

メダカの遺伝子発現解析を利用した下水処理水のバイオモニタリング法の開発

北村友一・小川文章

1. はじめに

近年、女性ホルモン様物質やその他の化学物質が下水処理水中に残存する場合があることが報告^{1),2)}され、下水処理水の放流先や再利用先での魚類への影響が懸念されている。下水処理水の水質管理は、化学物質ごとの排水規制に基づき実施されてきたが、毒性が明らかになっていない未規制化学物質や、多種多様な化学物質の複合影響を考慮すると、放流先の状況にもよるが、魚類生態保全のためには、直接的な**バイオアッセイ***から下水処理水の魚類影響を確認することも必要になると考えられる。

下水処理水の魚類影響は、魚類生態保全を考慮すると、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ことが望ましい。土木研究所水質チームでは魚類の繁殖を指標とした下水処理水の評価も試行している³⁾が、産卵、ふ化、成長、さらに、次世代のこれらの影響まで考慮した繁殖試験には、流水方式で1年近く下水処理水への曝露が必要となる。

魚類個体群存続への影響を未然に防ぐためには、スポット採水試料や短期間曝露試験から下水処理水の魚類への繁殖影響を評価する必要があり、魚類繁殖影響が短期間で評価できる新しいバイオアッセイ法の開発が望まれている。

近年の**遺伝子発現解析***技術の進歩により、一度の試験で数万種類の遺伝子発現の変化を検出できるようになってきている。遺伝子発現は、ストレスに敏感で応答も早いことが知られおり、生殖や成長に関する遺伝子発現を指標とすることにより、繁殖影響を短期間で推測できる可能性がある。水質チームでは、バイオアッセイに遺伝子発現解析を取り入れた革新的な水質評価法の開発を行っており⁴⁾、本報告はメダカの網羅的遺伝子発

現解析を用いて、下水処理工程での魚類繁殖影響の低減効果を評価した研究を紹介する。

2. 実験方法

2.1 下水処理実験

評価対象とした下水処理法は、活性汚泥処理（以降、活性汚泥法で処理した水は「二次処理水」とする。）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⁵⁾微生物保持担体処理（以降「担体処理」とする。）とした。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、活性汚泥処理槽、最終沈殿池、担体処理槽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である。活性汚泥処理槽は、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で、水学的滞留時間（HRT）は7時間程度であった。担体処理槽には、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。

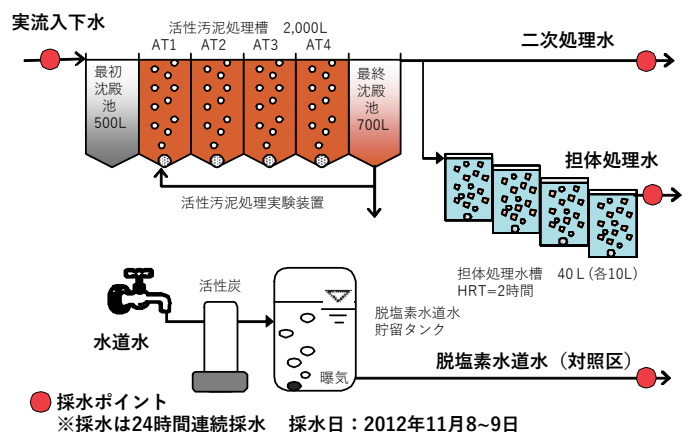


図-1 下水処理プラントの概要

Development of a Biomonitoring Method of Treated Sewage Using Gene Expression Analysis of Medaka
*用語解説：バイオアッセイ、遺伝子発現解析

