

氏 名 廖 健森

学 位 の 種 類 博士 (学術)

学 位 授 与 年 月 日 令和2年3月24日

学 位 論 文 名 Environmental distribution, phytotoxicity, and bioremediation of endocrine disruptor di-*n*-butyl phthalate
(内分泌攪乱物質であるフタル酸ジブチルの環境分布、植物毒性、およびバイオレメディエーションに関する研究)

論文審査委員 主査 中台 枝里子

副査 西川 禎一

副査 増田 俊哉

論文内容の要旨

Nowadays, plastic products have been filled and disturbed in our living environment. After used, they would be discarded into the terrestrial or aquatic ecosystems and then break down to become to the different kinds of chemical pollutants. Therefore, the agricultural land which used the river water or groundwater for irrigation would be impacted. One of the most important chemical pollutants are plasticizers, phthalate esters (PAEs).

Di-*n*-butyl phthalate (DBP) is one of the most widely used PAEs and is mainly used as a plasticizer for plastics. Due to its high production and application figures, DBP is widely distributed in various environmental samples such as soil, air, wastewater, sewage sludge, river water, sediment, and groundwater. Then, it can be accumulated in seafood or agricultural products and represents a substantial risk to human health via the food chain. In recent years, several studies have shown that DBP has embryotoxicity and other effects on different organisms. Therefore, DBP had been classified as suspected endocrine-disrupting chemicals (EDCs). Since DBP is widely distributed in the environment, the purpose of this study is to assessing the related risk of DBP for environmental and agricultural protection.

In chapter 1, the result of PAEs environmental distribution shows that DBP and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) were found to be higher than the other PAEs in the river water and sediment in Taiwan in 2000. The concentrations of DBP in the water and sediment samples were 1.0-13.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) and 0.3-30.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ (ppm), respectively. On the other hand, the result of 2013 shows that DEHP and di-*n*-octyl phthalate (DnOP) accounted for the most of PAEs concentrations in soil (> 90%). DBP were almost found in each soil sample in Taiwan, the mean concentration was 0.01 mg kg^{-1} . In addition, major sources of PAEs in agricultural soil could be the use of chemical fertilizer and plastic products. These results show that the mean concentration of DBP decreased in Taiwan's environment from 2000 to 2013, but still could be found in each sampling sites in Taiwan.

In chapter 2, the results of DBP phytotoxicity shows that DBP caused the leaves of Chinese cabbage turned yellow and displayed etiolation. Meanwhile, DBP could be accumulated in different parts of Chinese cabbage. DBP even below 1 mg L⁻¹ had a significant effect on the concentration of chlorophyll in Chinese cabbage and the biomass showed a severe decrease under treatment with more than 30 mg L⁻¹ of DBP. In proteomics analysis, six protein spots derived from the normal control and the DBP-treated Chinese cabbage plants showed reproducible differences in the expression in 2-DE. Three proteins appeared or increased while the other three proteins decreased or disappeared during growth in hydroponic culture with DBP added. Three spots of increasing protein were responsible for biosynthesis of fatty acids, signal transduction of phototropic response and nitrate assimilation in plant cells, respectively. The other three spots that disappear or show decrease in protein with DBP treatment were responsible for biosynthesis of flavonoids and floral color development in the cell, aminoacylation of tRNA in the cell, and synthesis of ATP in the cell to restrict growth and development in Chinese cabbage, respectively. In this study, DBP seems to be able to induce physiological reactions or metabolism disorder in the Chinese cabbage cell. We might say that DBP limits the growth and development of Chinese cabbage.

In chapter 3, the results of bioremediation show that aerobic biodegradation rates of PAEs were better than anaerobic biodegradations. The best biodegradation half live ($t_{1/2}$) of 5 ppm DBP in laboratory and soil are 0.65 and 2.23 days by *Deinococcus radiodurans*, respectively. Then, the removal efficiencies of 2 mg L⁻¹ DBP by laccase which was extracted from the spent mushroom compost of *Ganoderma lucidum* was 100%, after 1 day of incubation. On the other hand, the best phytoremediation half live ($t_{1/2}$) of 5 ppm DBP is 2.69 days by Garden lettuce. DBP potentially causes osmotic and oxidative stress in Garden lettuce. In addition, since DBP had no significant effects on the morphology and physiological status of Garden lettuce, Garden lettuce can be recommended for use in the plant anti-DBP toxicity test, and also as the candidate plant for DBP phytoremediation.

Based on all the results of this study, we hope that these findings could provide useful information for applying the bioremediation of DBP and assessing the related risk of DBP in the environments. Meanwhile, we also believe that all we have done only the temporary solutions to the problem, the DBP and PAEs contaminated problems still depends on the wisdom of human beings to solve in the end in the future.

