メダカの生殖・成長関連遺伝子群による 下水処理過程の生物影響削減効果の評価

北村友一¹・真野浩行¹・小森行也¹・岡本誠一郎¹・鈴木 穰²

¹正会員 国立研究開発法人土木研究所 水環境研究グループ 〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6
Email:kitamura@pwri.go.jp

²正会員 前 土木研究所（現 国土技術政策総合研究所 下水道部 305-0804 茨城県つくば市旭1番地）

魚類繁殖に関係する有性生殖，成長関連遺伝子群を選出し，メダカを試験魚とする96時間の曝露実験から，活性汚泥処理，微生物保持担体処理での各遺伝子群の発現変動抑制効果の定量的評価を試みた．さらに，遺伝子発現レベルと産卵の関係解明のため，両処理水についてメダカ成魚による産卵実験を行った．その結果，下水試料に曝露された試験魚の有性生殖，成長関連遺伝子群へ及ぼす影響は，曝露区と対照区の試験魚の遺伝子発現強度の違いをユークリッド距離で示すことにより定量的に評価でき，流入下水でみられた有性生殖，成長関連遺伝子群への影響は，活性汚泥処理，後段の微生物保持担体処理により，水生生物の保全に係る水質環境基準の生物A類型の河川レベルまで低減された．産卵実験からは両処理水の産卵への悪影響は認められなかった．

Key Words : Medaka, Sexual reproduction, growth, Microarray, Sewage treatment process

1. はじめに

下水処理水の再利用の主要用途として，河川維持用水，修景用水が大きな割合を占めている．今後，再利用量も増大していくと考えられ，また，意図的な再利用以外でも，都市河川では河川水に占める下水処理水の割合が高くなると予想される．一方で，近年，水生生物への影響が確認されているエストロゲン類やその他の化学物質が下水処理水中に残存していることが報告¹⁾²⁾され，下水処理水再利用先や放流先での水生生物への影響が懸念されている．水生生物の中で魚類は，水生生物の代表種，かつ，資源生物であり，下水処理水の再利用先での生態影響評価の優先順位は高く，下水処理水や再生水の魚類生態影響の実態や下水処理工程での影響低減効果を明らかにしておく必要がある．

魚類への影響は，生態系保全を考慮すると，魚類個体群存続すなわち，繁殖（産卵，ふ化率，稚魚の成長など）に関する項目で評価する必要がある．魚類の繁殖試験は，生殖，成長，さらに，次世代のこれらの影響まで考慮すると流水式での長期間飼育が必要となり，実験施設の設置が制約となったり，処理水質に変動のある下水処理水

での試験結果の解釈が困難であったりする．こうしたことから，下水処理水が魚類の繁殖に与える影響は未だ明らかでない．

現在，胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験³⁾から下水処理水の毒性の実態把握や同定が始められている⁴⁾が，これは，胚や仔魚の生残率，すなわち繁殖影響の一部を指標とするものである．

魚類個体群存続への影響を未然に防ぐために，下水処理水や再生水の魚類への繁殖影響を短期間でモニタリングできる方法が必要とされている．

近年，化学物質の曝露から，分子レベル，細胞レベル，臓器レベル，個体および個体群レベルへの影響についての反応経路（Adverse Outcome Pathway；AOP⁵⁾）を整理していくことが重要とされ，AOPの一部である遺伝子発現の知見の充実や遺伝子発現レベルの影響と個体レベルの影響の関係解明が重要となっている．生体応答が早い様々な機能の遺伝子発現を指標とする*in vivo*試験は，遺伝子発現レベルと個体レベルの関係についての知見が蓄積されることにより，繁殖影響を短期間で推測できる可能性がある．

下水処理水の魚類への安全性を遺伝子発現の変化から

評価する場合、繁殖に影響する遺伝子は多数存在すると考えられ、これらの遺伝子発現の変化を一指標に統合し定量的に評価する必要がある。これまでも、下水試料に曝露した魚類の遺伝子発現変動に着目した調査が行われているものの、その研究内容は発現変動遺伝子の機能解析⁶⁾やマーカーとなる特定の遺伝子の発現変動解析⁷⁾であり、多数の遺伝子発現の変化に基づいた、下水処理工程での魚類繁殖影響の低減効果や処理水の繁殖影響レベルについて定量的な評価は行われていない。

そこで本研究では、繁殖影響の評価に重要と考えられる生殖、成長関連遺伝子群を選出し、メダカを試験魚とし急性毒性試験と同じ96時間の半止水式で化学物質、下水試料、河川水への曝露実験を行い、マイクロアレイを用いて、生殖、成長関連遺伝子群の各遺伝子発現強度を取得した。化学物質曝露試験は選出した遺伝子群の妥当性評価、下水試料曝露試験は下水処理工程での生殖、成長関連遺伝子群の発現変動抑制効果の評価、河川水曝露試験は下水処理水の影響レベルを河川水と相対比較するためとした。生殖、成長関連遺伝子群の各遺伝子発現強度はユークリッド距離での定量的評価を試みた。

