除去に有効な官能基を導入する化学修飾方法、市販酵母を用いる長寿命核種 Pd と短寿命核種 Ru・Rh の相互分離する操作方法についても開発した。

本研究において得られた成果は、次のとおりである。

(1) バイオ分離剤の妨害金属イオン分離機能に及ぼす放射線照射の影響評価

硝酸水溶液中においてコバルト 60 γ 線を照射したパン酵母等の市販酵母 (安全・低コストの普及品) をバイオ分離剤として用いて、Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液 (5.0 mmol/L 各金属濃度、2.0 mol/L 硝酸) からのガラス固化妨害金属イオン (Pd (II)、Ru (III)、Rh (III)、Mo (VI)) の分離除去実験を行い、過酷な環境下 (硝酸濃度 \leq 2.0 mol/L、 γ 線の線量 \leq 3.0 kGy) においても、パン酵母等の各種酵母が備えている妨害金属イオン分離機能が発揮されることを検証した。ただし、パン酵母の生理状態に関しては、 γ 線照射ならびに硝酸処理によってパン酵母細胞の生残率は低下するとともに、パン酵母細胞の酵素活性も低減することを確認した。

さらに、放射線抵抗性微生物に関する文献調査結果を参考に、過酷な環境下 (放射線照射・硝酸酸性) においてもパン酵母がガラス固化妨害イオン分離機能を備える要因について考察した。

(2) ガラス固化妨害成分を含むバイオ分離剤の脱水・減容化方法の確立

機械的脱水による減容効果を定量的に把握するために、バイオ分離剤であるパン酵母の濾過・脱水実験を行い、酵母細胞の減容化効果について評価した。その結果、液中に懸濁するパン酵母の固液分離には遠心沈降法が適しており、弱い遠心場 (600 G、10 min) でも酵母細胞が液中から完全に沈降し、堆積酵母の含水率が 70% 程度になることがわかった。

乾燥・焼成によるパン酵母細胞の減容効果を評価するために、ガラス固化妨害成分を含むパン酵母 (湿潤細胞) に対して示差熱・熱重量分析を行い、操作温度と細胞減量化率との関係を明らかにするとともに、パン酵母の焼成後に残渣となる無機灰分量を把握した。パン酵母 (Pd、Zr を含む湿潤細胞) は、乾燥処理 (50 $^{\circ}$ C、30 h) によって初期質量の 30%程度、さらに乾燥細胞の焼成処理 (500 $^{\circ}$ C 付近) によって初期質量の 2%程度まで減量できることを示した。

(3) バイオ分離剤の細胞表層の化学修飾による金属イオン選択性の発現

バイオ分離剤であるパン酵母による妨害金属イオン (Pd (II)、Mo (VI)) 吸着に寄与する官能基 (細胞表層) を同定するため、妨害金属イオン分離除去実験の前後のパン酵母 (乾燥細胞) に対して FT-IR-ATR 分析を行った。その分析結果から、パン酵母による Pd (II) イオンの分離除去においては、細胞表層に存在するタンパク質中のアミノ基およびカルボキシル基が寄与していることを明らかにした。

また、パン酵母 (野生株) の細胞表層にリン酸基を導入したパン酵母 (化学修飾株) および市販の飼料用酵母をバイオ分離剤として用いて、Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液 (5.0 mmol/L 各金属濃度、2.0 mol/L 硝酸) から長寿命核種 Pd・Zr を選択的除去 (有害度低減) するとともに、短寿命核種 Ru・Rh を選択的分離 (資源化) できる操作方式と操作条件を提案した。

(4) ガラス固化妨害成分のバイオ分離・除去操作の確立

Pd/Mo/Ru/Rh/Zr/Nd 系模擬廃液 (5.0 mmol/L 各金属濃度、2.0 mol/L 硝酸) を対象に、パン酵母 (野生株) によるガラス固化妨害金属イオン分離除去実験をバッチ操作法で行い、各種因子 (酵母添加量、硝酸濃度、共存金属イオン) が各妨害金属イオン除去率に及ぼす影響を明らかにした。特に、パン酵母による妨害金属イオン (Pd (II)) 除去率は、共存イオン (Zr (IV)、Nd (III)) によって影響されなかった。パン酵母および飼料用酵母による 6 種金属イオン分離除去の選択性は、次の序列に従って変化することも明らかにした。

Pd(II) > Zr(IV) > Mo(VI) > Ru(III) > Rh(III)、Nd(III)

また、パン酵母 (野生株) を利用するバイオ分離除去における問題点を洗い出し、妨害金属イオン除去率を向上させるための改善策として多回バッチ操作方式の採用、新たなバイオ分離剤としてのパン酵母 (化学修飾株) および飼料用酵母の活用に取り組み、問題点に対する解決策を提案・実践した。特に、23 金属元素系模擬廃液 (ガラス固化妨害元素、希土類元素、アルカリ金属元素、アルカリ土類金属元素等を含む硝酸溶液) を対象に、ガラス固化妨害元素 (Pd、Mo、Ru、Rh) に対する除去率が 90%以上、23 元素のうちの 18 元素に対する除去率が 60%以上となるバイオ分離操作条件を確立した。以上の実験データを基に、廃液からのガラス固化妨害元素の分離除去を想定して、本バイオ分離法と既存の分離方法を定性的に比較した。

さらに、放射性廃液の大量処理を想定し、連続槽型バイオ分離装置 (攪拌槽への模擬廃液と乾燥パン酵母の連続的な供給・排出) による妨害イオンのバイオ除去実験を行い、平均滞留時間 (槽容積/廃液の体積流量) および連続槽の連結台数が妨害イオン除去速度に及ぼす影響を定量的に把握した。これと併せて、バイオ分離剤である酵母細胞 (妨害イオン含有) の固液分離を簡便にするツールとして、バイオ分離剤を封入したカプセル、不織布バッグの有効性を示した。

本研究成果は、放射性廃液に含まれるガラス固化妨害元素に対する新規分離剤としてパン酵母等の市販酵母が適用できることを示唆するものと考えるが、あくまでも模擬廃液 (23 金属元素を含む硝酸溶液) を対象に得られた実験データ (コールド試験) に基づくものである。本研究の次のステップとしては、放射性物質が存在する放射性廃液 (実液) を対象にしたホット試験であることは論を俟たない。今後、ガラス固化妨害元素だけでなく種々の放射性物質に対する分離除去操作において、パン酵母等の市販酵母が新規分離剤として活用できるかどうかを検証することが肝要である。過酷な環境下 (放射線、硝酸酸性) においてもパン酵母等が備えるガラス固化妨害元素等の分離機能が十分に発揮されることが実証できた暁には、その実用化技術の創出を目指し、バイオ分離除去試験の規模をビーカースケールからペンチスケールにスケールアップするプロセス工学的研究へと繋がる。