

芝草によるビスフェノール A の 環境負荷低減活性についての研究

～芝草管理溶液中溶存 BPA 減少の検証 第二報～

バイオサイエンス学科 3年

間原 相原 楠 小牧 堂脇 長島 花川

<緒言>

環境問題の一つとして、ビスフェノール A (以下 BPA) 等の「内分泌攪乱化学物質」による影響が懸念されている。エポキシ樹脂等に用いられるこの BPA は、生物のホルモン受容体と結合し、エストロゲン様活性を示す作用がある。

低濃度、広範囲に存在する有害物質によって汚染された環境を効率よく浄化・修復できる方法としてファイトレメディエーションがある。ファイトレメディエーション対象植物として身近に存在する、安価で広範囲に生育が可能な芝草に注目した。

<目的>

昨年度の卒業研究で、芝草による管理溶液及び芝草体内抽出溶液の BPA 減少が報告された。本実験では昨年度の結果の再現性を確認する。

<実験材料>¹⁾

I. 供試試料

1. 供試芝草：ベントグラス (Penn G-2)
2. BPA 濃度：20 mg/l
3. 管理溶液：微粉ハイポネックス 10⁴ 倍希釈溶液 (N:P:K=6.5:6:19)
4. 分析方法：管理溶液に BPA を添加し、芝草を浸漬一定時間経過後
管理溶液と芝草体内の BPA 抽出、HPLC での測定を行った。

II. 供試試薬

環境分析用 BPA、環境分析用 BPF、高速液体クロマト用アセトニトリル、ジクロロメタン、アセトン、塩酸、無水芒硝、塩化ナトリウム
(特に指定したもの以外は和光純薬製試薬特級)

<実験方法>¹⁾

I. HPLC 条件

ポンプ：島津 LC-10AT

カラム：L-column ODS (化学物質評価研究機構)

長さ 25cm×内径 4.6mm×粒径 3 μ m

移動相：アセトニトリル：水=1：1

検出器：島津 SPD-10AT

検出波長：235nm

流量：1ml/min

注入量：20 μ l

II. 検量線

下記の条件に基づいて、検量線を作成した

1. 内部標準法

ビスフェノール F (以下 BPF) を内部標準物質として用いた

2. 検量線の条件

BPA濃度 (ppm) : 0、1、2、3、5、10、20

BPF濃度 (ppm) : 2

AAT : 6

3. 方法

- 1) BPA、BPF を 100 mg 秤量後、それぞれメタノールで希釈、100ml に定容し 1000ppm の BPA 及び BPF 標準溶液を調製した。
- 2) BPA 及び BPF 標準溶液をアセトニトリルで希釈し、検量線用各濃度溶液を調製した。
- 3) BPA と BPF 混合溶液のクロマトグラムは図 1 の通りである。

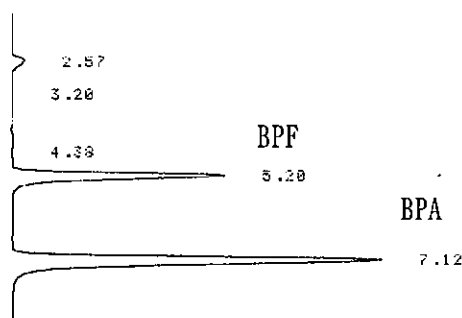


図 1. 実際使用した検量線用クロマトグラム (一例)

4. 内部標準法の検量線は図2の通りであり、直線関係が得られた。

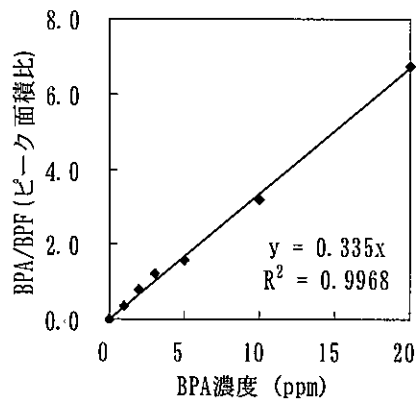


図2. 管理溶液用の内部標準法によるBPA検量線

III. 芝草の管理溶液中溶存BPA減少の評価実験

1. サンプルング

- ・経過日時：BPA標準溶液を添加後、
0、5時間、1日、2日、3日、4日後 (n=2)
- ・分取量：管理溶液及び洗液を併せて塩酸でpH3.0~3.5に調整後、
一定量に定容し、10ml分取した。