評価対象下水処理は、活性汚泥処理（二次処理）と、二次処理水中に残存するエストロゲンや医薬品の除去効果が期待できる⁸⁾微生物保持担体処理（以降、担体処理）とした。さらに、遺伝子発現レベルの影響と個体レベルの影響の関連を明らかにするため、活性汚泥処理水と担体処理水については産卵実験を行った。

2. 実験方法

(1) 下水処理プロセス

図-1に実験に使用した下水処理パイロットプラントの概要を示す。実験装置は、最初沈殿池（500L）、活性汚泥処理槽（500L×4槽）、最終沈殿池（700L）、担体処理槽（40L）から構成されている。流入下水は、主に生活排水が流入する実下水処理場の生下水を用いた。活性汚泥槽は、第1槽から第4槽まで全面エアレーションを行う、標準活性汚泥法による処理とした。水理学的滞留時間

図-1 下水処理装置の概要

（HRT）は7時間程度である。担体処理槽は、微生物が自然発生的に保持されたポリプロピレン製円筒担体（φ5mm、長さ5mm、厚さ1mm）が充填され、水理学的滞留時間2時間で二次処理水を処理した。メダカの曝露水は、流入下水、二次処理水、担体処理水とし、対照区は水道水を活性炭処理した脱塩素水道水とした。採水時期は、2012年11月8～9日で、24時間連続採水とした。

(2) メダカの96時間曝露実験と遺伝子発現解析の方法

メダカの96時間曝露実験および遺伝子発現解析は、表-1の条件で行った。性周期がなく遺伝子発現が安定している雄メダカでの評価を基本としたが、繁殖を考慮する場合、雌への影響把握も必要と考えられるため、下水処理水曝露試験については、雌メダカの曝露実験も追加した。なお、下水試料、化学物質、河川水の曝露実験は、採水スケジュールの都合上、下水試料曝露と同時にには行えなかった。

解析対象臓器は肝臓とした。繁殖影響は生殖腺で解析することも考えられるが、肝臓は多様な機能を担っており、様々な生体影響を検出できると考えられること、雄魚の雌性化のマーカー遺伝子が肝臓において低エストロゲン濃度で誘導される⁹⁾こと、解析臓器を決定するための予備実験¹⁰⁾としてエストロンに曝露したメダカの肝臓と精巣の遺伝子発現解析を行ったところ、肝臓で繁殖関

表-1 メダカの曝露条件

試験魚	d-rR系 ヒメダカ(6～7カ月齢)
曝露匹数	雄メダカ 6匹 / 曝露区 雌メダカ 6匹 / 曝露区(下水試料のみ)
曝露時間	96時間
曝露水量	3L
曝露方式	半止水式(1日1回全換水)
曝露下水試料	流入下水 二次処理水 担体処理水 脱塩素水道水(対照区)
曝露化学物質	エストロン クラリスロマイシン 塩化アンモニウム 脱塩素水道水(対照区)
曝露河川水	河川水(生物類型AA地点) 脱塩素水道水(対照区)
設定水温	24℃
照明	明期16時間/暗期8時間
給餌	なし
曝気	DOが低い試料は緩やかに曝気 飽和溶存酸素濃度の50%以上を確保
解析臓器	肝臓
RNA抽出法	RNeasy mini kitにより1個体毎に抽出
RNA試料の調整	下水試料では、同曝露区の2匹分を1つに混合し、3検体で解析(化学物質、河川水:同曝露区を、3匹分を1つに混合し2検体で解析)
遺伝子発現解析法	マイクロアレイ法(Agilentのプロトコルに従う)
規準化法	グローバルノーマライゼーション
遺伝子発現の数値化	発現強度をlog ₂ 変換後、2または3検体を平均

連遺伝子の発現変動が大きかったことから、肝臓を選択した。

遺伝子発現解析は、Agilent 製 8×60 K のカスタムアレイで実施した。マイクロアレイ搭載遺伝子は、データベースとして利用¹¹⁾されることが多い Dana Farber Cancer Institute (DFCI)¹²⁾ の Medaka Gene Index Release 8.0 を基に、Agilent が提供しているプローブ配列設計ツール (e-Array) でプローブ配列を設計したものである。マイクロアレイに搭載した遺伝子の機能は、DFCI の Medaka Gene Index サイトからは十分に得られなかった。生物影響を遺伝子の機能別に解析するためには、遺伝子に機能情報を付加する必要がある。遺伝子の機能は、NCBI (National Center for Biotechnology Information) が提供している類似配列検索プログラムの Blastx を利用した同源性検索から取得する方法¹³⁾がある。本研究では、NCBI のヒトのリファレンスシーケンス (Refseq) に対してプローブの基になったメダカ配列を用いて Blastx で同源性検索を行い、ヒトの Refseq ID を取得した。次に、Refseq ID を基に UniProt (Universal Protein Resource) のデータベースから、マイクロアレイ搭載遺伝子にヒトの Gene Ontology (遺伝子の機能情報) を付加した。

Gene Ontology 情報は、biological process (生物学的プロセス)、cellular component (細胞の構成要素)、molecular function (分子機能) のカテゴリーに分類されるが、biological process の中から繁殖への影響が大きいと考えられる sexual reproduction GO:0019953 (有性生殖)、growth GO:0040007 (成長) に属する遺伝子群を選出した。Gene Ontology データベースは、機能毎の階層構造になっており、下層ほどより詳細な機能に分類される。sexual reproduction、growth の各下層に属する遺伝子も、sexual reproduction、growth のそれぞれに含めることとした。

