

ユリオプスデージーによるアセトアミノフェンの除去

長谷川有紀^{*1}、酒井万里奈^{*2}、佐々木佑季^{*2}、
八束 絵美^{*3}、山尾 千晶^{*4}、張野 宏也^{*5}

The Purification of Acetoaminophen Using *Euryops pectinatus*

HASEGAWA Yuki^{*1}, SAKAI Marina^{*2}, SASAKI Yuki^{*2},
YATSUZUKA Emi^{*3}, YAMAOKI Chiaki^{*4}, HARINO Hiroya^{*5}

*1 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 元嘱託教学職員、
地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 研究員

*2 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 卒業生

*3 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 元嘱託教学職員、三浦市立三崎小学校 教諭

*4 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 元嘱託教学職員

*5 神戸女学院大学 人間科学部 環境・バイオサイエンス学科 教授

連絡先：張野宏也 harino@mail.kobe-c.ac.jp

要 旨

植物による水中のアセトアミノフェンの除去を検討した。アセトアミノフェンの除去率はキンセンカ (*Calendula officinalis*)、ユリオプスデージー (*Euryops pectinatus*)、ペパーミント (*Mentha piperita*)、ボンボンデージー (*Bellis perennis*)、アリッサム (*Lobularia maritima*) の順に高かった。キンセンカは調査期間に枯れてしまったので、次に除去率の高かったユリオプスデージーに焦点をあてて、除去する際の条件を検討した。アセトアミノフェンの水中の濃度が 1 mg/L と 10 mg/L では、除去率に差はみとめられなかったが、明所よりも暗所で栽培した方が除去率は高かった。ユリオプスデージーの浄化のメカニズムを解明するために、根、茎、葉にわけて濃度を測定した。水中から吸収したアセトアミノフェンの濃度は、他の部位に比べて茎が高かった。さらに、水と植物体内の濃度に基づきアセトアミノフェンの重量を算出すると、10日間で約92%のアセトアミノフェンが消失していたことから、分解していることが示唆された。

キーワード：植物浄化、アセトアミノフェン、ユリオプスデージー

Abstract

The removal of acetoaminophen in water samples was investigated using plants. The removal rates of acetoaminophen were high in the order of Pot Marigold (*Calendula officinalis*), Gray-leaved euryops (*Euryops pectinatus*), Peppermint (*Mentha piperita*), Tyrolean daisy (*Bellis perennis*) and Alyssum (*Lobularia maritima*). The removal conditions of acetoaminophen were studied using Gray-leaved euryops, because Pod marigold died down in the study period. When the concentration of acetoaminophen in water samples was adjusted to 1 and 10 mg/L, no differences of removal rates between them was observed. Furthermore, the removal rate of acetoaminophen by Gray-leaved euryops which was grown in the dark was higher than those in the light. The removal mechanism of acetoaminophen was studied by measuring the concentrations of acetoaminophen in root, stalk and leaf. It is suggested that acetoaminophen which absorbed from water samples, was degraded in plant.

Keywords: phytoremediation, acetoaminophen, Gray-leaved euryops

1 研究の背景

PPCPs (Pharmaceutical and Personal Care Products) とは、医薬品、化粧品やパーソナルケア用品等私たちの生活関連品に含まれる化学物質の総称である。1990年代以降、PPCPsによる水生生物や植物などの生態系に対する影響が研究され、その結果ミジンコ等の遊泳阻害¹⁾や抗生物質に対してウイルスや細菌が耐性を有するようになる²⁾等の悪影響が認められた。これら物質の物理化学的性質は、難分解性であり水溶性の高いものがほとんどであるため、生活排水中に含まれるこれら物質が下水処理場で処理されず、河川に流出していることが報告されている³⁾。特に市販の風邪薬等に鎮痛剤の成分として含有されているアセトアミノフェンは、世界中で広く汎用されている薬品の1つであり⁴⁾、ブラジルでは34.6 ng/L⁵⁾、南アフリカでは6.09 ng/L⁶⁾、ポルトガルでは527 ng/L⁷⁾、シンガポールでは485.5 ng/L⁸⁾というように世界中の河川や下水処理場の流入・流出水で ng/L レベルで検出されている。医薬品は低濃度で人体に影響をもたらしたり、水生生物に対しても増殖や産卵、生育等を阻害することが懸念されている⁹⁾ため、水環境中に流出した PPCPs を除去する必要がある。