2. 抽出操作及び測定

- 1) 10ml分取したものを分液ロートに入れ、
飽和食塩水20mlとジクロロメタン10mlを加えて、10分間振盪した。
- 2) 静置して、2層に分離した後、下層のジクロロメタン層をビーカーに取り、
水層に新しいジクロロメタンを10ml加えて、もう一度同様の操作を行った。
- 3) 2回分のジクロロメタン層を無水芒硝で脱水後、ナス形フラスコに移した。
これをロータリーエバポレーターで濃縮乾固した後、更に5分間継続した。
- 4) アセトニトリルを加え、超音波で再溶解後、BPF標準溶液を添加し10mlに定容、
試料液とした。
- 5) HPLCで測定し、検量線からBPA濃度を算出した。

<結果>

I. 管理溶液中溶存 BPA の結果

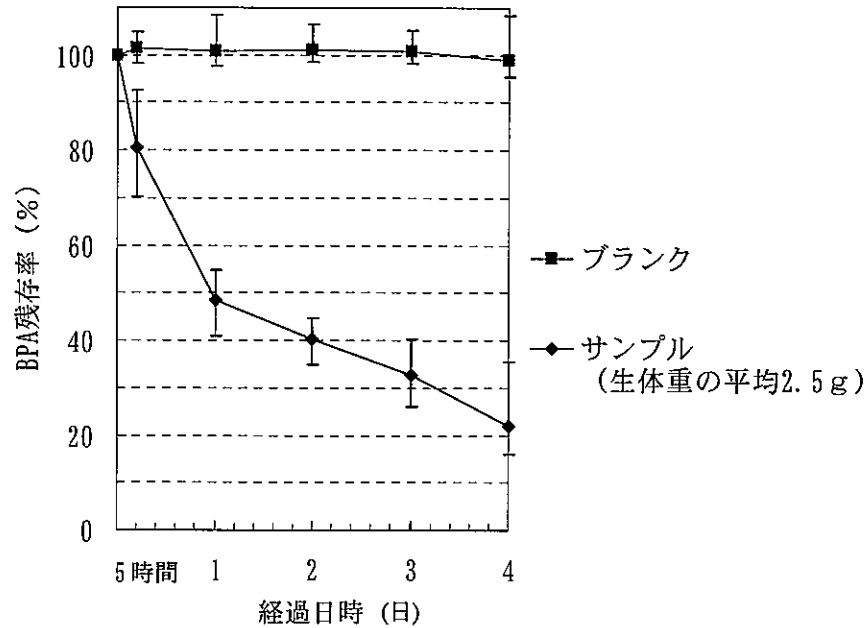


図 3. 管理溶液中溶存 BPA の経時的変化

II. 芝草体内 BPA 吸収量の結果

昨年度と同様に、芝草体内に BPA が吸収され、さらに一定時間経過後、減少する傾向がみられた。

しかし、得られたデータは以下の理由により、更なる検討をする必要があったので割愛した。

- ・ 個体差に差があり、減少する傾向にばらつきがあった。
- ・ 芝草体内に吸収された後の、メカニズムが確認出来ていない。

<考察> 2, 3, 4, 5)

芝草に個体差はあるが、管理溶液中溶存 BPA が減少するという結果が得られた。これにより昨年度の研究結果の再現性が確認出来た。

文献を参照すると、以下のような報告がされている。

- ①ポーチュラカの植物体において、BPA は主に根の分泌物により代謝される。
- ②タバコでは、細胞と実生は植物体内に存在する酵素によって BPA が配糖体にされると考えられる。
- ③イネの幼苗では、BPA を植物体内に吸収し、大半は酸あるいはアルカリによる加水分解では遊離しない重合体、あるいは植物体との結合を形成すると判断された。