論文審査結果の要旨

内分泌攪乱化学物質（EDC）は、野生生物やヒトの内分泌系の機能を攪乱させ、有害な影響を与える化学物質として定義されている。EDC であると考えられているフタル酸エステル（PAE）は、食品包装、化粧品、農薬、建築材料、化学肥料、製薬産業などのさまざまな分野で可塑剤として広く使用される。その物理化学的特性と幅広い用途により、PAE は地下水、地表水、底質、土壌など、環境中に広く分布する。

フタル酸ジブチル（DBP）は、最も広く使用されている PAE の 1 つであり、主にプラスチックの可塑剤として使用されている。揮発性がそれほど高くないため、大気中に容易には蒸発しない。20°Cでの水溶性は 10 mg L⁻¹であり、水溶液中での半減期は 22 年である。DBP は地表水、堆積物、飲料水などに含まれることが報告されている。排水処理や肥料、農薬、農業用プラスチックマルチの使用などにより、水生環境と農地における DBP の蓄積が近年著しく増加している。申請者は、環境における DBP 関連リスクを評価するため、1) 台湾の陸生および水生環境における DBP の分布を調査すること、2) 植物と緑藻に対する DBP の影響を評価すること、3) 細菌、真菌、および植物による DBP のバイオレメディエーションを開発すること、を目的として研究を実施した。

第 1 章では、2000 年に採取した台湾の河川表層水サンプルと堆積物サンプルの PAE を調査した。DBP の濃度は他の 6 つの PAE よりも高いことがわかり、水と堆積物サンプルの DBP の濃度範囲はそれぞれ 1.0~13.5 µg L⁻¹(ppb)と 0.3~30.3 µg g⁻¹(ppm)であった。次に、2013 年に台湾の高雄市の主要な工業地域周辺で採取した土壌、肥料、プラスチック材料の PAE を調査した。土壌中の PAE 濃度のほとんどを DEHP とフタル酸ジオクチル（DnOP）が占めたが、DBP についても台湾のほとんどすべての土壌サンプルで検出され、平均濃度は 0.01 mg kg⁻¹であった。加えて、農業土壌中の PAE の主な発生源が、化学肥料およびプラスチック製品の使用であることを示唆した。

第 2 章では、植物と緑藻に対する DBP の影響を評価した。まずチンゲン菜(*Brassica rapa var. chinensis*)に対する影響を調べた。50 mg L⁻¹の DBP で 42 日間処理することによりチンゲン菜の葉で黄化が発生した。DBP は 1 mg L⁻¹未満でもチンゲン菜のクロロフィル濃度に大きな影響を与え、バイオマスは 30 mg L⁻¹を超える DBP で処理すると顕著な減少を示した。DBP 1 mg L⁻¹未満の濃度では、蓄積に有意な差は見られなかったが、10、30、50、および 100 mg L⁻¹を超える濃度での処理はすべて、DBP の顕著な蓄積をもたらした。プロテオーム解析により、DBP 処理により増加するタンパク質は、植物細胞における脂肪酸の生合成、光屈性応答のシグナル伝達、硝酸同化に関わるものであることを示した。

次に、緑藻(*Chlorella vulgaris*)に対する影響を調べた。DBP 濃度の増加に伴い *C. vulgaris*

のクロロフィル a 含有量が減少し、24 h-EC50 は 4.9 mg L⁻¹であることを示した。LC / MS / MS を用いたプロテオーム解析と遺伝子オントロジー (GO) 分析を行い、アセチル CoA 合成とプロトン膜貫通輸送に関連するタンパク質群が DBP 曝露後に減少することを示した。これらの結果から申請者は、DBP が脂肪酸合成を阻害し、*C. vulgaris* の pH 調節と細胞代謝に影響を与える可能性を提唱している。

第 3 章では、細菌、真菌、および植物による DBP のバイオレメディエーションを分析した。放射線抵抗細菌(*Deinococcus radiodurans*)によるバイオデグラデーション (生物分解) における 5 ppm DBP の半減期が、実験室環境および土壌中でそれぞれ 0.65 および 2.23 日であることを示した。また、霊芝(*Ganoderma lucidum*)の使用済みキノコ堆肥から抽出されたラッカーゼによる 2 mg L⁻¹ DBP の除去効率は、1 日間のインキュベーション後に 100%であることを明らかにした。さらに、DBP の吸収能力が高いガーデンレタス (*Lactuca sativa* L. var. *longifolia*) による 5 ppm DBP の半減期が 2.69 日であることを示した。DBP はガーデンレタスのさまざまな部分に蓄積したが、その生理学的状態と形態に顕著な変化はみとめられなかった。これらの結果から、申請者は、ガーデンレタスが DBP ファイトレメディエーションのための候補植物となると述べている。

以上、申請者は本論文において、環境中の DBP 関連リスクを評価するための貴重な知見を提供するとともに、DBP のバイオレメディエーションに関する複数の具体的な方法を提案した。本研究は、内分泌攪乱化学物質による環境汚染という、環境保全における重要な課題に対して解決の糸口を与えることが期待される。以上の研究内容とその質に鑑みて、本審査委員会は本論文が博士 (学術) の授与に値するものと認めた。