水域、土壌、大気等に含まれる有害な化学物質を除去する技術の一つとしてバイオレメディエーション (Bioremediation) という方法があり、その中でも植物を用いて汚染物質を除去することをファイトレメディエーション (Phytoremediation) という¹⁰⁾。この方法は、環境への負荷が少なく化学的手法よりも低コストであり、ピオトップとしての活用や環境教育の場の提供等のさまざまな長所を有する。しかし、処理効率が気温や天気によって左右される、広大な面積を要する、浄化速度が遅い、植物に汚染物質が蓄積するためその処理方法が確立されていない等の短所もある。先行研究において、オオフサモは栄養塩類等¹¹⁾を、ホテイアオイはヒ素、カドミウム、銅、クロムなどの重金属¹²⁾を浄化することが報告されている。実際に国内では、ヨシは野尻湖、八郎湖や大沼、さらに野尻湖ではマコモ、ガマ、フトイ等の在来植物が栄養塩類等を浄化する植物として実用化されている¹³⁾。このように、ファイトレメディエーションの対象物質は無機物や金属類が多く、有機物質としては、シロツメクサを用いてジベンゾフラン¹⁴⁾の除去、コウキクサやホテイアオイはアセトアミノフェン、イブプロフェン、ナプロキセンやメフェナム酸に対して浄化能力がある¹⁰⁾という報告があるだけである。

本研究では、河川中において高濃度で検出されているアセトアミノフェンを除去することができ、水耕栽培できる陸上植物を中心に調べた。さらに、除去するメカニズムについても検討し、実用化に向けた基礎データを採取することを目的とした。

2 実験

2-1 植物

植物として、陸上植物のなかで水耕栽培ができるユリオプスデージー (*Euryops pectinatus*)、アリッサム (*Lobularia maritima*)、ポンポンデージー (*Bellis perennis*)、キンセンカ (*Calendula officinalis*)、ペパーミント (*Mentha piperita*) を用いた。

2-2 浄化試験

2-2-1 浄化できる植物の検討

1000 mL 容メスフラスコに、ジメチルスルホキシド (DMSO) でアセトアミノフェンを 1000 mg/L に調製した溶液を 10 mL 添加し、10 mg/L のアセトアミノフェン水溶液を調製した。10 mg/L に調製したアセトアミノフェン水溶液 300 mL を 300 mL 容のコニカルビーカーに各々入れ、ユリオプスデージー、アリッサム、ポンポンデージー、キンセンカまたはペパーミントの 1 苗と根を固定するため脱脂綿 (5 cm × 5 cm) を用いて固定した。コントロールとして蒸留水を用いて同様の試験を準備した。試験開始日とその 1 週間後に採水し、アセトアミノフェンの濃度を測定した。

2-2-2 ユリオプスデージーを用いた浄化試験

10 mg/L アセトアミノフェン水溶液とそれを蒸留水で 10 倍希釈した 1 mg/L アセトアミノフェン水溶液を調製し 300 mL をコニカルビーカーに入れた。ユリオプスデージー 1 苗を脱脂綿で固定し、明所と暗所に放置した。経日ごとにビーカー上に水面を示す線を引き、蒸発による減少量を把握するとともに、蒸発した分だけ蒸留水を加えた。0、1、3、6、8、12 日後に 2 mL 採水しアセトアミノフェンの濃度をフォトダイオードアレイ付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC/PDA) で測定した。

2-3 アセトアミノフェン除去のメカニズムの検討

根圏微生物による分解を検討するために、オートクレーブでユリオプスデージーの根に付着している微生物を滅菌した。また、蒸留水をオートクレーブで加熱滅菌し常温に戻った後、1000 mg/L アセトアミノフェン DMSO 溶液を添加し、10 mg/L アセトアミノフェン水溶液を調製し、それを蒸留水で 10 倍に希釈し 1 mg/L アセトアミノフェン水溶液を調製した。300 mL 容コニカルビーカーに 1 mg/L アセトアミノフェン水溶液を 300 mL とユリオプスデージー 1 束を入れ、0、1、2、3、7、9、14 日後に 2 mL 採水し、アセトアミノフェンの濃度を HPLC/PDA で測定した。同時に普通寒天培地に試水を 0.1 mL 塗布し 36 ± 1 °C で 24 時間培養後一般細菌数を計測した。

