

論文審査の結果の要旨

報告番号	博(工)甲第 <b>106</b> 号	氏名	Tan-Duc Nguyen
学位審査委員	主査	板山 朋聡	
	副査	田邊 秀二	印 
	副査	鈴木 誠二	
	副査		印

論文審査の結果の要旨

Tan-Duc Nguyen氏は、2018年9月に長崎大学大学院工学研究科博士前期課程を修了し、その後同年10月に長崎大学大学院工学研究科博士後期課程に入学し現在に至っている。同氏は、ベトナムホーチミン市のTon Duc Thang大学を卒業し、その後、ベトナム国家大学ホーチミン市工科大学で、生体毒性学の研究に研究員として従事していた。このとき、ホーチミン市の水源となっているダム湖で有毒藍藻が産生する毒素の生態系への影響などの研究を実施していた。

本論文では富栄養化した湖沼や貯水池で発生する有毒藍藻の藍藻毒と、製薬工場（抗生物質製造）や病院からの排水に多くの未処理のまま含まれ環境中に放出されている、合成抗生物質であるフルオロキノロン系抗生物質の水圏生態系への影響を評価するため、毒性試験の標準種である所謂オオミジンコ *Daphnia Magna* 等を用いた生態毒性試験とその結果を、統計学的に厳密な手法で解析したものである。その結果、2021年7月に主論文「Ecotoxicological analysis of cyanotoxins and antibiotics as a threat to environmental health and exploration of statistical methods for the analysis（健全な水環境への脅威である藍藻毒と抗生物質の生態毒性試験と統計的手法の探求）」として完成させ、学位論文の印刷公表論文1編（うち審査付き論文1編：3章）、査読中1編（うち審査付き論文1編：5章）、投稿準備中1編（うち審査付き論文1編：4章）、参考論文1編（うち審査付きレビュー1編：1章、2章）を付して、博士（工学）の学位を申請した。長崎大学大学院工学研究科教授会は、2021年7月21日の教授会において論文内容等を検討し、本論文を受理して差し支えないものと認め、上記の審査委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会を実施し最終試験を行い、論文審査および最終試験の結果を2021年8月18日の工学研究科教授会に報告した。

本論文の第1章では、研究目的について背景とともに記述し、さらに第2章では、生態毒性学の研究手法、特に統計解析の手法について問題点とともに、既往研究のレビューを実施している。本論文で対象とした有毒藍藻 *Microcystis* は世界中の富栄養化した貯水池や湖沼で発生しており、その主要な藍藻毒 *microcystin* は強い毒性を持っており、人に肝臓ガンなどを引き起こすだけでなく、他の藻類や動物プランクトン、魚類などにも有毒であることが知られている。実際に生態毒性試験として純粋な *microcystin* が *Daphnia* に及ぼす影響が試験されている。一方で、近年は医薬品が環境汚染物質として大きな懸念事項である。実際、合成抗生物質であるフルオロキノロン系抗生物質は製薬工場（抗生物質製造）や病院からの排水に多くの未処理のまま含まれ環境中に放出されている。これまでも、特に開発途上国の環境中で高濃度で検出されているフル

オロキノロン系抗生物質のシプロフロキサシン (CFX) に関しては*Daphnia*を用いた研究が実施されているが、慢性毒性(Chronic toxicity)に関しては、長くても21日が最長である。また、CFXと同様に頻繁に環境中でオフロキサシン(OFX)に関しては*Daphnia*を用いた毒性試験は実施されていない。

参考論文 (印刷中) : Tomoaki Itayama, Bao-Trong Dang, Obey Gotore, Tan-Duc Nguyen and Xuan-Thanh Bui, Application of down-flow hanging sponge reactor and biochar for water and wastewater treatment, Chapter 10 in *Advances in biological wastewater treatment systems* (Eds: Xuan-Thanh Bui, Dinh D. Nguyen, Phuoc-Dan Nguyen, Huu Hao Ngo, Ashok Pandey, Elsevier (in press))