選出した機能毎の遺伝子群の発現変動から、影響を定量的に評価するためには、多数の遺伝子の発現情報から 1 つの指標を導出する必要がある。指標として利用される主なものには、ユークリッド距離とピアソン相関係数がある¹⁴⁾。1 個のマーカー遺伝子で評価する場合、対照区との遺伝子発現倍率が指標とされるが、ユークリッド距離はマーカー遺伝子が複数個のケースに拡張したものであり、類似性評価の基本として広く利用されている。本データでユークリッド距離とピアソン相関係数を算出し比較したところ同様の結果が得られたが、ピアソン相関係数は、遺伝子発現変動の大きさはあまり反映されない¹⁵⁾ことが知られている。そこで、下水試料に曝露したメダカの機能毎の遺伝子群の発現強度から、式 (1) に示したユークリッド距離 (d) を用いて、下水試料曝露区の、対照区に対する類似性を数値化した。算出された下水処理工程水のユークリッド距離を処理工程間で比較するこ

とにより、下水処理工程での影響低減効果を評価した。

$$d = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - x_i)^2} \quad (1)$$

ここで、

$x = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$ は対照区の遺伝子発現強度 (Log_2)、 $y = \{y_1, y_2, \dots, y_n\}$ は各曝露区の遺伝子発現強度 (Log_2) である。

(3) 化学物質曝露試験と河川水曝露試験

sexual reproduction と growth 関連遺伝子としてそれぞれ選出された遺伝子群について、生物影響の判別性や定量性を確認しておく必要があると考えられた。そこで、作用機序の異なる複数の純物質の曝露試験から遺伝子発現パターンの違いや、濃度依存性を確認することとした。曝露物質は、下水試料に高濃度で含まれ水生生物への影響が懸念されている物質の中から、それぞれ作用機序が異なると考えられるエストロン (E1)、塩化アンモニウム (NH_4Cl)、クラリスロマイシンについて曝露実験を行った。

E1 は、エストロゲンの一種であることから sexual reproduction に強い影響を与えると考えられる。 NH_4Cl に含まれる NH_4^+ は、水生生物に対して急性、慢性影響を有することが知られ、魚類の産卵や成長にも影響するとの報告^{16) 17)}があり、sexual reproduction と growth に影響すると考えられる。クラリスロマイシンは、抗生物質であり藻類に影響することが報告¹⁸⁾されているが、魚類の繁殖影響については明らかでない。

曝露濃度は、下水試料で存在する範囲^{1) 19) 20)}とし、E1 は、2, 20, 200 ng/L、 NH_4Cl は、3.2, 10, 32 mg- NH_4L (2.5, 7.8, 25 mgNL)、クラリスロマイシンは、50, 500, 5000 ng/L とした。E1、クラリスロマイシンはアセトンで溶解した原液を作成し、一定量をガラス瓶に取り、アセトンを窒素吹付で完全に留去し、脱塩素水道水を希釈水として濃度調整を行った。 NH_4Cl は脱塩素水道水で希釈した。

下水処理水を河川維持、修景用水として再利用する上で、繁殖影響を河川水と比較する必要があると考えられたため、水生生物の保全に係る環境基準の生物 A 類型に指定されている多摩川上流の拝島橋付近の河川水も採水し、下水処理水との相対比較のための曝露試料とした。河川水の採水は 2013 年 1 月 30 日にスポット採水した。

(4) 水質分析の方法

下水処理水と河川水の水質の確認と、下水処理工程での処理状況の把握、および、エストロゲンと無機態窒素

濃度の遺伝子発現への影響との関係を考察するために、下水処理工程水と河川水のDOC, NH₄-N, NO₃-N濃度を測定し, E1とE2は固相抽出-GC/MS法²⁰⁾で, クラリスロマイシンは固相抽出-LC/MS/MS法²²⁾で測定した。

(5) 二次処理水, 担体処理水の産卵実験

遺伝子発現レベルの影響と個体レベルの影響の関係解明が重要であることから, 二次処理水と担体処理水については, メダカ成魚を用いた産卵実験を行った。実験期間は96時間曝露実験の採水日の前後の約1カ月間である。曝露条件は, 30 Lのガラス製水槽に6~7カ月齢のメダカ12ペアを投入し, 給餌有, 水温26℃での流水方式である。対照区は脱塩素水道水とした。曝露期間中は, 毎日, 各曝露区の受精, 未受精卵数を計数した。

3. 実験結果と考察

(1) sexual reproductionとgrowth関連遺伝子の選出結果

DFCIのMedaka Gene Indexのデータベースに登録されている遺伝子の中には, 同じ遺伝子が重複登録されているものがあったため, 今回選出したsexual reproductionとgrowth 関連遺伝子の中にも, 同じGene symbolが付加された遺伝子が重複して選出されていた。そこで, 解析上の重複を避けるため, 同じGene symbol が付加された遺伝子は同一と見なし, 相同性が最も高い遺伝子1つに統一した。さらに, 相同性を示す指標であるE-valueが0.01以上となった遺伝子は相同性が低いと判断し解析対象遺伝子から除外した。また, マイクロアレイのバックグラウンドノイズの影響を避けるため, 全下水試料曝露実験に