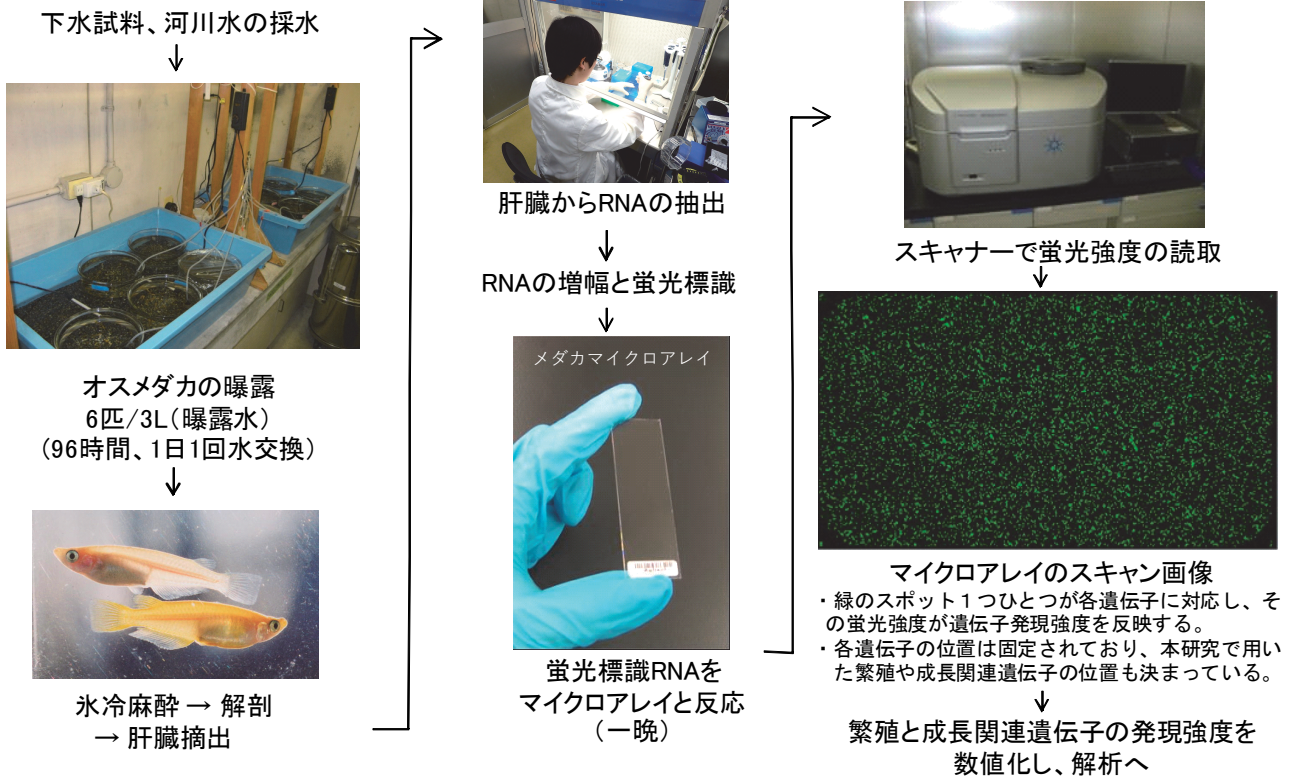


図-2 メダカの曝露実験とマイクロアレイによる遺伝子発現解析の手順

表-1 水域における生物類型指定の概要

類型	水生生物の生息状況の適応性
生物A	イワナ、サケマス等比較的低温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域
生物B	コイ、フナ等比較的高温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域

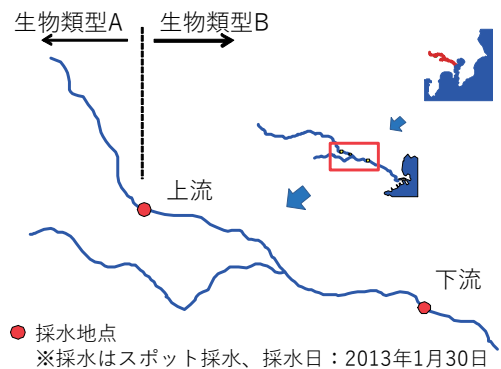


図-3 河川水の採水地点 (多摩川)

2.2 メダカ曝露実験と遺伝子発現解析の方法

メダカの遺伝子発現解析には、約 6 万種類のメダカの遺伝子発現が検出可能⁴⁾なマイクロアレイ^{*}を用いた。図-2 にメダカの曝露実験とマイクロアレイによる遺伝子発現解析の手順を示した。メダカの曝露実験は、ヒ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 (1 日 1 回水交換) で下水試料への曝露を行った。遺伝子発現解析は、マイクロアレイで検出可能な 6 万種類の遺伝子の中から繁殖影響の評価に重要と考えられる生殖に関連する 123 遺伝子⁶⁾と成長に関連する 83 遺伝子⁶⁾を選出し、その蛍光強度を用い

て行った。なお、マイクロアレイ上の各スポットの蛍光強度は各遺伝子発現強度を反映している。遺伝子発現解析法は、下水試料に曝露したメダカの生殖と成長に関連する遺伝子群の発現強度から、生殖と成長それぞれについて下水試料曝露区と対照区との差異をユークリッド距離 (d) で数値化した。各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。

ただし、現時点では、遺伝子発現強度 (本報ではユークリッド距離) と産卵数や受精率の低下、成長阻害などの生殖や成長への影響の関係についての知見が不十分であるため、遺伝子発現強度を