また、ユリオプスデージーのアセトアミノフェンの吸収の有無を確認するために、水中のアセトアミノフェンの濃度が減少した 10 日後にユリオプスデージーを取り出し、根、茎、葉にわけて重量を測定後、植物体内のアセトアミノフェン濃度を測定するために、化学分析に供した。

2-4 化学分析

2-4-1 水中のアセトアミノフェンの測定

HPLC/PDA の送液ユニットは LC-20A (株式会社島津製作所)、UV-VIS 検出器は SPD-20 (株式会社島津製作所)、カラムオープンは CTO-10ASVP (株式会社島津製作所)、カラムは Wakosil-II 5C18 HG (ID 4.6 mm×150 mm) を用いた。カラム恒温槽温度は40℃に保ち、移動相は 1 N 酢酸水溶液70%とメタノール30%のアイソクラチックで0.5 mL/min の流速で流した。注入量は20 μL、波長は254 nm で測定した。

2-4-2 植物中のアセトアミノフェンの定量

植物の根、茎、葉の重さを測定した。その後、各部位から 1 g を遠心分離管に取り、サロゲートとして 2 mg/L アセトアミノフェン-d₄ を 200 μL 加え、50%アセトン含有エタノール溶液 30 mL を加えホモジナイズした。10分間の遠心分離後、上澄み液を 6 mL ずつ採取した。それらに蒸留水を加え 25 mL までメスアップ後吸引ろ過し、抽出液を得た。50%酢酸含有アセトン溶液 2 mL、メタノール 2 mL、蒸留水 3 mL で洗浄した Oasis-HLB (日本ウォーターズ株式会社) に抽出液を通水後、メタノール含有水溶液 1 mL (メタノール：水 = 1：9) で洗浄した。このカラムを 3000 rpm で 20分間遠心分離することで脱水後、50%酢酸含有アセトン溶液を 1 滴/秒の速さで 6 mL 流すことで試料を溶出した。溶出液は窒素で 1 mL まで濃縮し、BSTFA (N, O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide) を 100 μL 添加後、85℃で 1 時間半加熱させて誘導体化を行い GC/MS 用試料とした。

GC/MS は Agilent technologies の 6890N Networks GC system、オートサンプラーは 7683 Series、質量分析計は Mass Selective Detector 5973 Network を用いた。カラムは Inert Cap 5MS-NP (30 m×0.25 mm×0.25 μm) を用い、70℃で 1 分間保持後、20℃/min で 180℃まで、次いで 6℃/min で 250℃まで、さらに 30℃/min で 300℃まで昇温した。注入量は 1 μL、スプリットレス方式で行った。データの取り込みは SIM モードで行い、定量用として 223、確認用として 208 を用いた。

3 結果・考察

3-1 植物 5 種による浄化の検討

ユリオプスデージー、アリッサム、ポンポンデージー、キンセンカ、ペパーミントの 5 種類の植物を 10 mg/L に調製したアセトアミノフェン水溶液中に 1 束植え、1 週間後に濃度を測定し除去率を算出した (図 1)。除去率の順はキンセンカが高く、次いでユリオプスデージー、ペパーミント、ポンポンデージーで、アリッサムはもっとも低かった。キンセンカを用いた時、7 日目にはアセトアミノフェンの濃度は 3.1 mg/L まで減少していたが、3、4 日後にキンセンカ自体は腐ってしまった。腐敗により増殖した微生物やカビなどがアセトアミノフェンを分解したのかもしれない。ユリオプスデージーを 7 日間、アセトアミノフェンを含む水溶液で栽培すると水中の濃度は 3.7 mg/L になった。この要因として、根圏微生物による分解または植物への吸収が考えられる。ポンポンデージーとペパーミントも 7 日後 6.9 mg/L まで減少していた。水の吸収量を見ると、ペパーミント以外の植物は 11-149 mL であったが、ペパーミント