表-2 sexual reproduction および growth 関連遺伝子のうち, ユークリッド距離算出に使用した遺伝子の一覧表

<p>sexual reproduction (GO:0019953) 123遺伝子</p> <p>achalasia, adrenocortical insufficiency, alacrimia 4-aminobutyrate aminotransferase acyl-CoA synthetase bubblegum family member 2 activin A receptor, type 1 angiotensinogen A kinase (PRKA) anchor protein 9 apolipoprotein B asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated UDP-Gal4betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1 BCL2-associated atthangene 6 Bardet-Biedl syndrome 2 B-cell receptor-associated protein 31 BCL2-like 1 bromodomain containing 2 calreticulin chaperonin containing TCPI, subunit 2 (beta) chaperonin containing TCPI, subunit 3 (gamma) chaperonin containing TCPI, subunit 4 (delta) chaperonin containing TCPI, subunit 5 (epsilon) chaperonin containing TCPI, subunit 6A (zeta 1) chaperonin containing TCPI, subunit 7 (eta) calcium and integrin binding 1 (calmyrin) clock circadian regulator cAMP responsive element binding protein 3-like 4 cAMP responsive element modulator cartilage associated protein cathepsin H D-aspartate oxidase death effector domain containing dihydropyrimidine dehydrogenase deleted in primary ciliary dyskinesia homolog (mouse) eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 beta, 38kDa eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3 eukaryotic translation initiation factor 4H excision repair cross-complementation group 1 family with sequence similarity 50, member A Fanconi anemia, complementation group G fetuin B guanidinoacetate N-methyltransferase glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic growth differentiation factor 9 germ cell-less, spermatogenesis associated 1 glucosamine-6-phosphate deaminase 1 HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 4 HERPUD family member 2 hexosaminidase B (beta polypeptide) histone cluster 1, H1a high mobility group box 2 hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD) heat shock 70kDa protein 1-like IMP2 inner mitochondrial membrane peptidase-like inhibitor of growth family, member 2 inositol polyphosphate-5-phosphatase, 75kDa junction plakoglobin katanin p60 subunit A-like 1 lysine (K)-specific demethylase 2B leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 4 male-enhanced antigen 1 MER proto-oncogene, tyrosine kinase matrix metalloproteinase 19 mutS homolog 2 macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like) mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase) MYC binding protein NDG1 transmembrane nucleoporin NDRG1 family member 3 nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1 nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2</p>	<p>nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2 purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1 poly(A) binding protein, cytoplasmic 1-like platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1 platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, catalytic subunit 2 poly(A) binding protein interacting protein 2 pantothenate kinase 2 progesterin and adipoQ receptor family member VII parkinson protein 7 phosphoglycerate mutase 2 phosphoglucomutase 3 phosphatidic acid phosphatase type 2A protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B peroxiredoxin 4 proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4 phosphatase and tensin homolog poliovirus receptor-related 2 RAD18 E3 ubiquitin protein ligase RAD23 homolog B retinol binding protein 4, plasma rhomboid domain containing 1 ring finger protein 114 ring finger protein 151 ring finger protein 8, E3 ubiquitin protein ligase RuvB-like AAA ATPase 1 SET binding factor 1 SEC23 interacting protein selenoprotein P, plasma, 1 sphingosine-1-phosphate lyase 1 sex hormone-binding globulin siah E3 ubiquitin protein ligase 1 solute carrier family 22, member 16 SRA stem-loop interacting RNA binding protein SMAD family member 5 superoxide dismutase 1, soluble spermatogenesis associated 5 SRF protein kinase 1 serine/threonine/tyrosine interacting protein T, brachyury homolog t-complex 1 t-complex 11, testis-specific transforming growth factor, beta 1 thyroid hormone receptor, beta tripartite motif containing 27 translin-associated factor X VPS33B interacting protein, apical-basolateral polarity regulator WD repeat domain 33 5'-3' exoribonuclease 2 Y box binding protein 2 Y box binding protein 3 YY1 transcription factor zinc finger protein 148 zona pellucida glycoprotein 1 (sperm receptor) zona pellucida glycoprotein 3 (sperm receptor)</p> <p>growth (GO:0040007) 83遺伝子</p> <p>actin, alpha 1, skeletal muscle activin A receptor, type IIB adrenomedullin angiotensinogen alkB, alkylation repair homolog 1 ankyrin repeat domain 11 apolipoprotein A-V androgen receptor asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated ATPase family, AAA domain containing 3A activating transcription factor 5 ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit e1 BCL2-like 1</p>	<p>bone morphogenetic protein 2 bromodomain containing 4 cyclin G1 cell division cycle 42 cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2) cordon-bleu WH2 repeat protein carboxypeptidase Q cytoplasmic FMRI interacting protein 1 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 5 deleted in malignant brain tumors 1 eukaryotic translation initiation factor 4H epithelial membrane protein 3 enolase 3 (beta, muscle) ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2 ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5 erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5 excision repair cross-complementation group 1 excision repair cross-complementation group 2 FK506 binding protein 8, 38kDa glucose-6-phosphatase, catalytic subunit growth arrest-specific 1 growth differentiation factor 10 growth differentiation factor 9 GINS complex subunit 1 GNAS complex locus glutathione peroxidase 1 gelsolin hematopoietically expressed homeobox insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) insulin-like growth factor binding protein 1 Kruppel-like factor 2 late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 2 leucine proline-enriched proteoglycan (leprecan) 1 msh homeobox 2 mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase) nascent polypeptide-associated complex alpha subunit NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6, 13kDa ninjurin 1 NOP58 ribonucleoprotein neurophilin 1 nucleotide binding protein 1 nuclear protein, transcriptional regulator, 1 partner and localizer of BRCA2 peptidoglycan recognition protein 2 protein phosphatase 1, regulatory subunit 13 like prosapin phosphatase and tensin homolog retinoblastoma binding protein 6 Ras-related GTP binding C retinoid X receptor, alpha scaffold attachment factor B Shwachman-Bodian-Diamond syndrome Sec61 alpha 1 subunit selenoprotein M selenoprotein P, plasma, 1 SET domain, bifurcated 1 secreted frizzled-related protein 1 sex hormone-binding globulin SMAD family member 2 sprouty homolog 2 serum response factor ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 2 tec protein tyrosine kinase tensin like C1 domain containing phosphatase transforming growth factor, beta 1 transforming growth factor, beta 3 transmembrane 4 L six family member 4 5'-3' exoribonuclease 2 zinc finger protein 830 ZPR1 zinc finger</p>
--	--	--