第3章では、ホーチミン市の水源に発生した有毒アオコ(藍藻)のブルームを用いて、*Daphnia Magna*への影響と見たものである。この実験は、ベトナムで採取された有毒藍藻(アオコ)の採取サンプルをそのまま使うため、ホーチミン市工科大学で実施されたものであったが、本論文の要点でもあり生体毒性学の研究のもっとも重要な部分であるデータ解析(統計解析)に関しては、長崎大学大学院工学研究科博士後期課程で実施されたものである。この結果の解析では、データの統計分布として正規分布近似が使えないということから、ノンパラメトリック統計解析の手法が使われており、その結果は多重比較(Dunnett法)され、統計的に疑義のない厳密な解析がなされている。その結果、純粋なmicrocystinを用いた場合には、低濃度で*Daphnia Magna*の産仔数が減少する影響があるが、同濃度のmicrocystinを含む環境サンプルによる毒性試験では、むしろ*Daphnia Magna*の1個体の一回あたりの産仔数(Brood Size)が増加するという結果が得られている。この結果は低濃度～中濃度の毒物や放射線がむしろ生体を活性化させ増殖率などが高まるホルミシス効果と関連させて考察されている。これまでも同様な結果が、他の研究者によって示唆されているが、ベトナムの有毒アオコでは初めての結果であり、また、厳密な統計解析がなされていると点で新規な成果であると認められる。

\*第3章の成果は以下の掲載論文(査読付き)にまとめられている

Tan-Duc NGUYEN, Xuan-Quang NGO, Thanh-Luu PHAM, Thanh-Son DAO, Ecotoxicological investigation of cyanobacterial crude extracts to *Daphnia magna* under subchronic test conditions, *Turkish Journal of Zoology*, November 2020, 44(6):498-507

第4章ではフルオロキノロン系の第5世代抗生物質デラフロキサシン(DFX)、従来のフルオロキノロン系抗生物質であるシプロフロキサシン(CFX)、オフロキサシン(OFX)、ガチフロキサシン(GFX)と比較としてテトラサイクリン(TET)とそれらの混合構成物質に関し、ミジンコの一種である*Simocephalus vetulus*を用いた生態毒性試験が実施されている。これは、主に行動や生理学的特性への影響ということで、thoracic limb moving(エラの動き)の振動回数(6秒間)がビデオ測定されている。この指標を用い、しかも、オフロキサシン(OFX)、ガチフロキサシン(GFX)やテトラサイクリン(TET)などの混合物を用いた毒性評価試験は本研究が世界で初めてとなる。また、厳密なノンパラメトリック解析と多重比較が実施され、その結果、非常に毒性の強いGFXは個体の死亡や、thoracic limb movingの減少がみられたが、一方、CFXやOFXではthoracic limb movingが増加し、ホルミシス効果と考えられている。一方、DFXやTETは影響は見られなかった。これらの影響の違いは、抗生物質の細胞膜透過性が関係していると考察されている。また、混合物にはGFXが含まれており、thoracic limb movingの減少が見られたが、含まれるGFX濃度から予測される濃度より高い濃度で減少効果が生じていた。これは、混合された抗生物質間で相互作用が生じている可能性を示唆していると考察されている。これらは実験手法とともに新規性の高い成果であると言える。

\*第4章の成果は以下の投稿準備中論文(査読付き)にまとめられている:

Nguyen Tan Duc, Itayama Tomoaki, Ramaraj Rameshprabu, Iwami Norio, Shimizu Kazuya, Dao

Thanh Son, Pham Thanh Luu, Maseda Hideaki, Different responses of *Simocephalus vetulus* (Cladocera: Daphnidae) to five antibiotics and their mixture under 48-hour acute test, *Science of the Total Environment* (in preparation).