^{*}用語解説：マイクロアレイ

基準とした魚類繁殖影響の絶対評価は困難である。一方で、水生生物の保全を図る必要がある水域においては、水生生物の生息環境が詳細に調査され、表-1 のとおり類型指定が行われている。下水処理水の魚類への影響レベルは、類型指定されている水域の影響レベルと比較することで、相対評価が可能となると考えた。そこで、図-3 に示した A 類型と B 類型に指定されている水域の河川水を採水し、下水試料曝露実験と同条件で河川水のメダカへの曝露実験を行い、下水試料の影響レベルを河川水と相対比較した。

3. 実験結果

図-4 に流入下水、二次処理水、担体処理水、生物 A 類型河川水曝露区の生殖関連遺伝子群の、対照区に対する曝露区の各遺伝子発現強度のスカッタープロットとユークリッド距離(d)を一例として示した。図より、流入下水と二次処理水、担体処理水、生物 A 類型河川水曝露区とを比較すると、流入下水曝露区で対角線上から少し離れるプロットが多いことがわかる。プロットが対角線の近くにある場合は、対照区と曝露区の遺伝子発現パターンの差異は小さく、ユークリッド距離も小さい値となる。遺伝子発現パターンをユークリッド距離に変換することにより、曝露水の遺伝子発現への影響を定

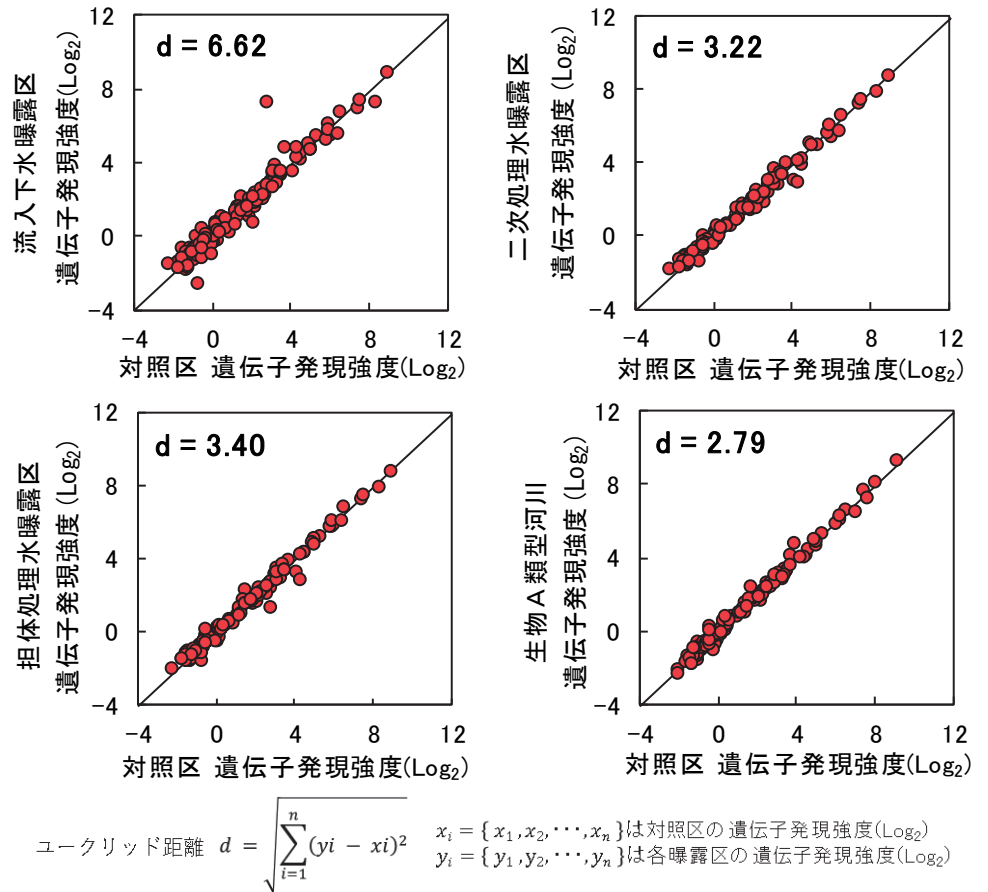


図-4 対照区と曝露区のメダカ生殖関連遺伝子群の遺伝子発現強度とスカッタープロットとユークリッド距離(d)