において、遺伝子発現強度がバックグラウンド以上の遺伝子のみを解析に使用した。その結果、sexual reproduction 関連遺伝子123 個、growth 関連遺伝子83個が選出された。

表-2にsexual reproduction およびgrowth 関連遺伝子のHuman maker gene nameを示した。

図-2 NH₄Cl 曝露区における、対照区と曝露区の雄メダカ sexual reproduction 関連遺伝子群の発現強度のスカッタープロットとユークリッド距離

図-3 E1, クラリスロマイシン, 塩化アンモニウムの sexual reproduction への影響

図-7 下水処理工程水, 河川水の sexual reproduction への影響

図-4 E1, クラリスロマイシン, 塩化アンモニウムの growth への影響

図-8 下水処理工程水, 河川水の growth への影響

図-5 E1, クラリスロマイシン, 塩化アンモニウムの immune response への影響

図-9 下水処理工程水, 河川水の immune response への影響

(2) 化学物質曝露試験におけるsexual reproductionとgrowth への影響

図-2に、 NH_4Cl 曝露区のsexual reproductionの関連遺伝子群の、対照区に対する各曝露区の各遺伝子発現強度のスクエッタープロットとユークリッド距離を一例として示した。図より、高濃度 (32mg- NH_4N) 曝露区では、低、中濃度曝露区と比較すると、対角線上から離れる遺伝子が多いことがわかる。遺伝子発現への影響が小さい試料では、遺伝子発現パターンが対照区と近くなっており、ユークリッド距離も小さい値をとることがわかる。

図-3に、各化学物質曝露区のsexual reproductionのユークリッド距離を示した。図-4は、growthの結果である。sexual reproductionへの影響についてみると、E1とアンモニアは濃度依存的に増加し、特に、E1 200 ng/L、 NH_4Cl 32 mg- NH_4N 曝露区でユークリッド距離が大きく上昇していた。クラリスロマイシン曝露区では顕著な増加は確認されなかった。growthへの影響についてみると、アンモニア曝露区でユークリッド距離が濃度依存的に上昇していた。E1、クラリスロマイシンでは顕著な増加は確認されなかった。sexual reproductionとgrowth関連遺伝子群から算出されたユークリッド距離は、繁殖または成長影響の定量的評価に利用できるものと考えられた。

クラリスロマイシンのsexual reproductionとgrowth関連遺伝子群以外の生物影響を確認するため、薬物代謝 (drug metabolic process) 関連遺伝子を選び、ユークリッド距離を求めたところ、曝露濃度によらず変化は小さかった。クラリスロマイシン曝露区で遺伝子発現変動がみられた遺伝子の機能を調べたところ、免疫関連遺伝子への影響が確認された。図-5は、immune response (GO:0006955) 関連の283個の遺伝子から計算されたユークリッド距離である。immune responseへの影響は、クラリスロマイシン 500ng/L、5,000ng/L曝露区と NH_4Cl 32 mg- NH_4N 曝露区で大きな値を示した。

異なる遺伝子機能から算出されたユークリッド距離は、化学物質の特性や濃度に応じた変化を示すことがわかった。

(3) 下水処理工程水と河川水の水質分析結果

図-6に下水処理工程水と河川水のDOC、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、

図-6 下水処理工程水と河川水の DOC、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、E1、E2、クラリスロマイシン濃度

