

# 魚類の遺伝子発現解析の活用による下水処理水の生物影響評価手法の効率化・高度化

北村友一・山下洋正

## 1. はじめに

下水処理水は河川の水質・水量に大きく影響する場合がある。都市河川では、河川水に占める下水処理水の割合が 50%を超える地点も存在する。下水道は都市活動で発生する様々な汚濁物質を受け入れているため、水生生物への影響が懸念される化学物質が下水処理水中に残存して放流される可能性がある。下水処理水の水生生物影響を把握し、必要に応じて下水処理工程での影響低減の可能性を検討することは、下水処理水放流先の水生生態系の保全に資する取り組みとなりうる。

下水処理水の水生生物影響の評価として、影響化学物質を機器分析で濃度測定する手法も実施されている。しかし、水生生物影響が未解明の化学物質の存在や複数の化学物質の複合影響については機器分析手法では評価が困難である。このため、下水処理水に水生生物を曝露し、死亡や成長阻害などを直接評価する生物応答試験に期待が寄せられている。生物応答試験は、米国等では藻類、甲殻類、魚類を用いた WET 試験が導入<sup>1)</sup>されている。日本でも「生物応答を用いた排水試験法（検討案）<sup>2)</sup>」が公表（平成 26 年 3 月）され、現在は事業者の自主的取り組みとして活用することと位置づけられている<sup>3)</sup>。下水処理水にこの生物応答試験を適用した著者らのチームの調査<sup>4)</sup>では、藻類、甲殻類への影響が確認される場合があったが、魚類への影響は認められず、3 生物種の中で魚類への影響は特に低いといえる。ただし、「生物応答を用いた排水試験法」の魚類影響は、胚・仔魚期の曝露により、ふ化率と仔魚の生存率で評価する試験である点に留意が必要である。

## 2. 魚類試験への遺伝子発現解析の活用

下水処理水放流先の魚類存続確保の観点からは、ライフステージの初期段階におけるふ化率や仔魚

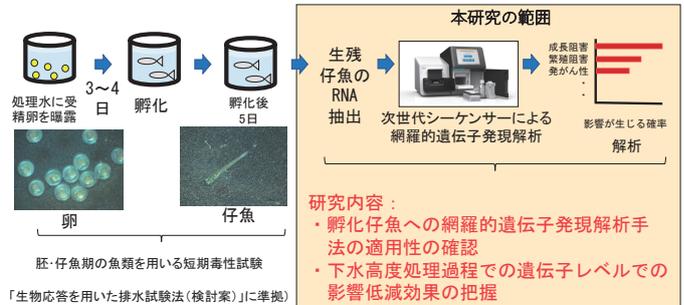


図-1 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験への遺伝子発現解析の追加のイメージ

の生存率だけではなく、その後の成長、繁殖、内分泌かく乱影響、次世代影響など多様な評価軸で下水処理水の魚類への影響を評価することも重要である。しかしながら、このためにはそれぞれの評価軸に対応する試験を別途行う必要があり、試験コストと労力を要するという難しい課題がある。

一方で、次世代シーケンサーなどの網羅的遺伝子発現解析技術の普及により、遺伝子レベルで生体影響を詳細に解析することが可能となっている。魚類試験に遺伝子発現解析を活用することにより、1 回の生物応答試験から、ふ化率や生存率を得るとともに、遺伝子レベルで様々な評価軸での影響評価が可能となり、試験の効率化、高度化が期待できる。

本研究では、図-1 に示すように、下水二次処理水を対象とし、胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験に、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を追加した。これにより、ふ化率と生存率の他に、生体維持に関わる様々な機能への影響の検出が可能かどうかを調査した。また、検出された遺伝子レベルの影響について、希釈効果とオゾン処理による低減効果も把握した。

## 3. 実験方法

### 3.1 下水処理実験および魚類曝露試験の方法

図-2 に本研究で用いた活性汚泥処理実験装置

とオゾン処理実験装置の概要を示す。本実験で使用した装置は、最初沈殿池、生物反応槽、最終沈殿池からなる活性汚泥処理実験装置、砂ろ過塔と、その後段のオゾン反応塔、担体槽から構成される。流入下水は、主に分流式下水道として整備され生活排水が流入する実下水処理場の生下水を用いた。生物反応槽は、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（HRT：約8時間、MLSS濃度：約2,300 mg/L、SRT：約9日）による処理を行った。オゾン処理の条件は、オゾン注入量を約3 mg/L、接触時間を約20分で砂ろ過水のオゾン処理を行った。オゾン処理工程では、低分子化された有機物や消毒副生成物が生じる可能性があるため、後段に生物膜処理を追加し、これら物質の除去低減効果も確認した。生物膜処理は、微生物保持担体（ポリプロピレン製円筒担体4mmOD×3 mmID×5 mmL）によるものとし、充填率90%（嵩）で充填したろ床にオゾン処理水を上向流で通水し、滞留時間約2時間で処理した（以降、オゾン+担体処理とする）。なお、実験装置は、魚類曝露試験水の採水の約1カ月前から上記条件で連続運転した。