第5章では CFX と OFX が *D. magna* に与える影響を、実際の環境濃度を参考にした暴露濃度での長期試験（42日）を実施し、その結果を一般化線形混合モデル（GLMM）で解析している。42日間の CFX と OFX の暴露試験はこれまでなされておらず、世界初の成果である。特徴的な結果として、CFX の  $500\mu\text{g L}^{-1}$  暴露濃度で、最初の産仔が見られる日数が統計的に有意に短縮していた。一方、OFX ではこの短縮が起こっていない。また、この同じ濃度の CFX では Brood Size が統計的に有意に増加していた（GLMM による解析結果）。これらは、第3、4章でも見られたホルミシス効果であると考察されている。また、OFX では効果が見られなかったことは、OFX よりも CFX の細胞膜を透過しやすいことが原因と考察されている。しかしながら、CFX と OFX が  $5000\mu\text{g L}^{-1}$  暴露濃度では、両者とも GLMM による統計的有意な Brood Size の減少が見られている。また、これと関係して、この濃度では死卵や奇形などが増加していることも示されている。このような、CFX と OFX 暴露による *D. magna* の生活史への効果の機構に関しても考察がなされている。CFX と OFX などのフルオロキノロン系抗生物質は、元来、原核生物であるバクテリアの DNA の転写を阻害することで病原細菌の増殖を抑制することを目的としているが、人や *D. magna* などの真核生物の DNA にも影響（損傷）させ、さらに細胞への酸化ストレスを与えることが知られており、Brood Size の減少やホルミシス効果の原因として考えられると述べられている。一方、*D. magna* には腸管があり、そこには腸内細菌が生息している。この腸内細菌は *D. magna* への栄養素の供給に重要な役割をしていることが示している論文や、CFX が影響することを示した論文が参照され、今回、生じた産仔数への抑制効果だけでなく、産仔数が増加するホルミシス効果にも腸内細菌への影響を通じた、いわゆる間接影響の重要性であるとしている。このように、CFX や OFX の *D. magna* への直接効果と間接効果の影響の強さの比較は、現段階では明確ではないので今後の研究課題としている。また、今回のデータ解析で用いた統計的手法であるポアソン分布をベースとした GLMM は、生態学の個体群解析では、近年、盛んに用いられるようになってきているが、生態毒性学では初めての適用である。従来の生態毒性学では、正規分布をベースとした分散分析と多重比較が暴露試験の解析に用いられてきたが、分散の均一性の要求などの統計学的な適用制限が多く、また、産仔数が少ない場合などは、正規分布の仮定である連続変数として個体数を近似することに限界がある。また、暴露実験では10系程度の複製を用いるが、この複製系間の分散を考慮するためには、ランダム効果を取り入れた一般化線形モデル（GLM）、すなわち GLMM で解析する必要があると論じている。一方で、暴露試験では、様々な条件を同時に考慮する場合でも、多くが離散的な因子型変量であるので、交互作用まで検討する場合は、爆発的に組み合わせが増加してしまい、通常の実験による検定では極めて低い p 値が基準となるので、ほとんど有意差を見出すことができない。本論文では、最後に6章において、将来の研究課題において、この多重比較問題の解決策のためのベイズ統計解析について解説している。ベイズ統計解析では帰無仮説の棄却確率 p 値に基づく従来の統計検定とは異なり、仮説の事後確率（分布）を直接議論するため生態毒性試験におけるベイズ統計解析の適していると論じている。

\* 第5章の成果は以下の審査中の論文（査読付き）にまとめられている：

Nguyen Tan Duc, Itayama Tomoaki, Ramaraj Rameshprabu, Iwami Norio, Shimizu Kazuya, Dao Thanh Son, Pham Thanh Luu, Maseda Hideaki, Chronic ecotoxicology and statistical investigation of ciprofloxacin and ofloxacin to *Daphnia magna* under extendedly long-term exposure, *Environmental Pollution* (under review) (2021.7)

以上のように本論文では、自然毒であるが人為的富栄養化に起因する藍藻毒と世界的問題である抗生物質汚染のDaphniaを用いた生態毒性試験において、本論文で検討したフルオロキノロン系の構成物質に関して、いくつもの世界初の成果を示しており、また、新たな統計的な解析方法を適応し、その問題点とともに新たな手法の必要性についても論じている。そのため、本研究は新規性及び独創性があり、高い学術的価値を有するとともに、実際の環境改善へ向けての応用的価値も高い研究と評価できる。

学位審査委員会は、Tan-Duc Nguyen 氏の研究（成果）が工学の分野において極めて有益な成果を得るとともに、水環境工学の進歩発展に貢献するところが大きく、博士（工学）の学位に値するものとして合格と判定した。