N、E1、E2、クラリスロマイシンの濃度を示す。DOCは、活性汚泥処理で83.3 %が除去され、担体処理ではこれ以上の除去はみられなかった。流入下水中の $\text{NH}_4\text{-N}$ は、活性汚泥処理で $\text{NO}_3\text{-N}$ に硝化され、二次処理水、担体処理水でほとんど検出されなかった。E1、E2は、活性汚泥処理で100 %近く除去されていた。クラリスロマイシンの除去率は、活性汚泥処理で28 %、担体処理まで含めると64 %となった。河川水のクラリスロマイシン濃度は低レベルであった。

(4) 下水処理工程水と河川水におけるsexual reproductionとgrowth への影響

図-7に、sexual reproductionについて下水処理工程水および河川水のユークリッド距離を示した。図-8は、growthの結果である。図-9にimmune responseの結果を参考として示した。

sexual reproductionへの影響についてみると、下水試料曝露区では、雄と雌メダカとも流入下水曝露区で影響が大きくなったが、活性汚泥処理で河川上流水と同レベルまで低減することがわかった。河川上流水のユークリッド距離の値に影響がないレベルと仮定し、この値をベースとして下水処理工程での影響の低減率を雄メダカの結果から算出すると、活性汚泥処理で89 %、担体処理では向上はみられなかった。この傾向は、DOC、E1、 $\text{NH}_4\text{-N}$ の除去と同様の傾向を示した。

growthへの影響についてみると、雄と雌メダカとも流入下水曝露区で影響が大きくなったが、活性汚泥処理で低下していた。雄メダカでは、処理の高度化に従い低下し、担体処理水は河川上流水と同レベルとなった。sexual reproductionと同様に、下水処理工程での影響の低減率を雄メダカの結果から算出すると、活性汚泥処理で52 %、担体処理を含めると87 %となった。雄メダカでは、担体処理は、growthへの影響の低減に寄与する結果となった。

雌メダカでは、sexual reproduction、growth、immune responseでユークリッド距離が、二次処理水と比較して担体処理水で上昇していた。特に、growthでその傾向は顕著であった。ユークリッド距離の上昇に寄与しているgrowthの下層機能を調べたところ、growth involved in

symbiotic interaction(GO:0044110)の寄与が大きいことがわかった。担体処理水曝露区の雌メダカでこの機能が上昇した理由については明らかにならなかった。

流入下水曝露区のユークリッド距離から算出されたsexual reproductionとgrowthの影響レベルが、実際に個体に影響が表れるレベルであったかどうかについては、今回の実験から明らかにはならない。そこで、魚類へのE1とアンモニアの曝露実験を行っている先行研究から考察すると、メダカを試験魚としたE1の多世代曝露試験において、E1 91ng/L以上で産卵数や受精率の低下、生殖腺には47 ng/Lでも影響が出る場合があったとの報告²³⁾がある。今回の実験での流入下水のE1濃度は9.3 ng/Lと低かったが、E2は3.7 ng/L検出されていた。E1濃度に、E2濃度をE1濃度に等量換算²⁴⁾した値を加えるとE1総量は63 ng/Lとなる。この濃度は、産卵数や受精率の低下には至らないが、生殖腺組織に影響を与えるレベルを上回っている。アンモニアについては、コイ科魚類でTotal ammonia-nitrogen 15 mg/N/L (19 mg-NH₄/L) 以上で産卵数の低下¹⁶⁾、0.8 mg/N/L (1 mg-NH₄/L) でも成長阻害¹⁷⁾が生じることが報告されている。流入下水のNH₄-Nは、19 mg/N/L (24 mg-NH₄/L) であり影響が生じるレベルを上回っている。以上から、流入下水は、産卵や成長に影響が生じるレベルであったと考えられる。

(5) 二次処理水、担体処理水の産卵実験の結果

図-10に二次処理水、担体処理水の産卵実験での各曝露水のDOC、NO₃-N、クラリスロマイシン濃度の結果と雌1匹・1日当たりの累積受精卵数の変化を示した。二次処理水、担体処理水のNH₄-N濃度は0.12 mg/N/L、E1、E2濃度は0.7 ng/L以下であった。図-8の水質分析結果には、11月8～9日の24時間採水時の水質分析値も合わせて示した。産卵実験期間中の各曝露区の水質は、概ね96時間曝露実験の水質と同等であったと考えられる。

雌1匹・1日当たりの累積受精卵数は、二次処理水曝露区で対照区より多い傾向を示し、担体処理水曝露区と対照区の累積受精卵数はほぼ等しかった。対照区、二次処理、担体処理曝露区の平均受精率は、それぞれ、63 %、69 %、64 %であり顕著な違いはみられなかった。今回の二次処理水、担体処理水曝露区のsexual reproduction関連遺伝子群から算出されたユークリッド距離のレベルは、成魚の産卵には影響がないレベルであったと考えられる。

下水処理水を河川維持や修景に再生利用する場合、利用先に生息する水生生物は再生水に曝露されるため、水生生物への安全性を評価する手法が求められる。そのため、再生水の河川維持や修景利用に対して、sexual reproduction、growth関連遺伝子群から算出されるユークリッド距離を用いた安全性評価を実施するための手法が