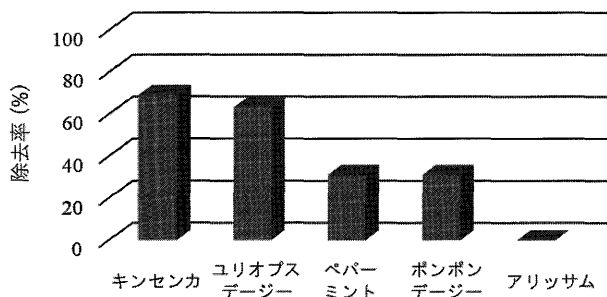


図1 さまざまな植物によるアセトアミノフェンの除去率
水中初期濃度 10 mg/L 栽培期間 7日

はほとんど変化がなく、アセトアミノフェンを植物体内に吸収したとは考え難く、この減少は、根圏微生物によると想定できる。アリッサムは植栽後7日間栽培してもアセトアミノフェンの水中濃度に変化はみられず、浄化効果は認められなかった。これらのことから、ユリオプスデージー、ポンポンデージーおよびペパーミントがアセトアミノフェンを浄化する能力を有すると期待できるが、1週間の栽培でアセトアミノフェンの減少量のもっとも多かったユリオプスデージーに絞り、水中のアセトアミノフェン濃度の推移を調査した。

3-2 ユリオプスデージーによる浄化の検討

ユリオプスデージーを用い、栽培期間を12日間に延長し水中濃度を測定した。アセトアミノフェンの初期濃度が14 mg/Lの時、明所に放置すると、栽培1日後では12 mg/Lとなり、その後はゆっくりと減少し、12日後では6.3 mg/Lと初期濃度の半分の値になった(図2(a))。暗所で栽培すると、明所よりも濃度の減少する速度が速く、1日後で初期濃度の約半分の6.7 mg/Lとなり、12日後では検出されなかった。また、アセトアミノフェンの初期濃度が0.8 mg/Lの時は、明所の場合は8日後で0.4 mg/Lと減少傾向が認められ、12日後で検出されなくなった。暗所では、明所に比べて減少傾向が早く認められ、栽培3日後からは検出されなくなった(図2(b))。このように、初期濃度がいずれの場合も明所よりも暗所に放置するほうが、早くアセトアミノフェンを浄化する傾向が認められた。通常、植物は明所では水中から有機物等を取り込み、光合成により有機物を合成する。これにともない、水中の汚染物質も吸収し、植物体内に蓄積そして酵素により分解する。このメカニズムを考えると、明所の方が早く分解することが考えられる。清水、先山ら¹⁷⁾は藻類を用いて水中の窒素やリンの除去を検討した時は、明所の方が暗所に比べて除去率は高かったと報告した。ユリオプスデージーはこれまでの報告されている結果と異なったことから、水の吸収のメカニズムが他の植物と異なっているのかもしれない。

これらの結果から初期濃度の違いの有無にかかわらず、12日間暗所に植物を放置すると、水中に溶けているアセトアミノフェンを完全に除去することがわかった。

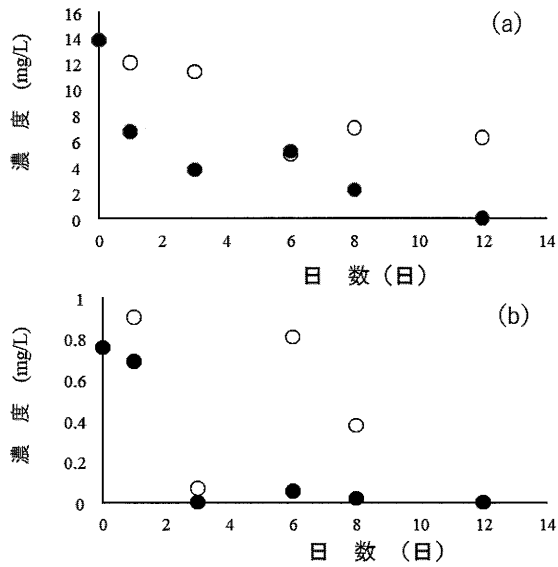


図2 ユリオブスデージーによるアセトアミノフェンの浄化の検討
 ○明所、●暗所
 (a) 水中初期濃度 13.7 mg/L (b) 水中初期濃度 0.7 mg/L