魚類曝露試験水の採水は、2017年12月7～8日に二次処理水（砂ろ過水）、オゾン処理水、オゾン+担体処理水を24時間連続採水し、13日から22日にかけてゼブラフィッシュを用いて胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験<sup>2)</sup>に従い試験を行った。表-1にゼブラフィッシュの曝露条件を示す。二次処理水、オゾン処理水、オゾン+担体処理水の最大曝露濃度<sup>2)</sup>は80%に設定した。魚類曝露試験水の希釈には活性炭処理した脱塩素水道水を用い、コントロール曝露区は脱塩素水道水100%とした。

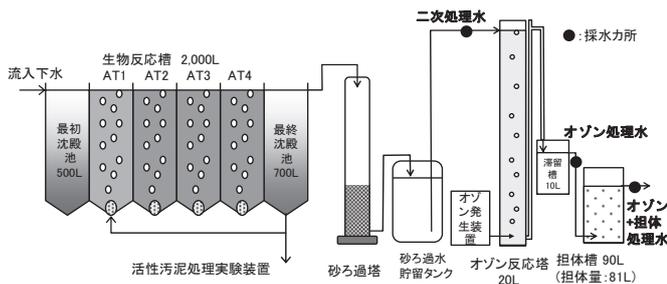


図-2 活性汚泥・オゾン処理実験装置の概要

表-1 ゼブラフィッシュの曝露条件と遺伝子発現解析方法

魚の曝露条件	試験魚種	ゼブラフィッシュ(NIES系統)
	曝露水	採水日: 2017年12月7~8日
		・二次処理水 (80, 40, 20, 10%の4試験区) ・オゾン処理水 (80%の1試験区) ・オゾン+担体処理水 (80%の1試験区) ・脱塩素水道水: コントロール ( )内の%値は脱塩素水道水で希釈したときの曝露水の存在割合
	曝露期間	9日間、胚～仔魚期
	曝露方式	半止水式(2, 4, 6, 8日目に換水)
	連数	4連/試験区
	供試卵数	15粒/連
温度	26°C	
明暗周期	明 16h / 暗 8h	
給餌	なし	
観察項目	生存数、孵化数	
遺伝子発現解析方法	遺伝子発現解析サンプル数	4連/試験区
	①RNA抽出方法	市販のRNA抽出キットに従う
	②ライブラリ調整方法	市販のライブラリ調整キットに従う
	③シーケンシング方法	デスクトップ型次世代シーケンサーによる
	④遺伝子発現量の算出方法	セルイノベーション(国立遺伝学研究所)のデータ解析拠点Maser <sup>6)</sup> を利用したゼブラフィッシュゲノムへのマッピングと遺伝子発現量の算出
	⑤遺伝子機能情報の付与方法	遺伝子機能情報の公共データベース <sup>7)</sup> より取得
	⑥発現変動遺伝子の抽出方法	発現量がコントロールに対して2倍以上1/2以下、かつ、T検定でp値が0.05以下を示した遺伝子
⑦発現変動遺伝子の機能解析	Fisherの正確確率検定	

### 3.2 遺伝子発現解析の方法

魚類曝露試験終了時に生存していた仔魚について遺伝子発現解析を行った。解析の詳細手順は既報<sup>5)</sup>に委ねるとしここでは概要を述べる。遺伝子発現解析の工程は以下の①～⑦のステップからなる。①仔魚からのRNA抽出、②次世代シーケンサーでmRNAの塩基配列を読み取るための前処理（ライブラリ調整）、③次世代シーケンサーによる塩基配列の読み取り（シーケンシング）、④シーケンシングにより読み取ったmRNAのゼブラフィッシュゲノムへのマッピングと遺伝子発現量の算出、⑤遺伝子機能情報の付与、⑥発現変動遺伝子の抽出、⑦発現変動遺伝子の機能解析、である。⑥の抽出条件は、発現量が各曝露区でコントロール区の2倍以上、1/2以下、およびT検定でp値<sup>\*</sup>が0.05以下となった遺伝子とした。⑦の解析はFisherの正確確率検定により行い、二次処理水最大濃度80%曝露区を基準として発現変動遺伝子と関連が強い機能を抽出（p値0.05以下）し、抽出した各機能について各曝露区のp値を比較した。