図-10 産卵実験での水質分析結果と
雌1匹・1日当たりの累積受精卵数の変化

必要となる。評価手法の1つとして再生水の利用用途ごとにユークリッド距離の基準値を導出することが考えられる。基準値の導出のためには、影響が生じる濃度の化学物質溶液または、安定した排水を用い、希釈段階を設定し、遺伝子発現と産卵、仔稚魚の成長も含めたフルライフサイクルでの試験を同時並行で実施する必要がある。しかしながら、膨大な時間と実験費用を要し簡単には行えない。代替案として、遺伝子発現を指標とした短期間曝露による繁殖や成長影響の評価を、評価対象とする再生水と、利用先として想定される環境水に適用し、比較することで、利用用途ごとに再生水の安全性を相対的に評価することが現時点では妥当と考えられる。

4. おわりに

下水処理水の再利用の主要用途として、河川維持用水、修景用水が大きな割合を占め、今後、再利用量も増大していくと考えられる。下水処理水には魚類繁殖に影響を与える物質が残存する場合があります。下水処理水の魚類繁殖影響を短期間で推測するための方法が必要とされている。本研究では、繁殖に係る生殖、成長関連遺伝子群を選出し、その遺伝子発現を指標として、メダカを試験魚とする96時間の曝露実験から、活性汚泥処理、

微生物保持担体処理での生殖，成長関連遺伝子群の発現変動抑制効果の評価を試みた．本研究で得られた成果を以下に示す．

- 1) 下水処理工程水のメダカ繁殖への遺伝子レベルでの影響は，ヒトの遺伝子機能情報から選出したメダカのsexual reproductionやgrowth関連遺伝子群について，下水試料曝露区と対照区の遺伝子発現強度の差異をユークリッド距離で示すことにより，定量的に評価できることがわかった．
- 2) 化学物質曝露試験の結果より，E1はsexual reproductionに，アンモニアは，sexual reproductionとgrowthどちらの遺伝子群にも影響を及ぼすことが確認され，ユークリッド距離は化学物質の特性や濃度に従った変化を示すことがわかった．
- 3) 下水処理工程水と河川水の雄メダカの曝露試験の結果より，流入下水のsexual reproductionやgrowthへの影響は，活性汚泥処理で大きく低減され，後段に微生物保持担体処理を追加することにより，水生生物の保全に係る水質環境基準の生物A類型に指定されている河川レベルまで低減できることがわかった．
- 4) 二次処理水，担体処理水曝露区のsexual reproduction関連遺伝子群から算出されたユークリッド距離のレベルは，メダカ成魚の産卵実験により，産卵に影響がないレベルであることが確認された．

謝辞：本研究は独立行政法人科学技術振興機構，CREST戦略的創造研究推進事業「21世紀型都市水循環系の構築のための水再生技術の開発と評価」の助成を受けて実施した．ここに記して謝意を表す．

参考文献

- 1) K.Komori, H. Tanaka, Y. Okayasu, M. Yasojima and C. sato : Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan, Water Science & Technology, 50(5), 93-100, 2004
- 2) 南山瑞彦, 小森行也, 北村友一, 鈴木穰, 岡安祐司 : 下水道における生理活性物質の実態把握と制御に関する研究, 土木研究所資料 平成 22 年度下水道関係調査研究年次報告書集, pp. 195-224, 2011
- 3) 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会 : 生物応答を用いた排水試験法（検討案）, 平成26年3月
- 4) 山本裕史, 矢野陽子, 森田隼平, 西家早紀, 安田侑右, 田村生弥, 鎌迫典久 : 下水処理施設放流水中の残留塩素に着目した毒性同定評価, 土木学会論文集G（環境）, Vol.69, No.7, pp.375-384, 2013
- 5) Gerald T. Ankley; Richard S. Bennett; Russell J. Erickson; Dale J. Hoff; Michael W. Hornung; Rodney D. Johnson; David R. Mount; John W. Nichols; Christine L. Russom; Patricia K. Schmieder; Jose A. Serrano;

Joseph E. Tietge; Daniel L. Villeneuve : Adverse Outcome Pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment, Environ. Toxicol. Chem. 29(3), pp.730-741, 2010