芝草は、イネ科に属していることから③のような挙動をするのではないかと推察される。

<謝辞>

今回の卒業研究を熱心にご指導して下さいました

故 川口 幸夫先生

大変貴重なベントグラスの種子をご提供、育生に関する親切丁寧なご指導を賜りました

関西グリーン研究所

第1研究室室長 大阪府立大学名誉教授

一谷 多喜郎先生

第4研究室

森 将人 先生

分析技術等に関するご支援、ご協力を賜りました

株式会社 田岡化学分析センター 奥田 幸恵 様、 奥村 敏 様

に心より厚く御礼申し上げます。

<参考文献>

- 1) 妹尾 慎吾, 山内 英嗣, 吉田 直人, 竹田 寛生, 家谷 崇弘, 西村 憲弘, 和泉 達也
発行年月日: 2006年3月13日
芝草によるビスフェノールAの環境負荷低減活性についての研究
大阪ハイテクノロジー専門学校 平成17年度 卒業研究報告集バイオサイエンス学科 頁1-8
- 2) 平田 牧正, 宮坂 均, 奥田 博史
発行年月日: 2006年11月
園芸植物を利用したファイトレメディエーション-ポーチュラカを用いた環境ホルモンの浄化
雑誌名: 農業電化 59巻12号 頁14-16
- 3) NOUREDDIN M I, FURUMOTO T, YAMAGISHI M, FUKUI H, ISHIDA Y
発行年月日: 2004年3月31日
内分泌攪乱候補物質の一つであるビスフェノールAのイネ幼苗による吸収, 転送, 代謝
雑誌名: 生物環境調節 第42巻 頁31-40
- 4) 独立行政法人 国立環境研究所
発行年月日: 2003年9月
環境ホルモンの分解処理要素技術に関する研究(内分泌攪乱化学物質総合対策研究)
雑誌名: 国立環境研究所特別研究報告 頁37-56
- 5) 海見 悦子, 向谷 司, 三好 祥司, 玉置 雅彦
雑誌名: 第11回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 要旨集
- 6) 葭田 隆治: やさしい芝草の生理: グリーン研究所資料
No. 341 (第85回グリーン研究会大会: 講演資料)

－補完－

芝草体内に存在する BPA の定量実験

<実験材料>¹⁾

芝草の管理溶液中溶存 BPA 減少の評価実験と同様

<実験方法>¹⁾

I. HPLC 条件

芝草の管理溶液中溶存 BPA 減少の評価実験と同様

II. 検量線

1. 内部標準法

BPF を内部標準物質として作成

2. 検量線の条件

BPA濃度 (ppm) : 0, 0.05, 0.1, 1, 2, 3

BPF濃度 (ppm) : 2

AAT : 4

3. 方法

芝草の管理溶液中溶存 BPA 減少の評価実験と同様

4. 内部標準法の検量線は図 4 の通りであり、直線関係が得られた。

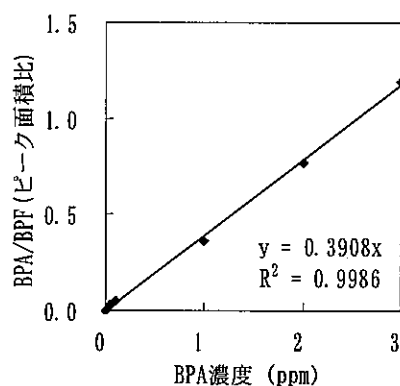


図 4. 芝草体内抽出溶液用の内部標準法による BPA 検量線

III. 芝草体内に存在する BPA の定量実験

1. サンプルング

・経過日数：BPA 添加後、

0, 5 時間, 1 日, 2 日, 3 日, 4 日後 (n=2)

・分取量：芝草全量/1 コップ

2. 抽出操作及び測定

- 1) 芝草を水で洗浄し付着水を除き、地上部、地下部の長さを測定し、生体重を秤量後、細かく切り刻み、蒸留水を約 100ml 加えて、10 分間ホモジナイズした。この時、始めの 3 分間は 2500rpm と 7000rpm を 10 秒交替、残りの 7 分間は 5000rpm でホモジナイズした。
- 2) ホモジナイズされたものを塩酸で pH 3.0~3.5 に調整し蒸留水で一定量に定容した。
- 3) ろ紙 (No.2) でろ過後 10ml 分取し、分液ロートに入れ、飽和食塩水 20ml とジクロロメタン 50ml を加えて、10 分間振盪した。
- 4) 静置して、2 層に分離した後、下層のジクロロメタン層をビーカーに取り、水層に新しいジクロロメタンを 50ml 加えて、もう一度同様の操作を行った。
- 5) 2 回分のジクロロメタン層を無水芒硝で脱水後、ナス形フラスコに移した。これをロータリーエバポレーターで濃縮乾固した後、更に 5 分間継続した。
- 6) アセトニトリルを加え、超音波で再溶解後、BPF 標準溶液を添加し 10ml に定容、試料液とした。
- 7) HPLC で測定し、検量線から BPA 濃度を算出した。