3-3 アセトアミノフェンの除去メカニズムの検討

通常、植物による汚染物質の浄化メカニズムとして、図3に示すように、汚染物質が植物体内に侵入するまえに根に付着している根圏微生物による分解 (Rhizodegradation)、植物の根圏内での蓄積 (Rhizofiltration)、植物体内での蓄積 (Phytoaccumulation)、植物に蓄積した汚染物質の植物体内の酵素による分解 (Phytodegradation)、植物に蓄積した汚染物質の葉からの揮散 (Phytovolatilization) があげられる¹⁻²⁾。このように植物による汚染物質の除去方法は様々であ

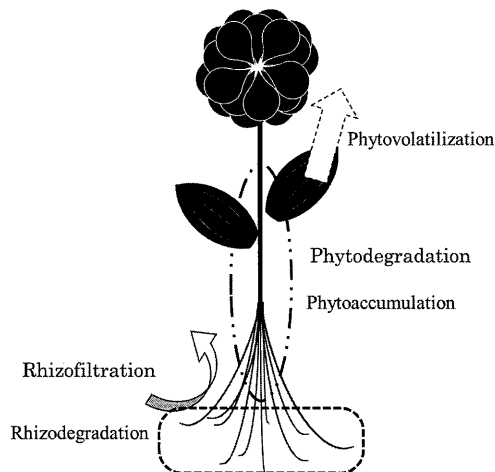


図3 ファイトレメディエーションの概念図
 長谷川ら、神戸女学院大学論集¹⁰⁾より

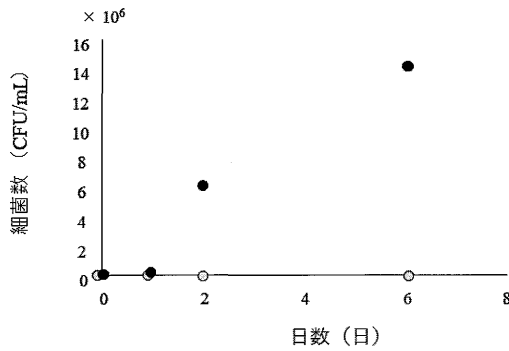


図4 滅菌状態を確認するための水中の細菌数

○滅菌済み、●滅菌なし

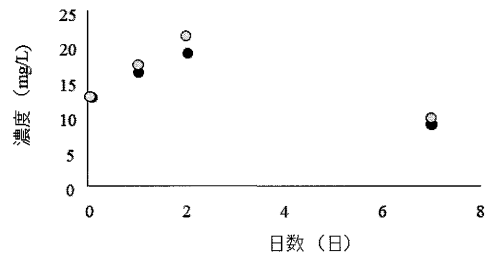


図5 根圏微生物によるアセトアミノフェンの浄化の検討

○滅菌済み、●滅菌なし

る。そこで、ユリオプスデージーによる水中からのアセトアミノフェンの除去のメカニズムについて検討した。

はじめに、根圏微生物によるアセトアミノフェンの除去を検討するために、滅菌処理を行った植物を用いて、水中のアセトアミノフェンの除去を試みた。図4は水中の一般細菌数を示す。滅菌していないアセトアミノフェンを含む水は菌数が増加したが、滅菌した水は7日後も菌数は0であった。このことから滅菌した植物は根圏微生物が存在していないと判断した。図5には7日間の水中のアセトアミノフェンの濃度の推移を示す。滅菌の有無にかかわらず、アセトアミノフェンの濃度は減少した。この結果からは、アセトアミノフェンの水中からの消失は根圏微生物による分解ではなく、植物の根または体内にアセトアミノフェンを吸収していることが示唆される。

次にアセトアミノフェンの濃度の変化とユリオプスデージーの栽培時における水の吸収量との関係をみた(図6)。栽培3日目でユリオプスデージーが入っていた水溶液のアセトアミノフェン濃度は1.9 mg/Lと急激に減少し、その後13日目までゆるやかに減少していた。それに比例して水の吸収量も3日目には21.7 mLと急激に増加し、それ以降ならかに吸収量は減少していた。つまり、水の減少量に伴いアセトアミノフェンの濃度が減少したことから、ユリオ