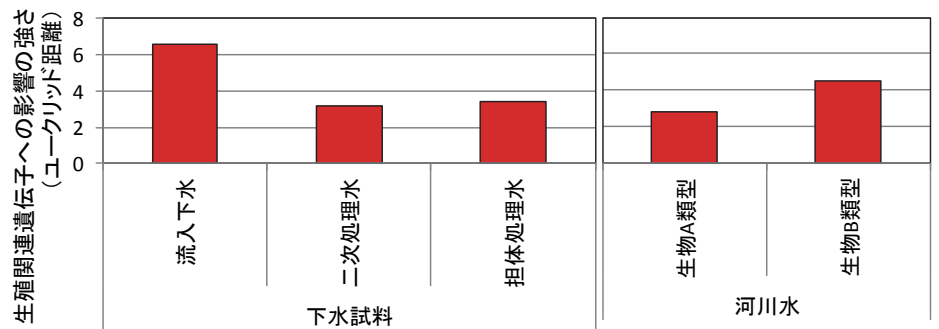


図-5 下水処理工程水、河川水の生殖関連遺伝子への影響

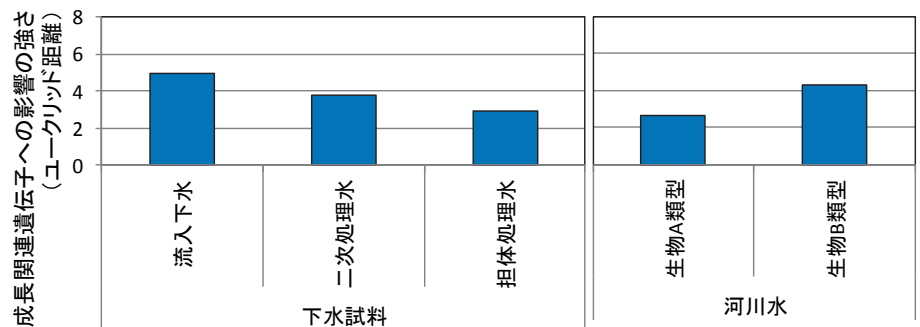


図-6 下水処理工程水、河川水の成長関連遺伝子への影響

量的に評価できることがわかった。

図-5 に、下水処理工程水および河川水の生殖関連遺伝子への影響の強さ（対照区と曝露区の差異をユークリッド距離で表示）を示した。図-6 は成長関連遺伝子への影響の強さの結果である。

生殖関連遺伝子への影響についてみると、下水試料曝露区では、流入下水曝露区で影響が大きくなったが、活性汚泥処理で生物 A 類型の河川と同レベルまで低減することがわかった。

成長関連遺伝子への影響についてみると、流入下水曝露区で影響が大きくなっていたが、活性汚泥処理で低減、担体処理後はさらに低下し、担体処理水は生物 A 類型と同レベルとなった。

4. まとめ

本報告では、魚類の繁殖に関係する生殖、成長関連遺伝子群の遺伝子発現を指標とし、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魚類繁殖影響の低減効果の評価例を紹介した。

研究成果の概要は、以下のとおりである。

- 1) 下水試料の生殖、成長関連遺伝子に及ぼす影響の数値化は、遺伝子群の発現パターンをユークリッド距離で表現することにより可能であった。
- 2) 流入下水が及ぼす生殖、成長遺伝子への影響は、活性汚泥処理で河川水レベルまで低減された。
- 3) 成長遺伝子への影響は、活性汚泥処理の後段に微生物保持担体処理を追加することにより、生物 A 類型に指定されている河川レベルまで低減できた。

5. おわりに

本研究で行ったメダカの遺伝子発現解析を導入したバイオアッセイは、96 時間という短期間曝

露実験からでも魚類繁殖影響の指標が得られることがわかった。今後は、試験法の精度を確認するとともに、実下水処理場の処理水や比較対象となる河川水のデータを数多く取得し、下水処理工程での魚類繁殖影響の低減効果を検証していく必要がある。また、現時点では、遺伝子発現強度を用いた魚類繁殖影響の絶対評価はできないため、遺伝子発現と実際の繁殖結果の比較などの知見の充実は重要となる。

参考文献

- 1) K.Komori et.al.:Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan, Water Science & Technology, 50, pp.93-100, 2004
- 2) 成宮 他：下水処理過程における医薬品類の存在実態と挙動、環境工学研究論文集、46、pp.175～186、2009
- 3) 北村 他：魚類の繁殖・稚魚の成育試験による下水処理水の安全性評価、土木研究所資料第 4294 号、平成 25 年度下水関係調査研究年次報告書、pp.146～151、2014
- 4) 鈴木 他：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、土木研究所資料第 4313 号、pp.610～646、2016
- 5) 小森 他：運転条件の異なる微生物担体処理における医薬品の除去特性、EICA、19、2-3 号、pp.15～16、2014
- 6) 北村 他：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、環境工学研究論文集第 52 巻、71Ⅲ、pp.161～169、2015

北村友一



土木研究所水環境研究グループ水質チーム主任研究員、博士（工学）
Dr.Tomokazu KITAMURA

小川文章



土木研究所水環境研究グループ水質チーム上席研究員
Fumiaki OGAWA