## 4. 実験結果と考察

### 4.1 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験の結果

図-3に各曝露区のお化率と生存率の平均値と

<sup>\*</sup>土木用語解説：p値

標準偏差を示した。コントロール区のみ化率と生存率の平均値は、コントロール区ではそれぞれ 95 %、92 % であり、80 % を超えており試験は成立<sup>2)</sup>していた。多重比較 (Dunnett) 法を用いて、コントロール区と各曝露区のみ化率の平均値の差を検定したところ、いずれの曝露区でも有意 (有意水準 5 %) な差は認められなかった。生存率についてもコントロール区と各曝露区で統計的に有意な差は認められなかった。

#### 4.2 遺伝子発現解析の結果

図-4 は、コントロール区と二次処理水 80 %、オゾン処理水曝露区の各遺伝子発現量の散布図である。図中のプロット一つひとつが検出された各遺伝子を反映している。コントロール区の 2 倍以上、1/2 以下、かつ、p 値 0.05 以下と判定された発現変動遺伝子のうち、発現量が上昇 (2 倍以上)

した遺伝子を赤、下降 (1/2 以下) した遺伝子を青プロットで示している。二次処理水 80 % 曝露区は発現変動遺伝子数が多いこと、オゾン処理水曝露区で少ないことがわかる。図-5 は各曝露区のみ化率と生存率の平均値の差を検定したところ、いずれの曝露区でも有意 (有意水準 5 %) な差は認められなかった。生存率についてもコントロール区と各曝露区で統計的に有意な差は認められなかった。

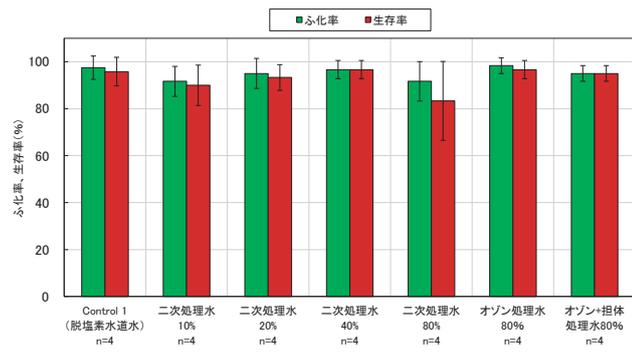


図-3 二次、オゾン処理水のふ化率、生存率の結果

図-6 に二次処理水 80 % 曝露区で抽出された発現変動遺伝子についてゼブラフィッシュの機能情報を用いた機能解析の結果を示す。二次処理水 80 % 曝露区で影響が高いと判定された機能は、生体防御応答 (defense response)<sup>\*</sup>、サイトカインシグナル系 (cytokine-mediated signaling pathway)<sup>\*</sup>で、生体応答や免疫に関する機能である。その他にも代謝、応答、シグナル伝達、調