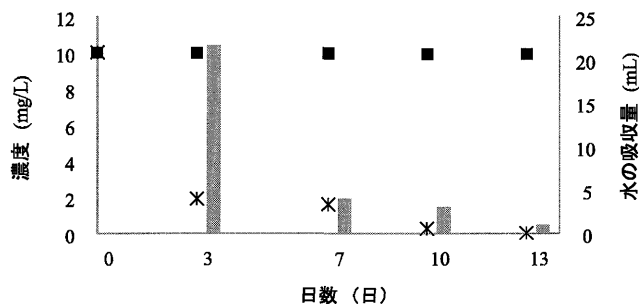


図6 ユリオプスデージーによるアセトアミノフェン水溶液の吸収量とその濃度

* ユリオプスデージー 有 ■ コントロール ■ 水の吸収量
水中初期濃度 10 mg/L

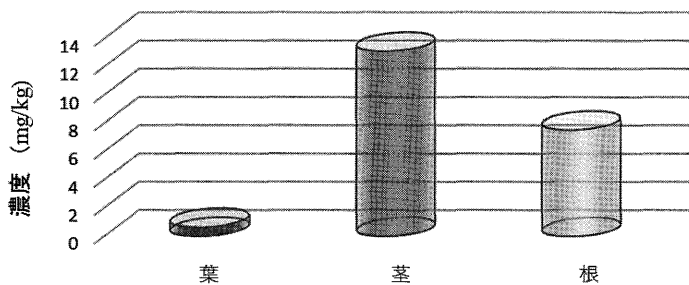


図7 植物の葉・茎・根のアセトアミノフェンの蓄積量

プスデージーは水とともにアセトアミノフェンを体内に取り込んだことがわかる。

植物の体内に取り込まれたアセトアミノフェンの分解の有無について調べることは、Phytoremediation の実用化を考える際の重要な点となる。つまり、植物体内の蓄積したアセトアミノフェンが分解しないならば吸着材を用いた場合と同様、蓄積量の限界および植物が枯れた場合の処理を考える必要がある。そこで、植物体内のアセトアミノフェンの蓄積量を測定した。

アセトアミノフェンを吸収したユリオプスデージーを根、茎および葉に分けて濃度を測定すると、もっとも濃度が低かったのは葉であり、茎は葉の約20倍、根の約2倍であった(図7)。この値を式(1)に代入し、アセトアミノフェンの重量を算出すると、根0.058 mg、茎は0.093 mg、葉は0.008 mgとなった。すなわち、植物体内にはそれらの合計である0.159 mgが蓄積していたと考えられる。

$$\text{アセトアミノフェンの蓄積量 (mg)} = \text{体内の濃度 (mg/g)} \times \text{植物の重量 (g)} \cdots \cdots (1)$$

アセトアミノフェンの初期濃度を10 mg/Lに調製した蒸留水300 mLで栽培したことから、このときのアセトアミノフェンの初期重量は3 mgと算出することができる。また、10日後の水中のアセトアミノフェン濃度は0.27 mg/Lであったことから、重量に換算すると0.081 mgとなる。アセトアミノフェンの初期および10日後の水中の重量と植物体内のアセトアミノフェン重量の差を算出すると、2.76 mgとなった。ユリオプスデージーの体内のアセトアミノフェンの重量は0.159 mgであることから、栽培後の10日間で、はじめに添加したアセトアミノフェンの約92%が消失していることが伺える。これは、ユリオプスデージーが水中に溶解しているアセトアミノフェンを吸収して茎を中心に蓄積した後、分解または葉から揮散したことを示す。

4 結論

本研究ではアセトアミノフェンを浄化する植物を選定し、そのメカニズムを解明した。まず、ユリオプスデージー、ポンボンデージー、キンセンカ、ペパーミント、アリッサムの5種の植物を用いて、アセトアミノフェンを含む蒸留水中で栽培した。ユリオプスデージーを用いた場合、1週間でアセトアミノフェンの初期濃度が10 mg/Lから3.7 mg/Lに減少した。アセ