<結果>

芝草体内の BPA は、一度ベントグラス中に吸収された後、5 時間後を境に減少するという傾向がみられた。

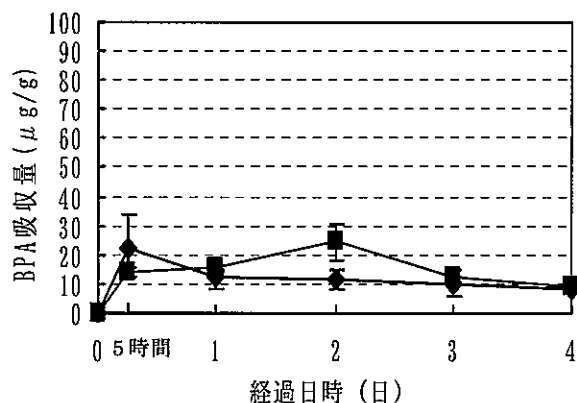


図 5：芝草 1g 当りの BPA 吸収量の経時的変化

<考察>

芝草管理溶液に添加した BPA 量に対して、芝草体内 BPA 吸収量は微量であった。(図 5) これは、植物体内の作用が関係していると考えられる。

文献によると、以下のような報告がされている。

- ①タバコでは、細胞と実生は植物体内に存在する酵素によって BPA が配糖体にされると考えられる。
- ②イネの幼苗では、BPA を植物体内に吸収し、大半は酸あるいはアルカリによる加水分解では遊離しない重合体、あるいは植物体との結合を形成すると判断された。

芝草は、イネ科に属することから②のような挙動をするのではないかと推察される。

<感想>

間原

この一年間、卒業研究のチームリーダーをしてきましたが、班員への説明不足、コミュニケーション不足や、米原先生に対する姿勢などから、本当に迷惑をかけてしまいました。しかも、実験当初では芝草が思い通りに育たなかったり、実験が思う様に進まなかったり、私自身たくさんのミスをし、実験を辞めたいと思うこともありました。しかしそれでも、班員に励まされながら自分自身を見直し、米原先生の言葉を心に置き、最後まで実験を続けてきました。そのおかげで物事に取り組む姿勢や人間関係を改めて考えさせられました。また、自分自身が成長出来たことが良かったと思います。

最後になりましたが、今回卒業研究を進めていく上でご指導を頂いた先生に深く感謝致します。

相原

私は今回の卒業研究でチームワークの難しさ、大切さを、身を持って感じる事が出来ました。また、毎日遅くまで取り組み、弱音を吐くこともありましたが、卒業研究を最後までやり遂げたことは達成感と共に私に大きな自信を与えてくれた気がします。

最後の最後まで米原先生には熱心にご指導して頂き、大変感謝しております。

楠

今回、卒業研究を通して、「研究」をするということがいかに大変であり、努力が必要であるかを学ぶことができました。この経験を活かしつつ、自分の更なる飛躍に繋げていきたいと思えます。今回の研究を最後まで熱心にご指導下さった米原先生には心より感謝しております。そしてこの研究に携わった全ての方々にも感謝しております。

小牧

卒業研究が始まってから今まで、この授業からとても影響を受けました。チーム構成の授業であったので、メンバーとの意識確認の大切さ、インストラクターの先生や諸先生方との関わり方等、普段の授業からは感じ取ることのできないものをたくさん得ることが出来ました。1つの班で動くことがこれほど大変なものかと思い知りました。実験内容だけでなく、あらゆる方々から様々な刺激を受け、自分にも磨きがかかったと思えます。卒業研究を通して関わってきた方々に、厚く御礼申し上げます。

堂脇

卒業研究を一年間行ってきて、研究は一人ではできないということ、班員が力を合わせる事がとても大切だと学びました。実験が思うように進まず、データがとれなかったときには理由がわからず、毎日悩んでばかりいました。けれど、今はそのことで自分自身が成長できたと思います。

最後に、今までお世話になりました多くの方々と、インストラクターである米原先生、班員の皆様に心より厚く御礼を申し上げます。

長島

私は卒業研究を通して、さまざまな事を学びました。分析方法や分析機器の使い方、データやノートなどをまとめることの大切さ。一番勉強になったのはコミュニケーションの大切さです。いろいろあって体調を崩すこともありましたが、メンバーの支えのおかげで最後までやり遂げることが出来ました。

最後になりましたが、今までお世話になりました先生方、最後まで一緒に頑張ってきたメンバーに心より厚く御礼申し上げます。

花川

卒業研究を通して思ったことは、コミュニケーションが大切だということです。コミュニケーション不足で一時期チームがまとまらないといったことがありました。社会に出ても大切な事なので学生のうちに再認識することができよかったです。

最後に、卒業研究を進めていく上でいろいろとお世話になりました方々、ご指導して下さいましたインストラクターの米原先生、またチームメンバーに心より厚く御礼申し上げます。