- 6) Natalia Garcia-Reyeco, Candice M. Lavelle, B. Lynn Escalon, Dalma Martinovic, Kevin J. Kroll, Peter W. Sorensen, Nancy D. Denslow : Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow, Aquat. Toxicol., 101, pp.38-48, 2011
- 7) Filip Cuklev, Lina Gunnarsson, Marija Cvijovic, Erik Kristiansson, Carolin Rutgersson, Berndt Björdenius, D.G. Joakim Larsson : Global hepatic gene expression in rainbow trout exposed to sewage effluents: A comparison of different sewage treatment technologies, Science of the Total Environment, 427-428, pp.106-114, 2012
- 8) 小森行也, 岡本誠一郎 : 活性汚泥処理プロセス及び微生物担体処理プロセスにおける医薬品の除去特性, 第 51 回環境工学フォーラム講演集, p.92-93, 2014
- 9) Masaru Ihara, Tomokazu Kitamura, Vimal Kumar, Chang-Beom Park, Mariko O. Ihara, Sang-Jung Lee, Naoyuki Yamashita, Shinichi Miyagawa, Taisen Iguchi, Seiichiro Okamoto, Yutaka Suzuki, and Hiroaki Tanaka : Evaluation of Estrogenic Activity of Wastewater: Comparison Among In Vitro ER α Reporter Gene Assay, In Vivo Vitellogenin Induction, and Chemical Analysis, Supporting Information, Environ. Sci. Technol., 49 (10), pp.6319-6326, 2015
- 10) 池田茂, 南山瑞彦, 北村友一, 村山康樹, 朴昶範 : 水生生物の生体反応を用いた下水処理水の毒性評価に関する研究, 土木研究所資料 平成 24 年度下水道関係調査研究年次報告書集, pp.119-145, 2013
- 11) 横田弘文 : 生態毒性用メダカマイクロアレイの開発, 第14回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会要旨, p.51, 2008
- 12) <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html>（最終チェック日 2013年2月6日）
- 13) Laura S. Robertson, Stephen D. McCormick : The effect of nonylphenol on gene expression in Atlantic salmon smolts, Aquatic Toxicology, 122-123, pp.36-43, 2012
- 14) Issac S. Kohane, Alvin T. Kho, Atul J. Butte, 訳 : 星田有人 : 統合ゲノミクスのためのマイクロアレイデータアナリシス, Springer-Verlag Tokyo, pp.128-129, 2004
- 15) 岸克行 : 内分泌攪乱化学物質問題における分析ツールとしてのDNAマイクロアレイ, 環境技術, 36, 11, p.787, 2007
- 16) Brandon M. Armstrong, James M. Lazorchak, Cheryl A. Murphy, Herman J. Haring, Kathleen M. Jensen, Mark E. Smith : Determining the effects of ammonia on fathead minnow (*Pimephales promelas*) reproduction, Sci. Total Environ., 420, pp.127-133, 2012
- 17) Amit Kumar Sinha, Marjan Dirix, Lai Pong Chan, Hon Jung Liew, Vikas Kumar, Ronny Blust, Gudrun De Boeck : Expression pattern of potential biomarker genes related to growth, ion regulation and stress in response to ammonia exposure, food deprivation and exercise in

- common carp (*Cyprinus carpio*), *Aquatic Toxicology*, 122–123, pp.93-105, 2012
- 18) Arata Harada ,Koya Komori, Norihide Nakada, Kiyooki Kitamura, Yutaka Suzuki : Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river waters affected by different wastewater treatment levels, *Water Science and Technology*, Vol.58, No.8, pp.1541-1546, 2008
 - 19) Gopal Chandra Ghosh, Takashi Okuda Naoyuki Yamashita Hiroaki Tanaka : Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in Japan and their effects on bacterial ammonia oxidation: *water sci. technol.* 59(4), pp.779-786, 2009
 - 20) 東京都下水道局 : 芝浦水再生センターにおける全窒素流入負荷に関する一考察, 東京都下水道局技術調査年報, 2008
 - 21) Norihide Nakada, Hiroshi Nyunoya, Masaru Nakamura, Akihiko Hara, Taisen Iguchi, Hideshige Takada : Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(12), pp.2807-2815, 2004
 - 22) 小西千絵, 宝輪勲, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明 : 水環境中医薬品のLC-MS/MSによる一斉分析法の検討, *環境工学研究論文集*, 43, pp.73-82, 2006
 - 23) Ataru Nakamura, Ikumi Tamura, Hitomi Takanobu, Masumi Yamauro, Taisen Iguchi, Norihisa Tatarazako : Fish multigeneration test with preliminary short-term reproduction assay for estrone using Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *J. Appl. Toxicol.*, 35(1), pp.11-23, 2015
 - 24) 北村友一, 真野浩行, 岡本誠一郎, 鈴木穰, 李相重, 山下尚之, 井原賢, 田中宏明, 小林憲太郎, 高島寛生 : NF, RO膜処理によるメダカ性特異遺伝子発現の変動抑制効果, *土木学会論文集G (環境)*, Vol.70, No.7, pp.73-80, 2014

(2015. 5. 22 受付)

EVALUATION OF TREATMENT PROCESS ON THE REDUCTION OF BIOLOGICAL EFFECT OF WASTEWATER WITH SELECTED GENE EXPRESSIONS FOR SEXUAL REPRODUCTION AND GROWTH IN MEDAKA

Tomokazu KITAMURA, Hiroyuki MANO, Koya KOMORI, Seiichiro OKAMOTO, Yutaka SUZUKI

Biological effects of raw and treated wastewater were evaluated by selecting gene expressions for sexual reproduction and growth in male and female Medaka, and after 96 hour exposure to the samples by comparing the differences in the extent of the gene expressions between control and exposure in the form of Euclidian distance. In addition, reproduction tests using adult Medaka were carried out in the treated wastewater in order to clarify the relationship between the gene expression level and egg laying. As a result, by the treatment of activated sludge process and microbial carrier, biological effects evaluated by the gene expression were reduced to the level of a river with the category of Aquatic life A of the environmental quality standards for conservation of aquatic lives. Also, adverse effect of treated wastewater on the egg laying was not confirmed.