トアミノフェンの減少のパターンを詳細にみると、はじめは急激に減少したが、その後ゆるやかに減少した。また、アセトアミノフェンの濃度を1 mg/Lまたは10 mg/Lと変えても、暗所で栽培すれば、3日で水中のアセトアミノフェンを除去することがわかった。水中から吸収されたアセトアミノフェンの植物体内での除去メカニズムを、滅菌の有無および植物の根、茎、葉と水中のアセトアミノフェンの濃度から重量を算出することにより予測した。この結果から、根圏微生物によりアセトアミノフェンを分解しているのではなく、植物体内に蓄積後分解していることが示唆された。今後は、ユリオプスデージーによるアセトアミノフェンを浄化する際の条件をさらに詳細に検討するとともに、植物に取り込まれたアセトアミノフェンの酵素等による分解挙動及び分解物を明らかにすることが重要である。

参考文献

- 1) Azizur Rahman M., Hasegawa H. (2011) Aquatic arsenic: Phytoremediation using floating macrophytes, *Chemosphere*, 83, 633-646.
- 2) 藤田正憲, 池道彦 (2006) バイオ環境工学, シーエムシー出版, 66-72.
- 3) 小森行也, 鈴木稜 (2009) 下水由来の医薬品の存在実態, *水と水技術*, 3, 26-31.
- 4) 甲斐健太郎, 池田俊也, 武藤正樹 (2012) アセトアミノフェン鎮痛目的利用の国内外差およびその普及による薬剤費低減の可能性, *薬剤疫学*, 17(2), 75-86.
- 5) Camilo D., Seabra P., Luciane A. M., Fernando S. C., Fabio H. P., Aldo R. S., Daniel A. R., Augusto C., Luciana L. G. (2016) Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone, *Science of the total environment*, 548-549, 148-154.
- 6) Solomon M., Grace B., Brenda M., Patrick N. (2015) Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi River, KwaZulu-Natal, South Africa, *Chemosphere*, 134, 133-140.
- 7) Paula P., Lúcia H. M. L. M. S., M. S., Sandra R., Sandra J., Jaime G. S., Cristina D.-M. (2016) Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation, *Science of the total environment*, 573, 164-177.
- 8) Luhua Y., Viet T. N., Amrita P., Huiting C., Yiliang H., Martin R., Karina Y.-H. G. (2015) Investigation of pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting chemicals in a tropical urban catchment and the influence of environmental factors, *Science of the total environment*, 536, 955-963.
- 9) 治田伸介, 菅田伴, 中矢雄二 (2013) 農業集落排水施設の流入水と処理水に対する医薬品の混入実態, *農村計画学会誌*, 32, 257-262.
- 10) 長谷川有紀, 八束絵美, 張野宏也 (2013) ファイトレメディエーションによる水質浄化, *神戸女学院大学論集*, 60(2), 21-30.
- 11) Fernanda A. S., Mauricio D., Selma A. C., Leila T. M. (2013) Restroration of polluted waters by phytoremediation using *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc., Haloragaceae, *Journal of Environmental Management*, 20, 5-9.
- 12) Foluso O., Bamidele I., Olu-O., Kayode O. A. (2009) Phytoremediation potential of *Eichornia crassipes* in metal-contaminated coastal water, *Bioresource technology*, 100, 4521-4526.
- 13) 環境省 水・大気環境局 水環境課 (2014) 自然浄化対策について 生態系機能を活用した“健やかな湖沼水環境”の実現を目指して.
- 14) 長野県 (2013) 野尻湖に係る湖沼水質保全計画 (第5期) ~みんなの野尻湖 美しい姿を次世代に~.
- 15) Yanxu W., Hiroshi O. (2009) Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil, *Journal of hazardous materials*, 168, 760-764.
- 16) 長谷川有紀 (2009) 植物による河川中に含まれるPCPPsの浄化に関する研究, *ヒューマンサイエンス*, 18, 50-53.
- 17) 崎山真依, 清水葵 (2017) 水草を用いた水の浄化, 卒業論文.

(原稿受理日 2018年2月14日)