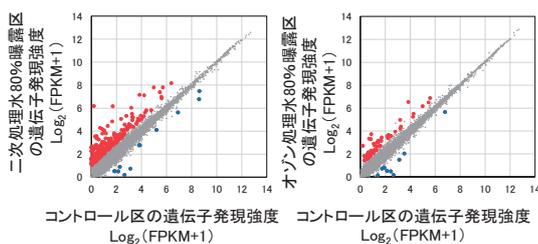


図-4 コントロール区と各曝露区の各遺伝子発現量の散布図

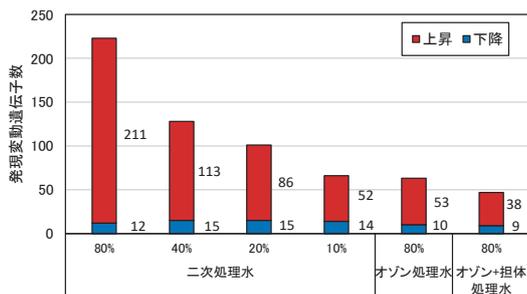


図-5 各曝露区のみ化率と生存率の結果

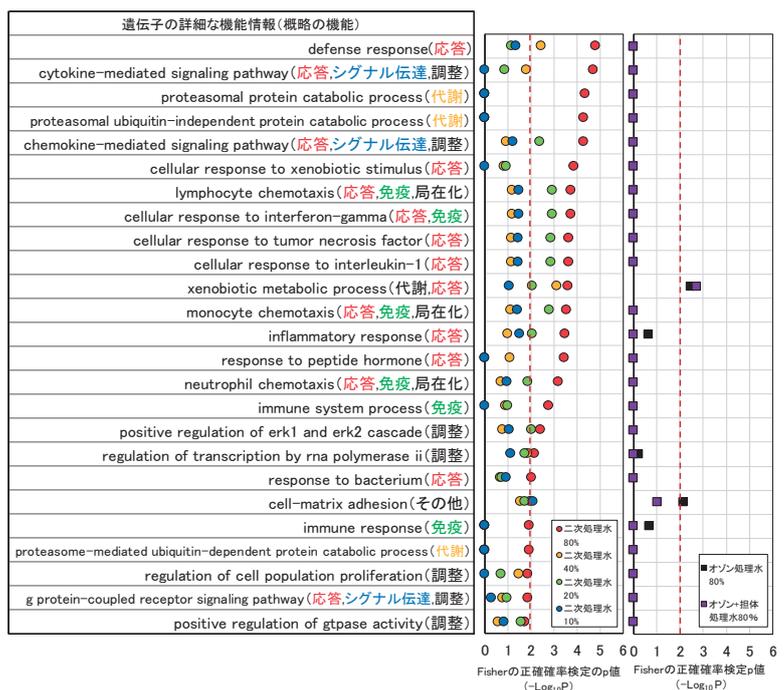


図-6 ゼブラフィッシュの遺伝子機能情報を用いた機能解析 (Fisherの正確確率検定) の結果

<sup>\*</sup>土木用語解説: 生体防御応答 (defense response)、サイトカインシグナル系 (cytokine-mediated signaling pathway)

整など様々な機能の影響を生じている可能性があった。これらの機能の p 値は、二次処理水 10 %曝露区で 0.01 以上 ( $-\log_{10}$  表示で 2 以下) となり、二次処理水が 10 倍希釈されることにより、遺伝子発現に与える影響は概ね抑制できることがわかった。オゾン処理とオゾン+担体処理の機能解析からは、両条件で顕著な機能影響の違いは認められず、オゾンの単独処理だけでも、二次処理水 80 % 曝露区で見られた各機能への影響は顕著に低下することがわかった。

ふ化率、生存率を指標にした生物応答試験では、二次処理水最大濃度 80 %でもふ化率と生存率に有意な影響は見られなかったが、遺伝子発現解析からは、ストレス応答、免疫、代謝、シグナル伝達など影響の可能性が示唆された。

二次処理水 80 %曝露区で見られた遺伝子発現への影響は、概ね 10 倍程度に希釈されることにより、有意水準以下 (p 値 0.01 以上) まで低減できることがわかった。オゾン処理水 80 %曝露区では、二次処理水 80 %曝露区で発現変動を示した遺伝子数、有意となった様々な機能への影響は顕著に低減していた。このことから、下水処理水の放流先の希釈状況や生態系に特に配慮する場合や、修景用水、河川維持用水として水生生物にも配慮しながら再利用する場合において、オゾン処理が有効な処理方法となりうると考えられた。

## 5. おわりに

本研究では、下水処理水の生物影響評価手法の効率化、高度化を目的として、胚・仔魚期の魚類による短期毒性試験に網羅的遺伝子発現解析を追加し、生体維持に関わる様々な機能への影響の検出可能性を確認し、希釈効果とオゾン処理による遺伝子発現影響の低減効果も把握した。

本研究で得られた知見を以下に示す。

- (1) 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験に遺伝子発現解析を追加することにより、1 回試験で急性毒性に加えて、遺伝子レベルでの慢性毒性が評価できる可能性が示唆され、本報文中で提案した試験法は、下水処理水の魚類影響評価の効率化・高度化に資するものと考えられた。
- (2) 二次処理水には、ふ化率と生存率への影響は見られなかったが、遺伝子発現解析からは、

遺伝子発現レベルでの影響が確認された。

- (3) 二次処理水曝露により発現変動を示した遺伝子群を機能解析した結果、ストレス応答、免疫、代謝、シグナル伝達など様々な影響を受けている可能性があった。
- (4) 二次処理水で見られた遺伝子発現影響は、10 倍希釈またはオゾン処理により低減できることがわかった。
- (5) 二次処理水で見られた遺伝子発現影響は、現時点で各遺伝子の発現レベルと将来生じる成長や繁殖阻害との関係は未解明であるため、悪影響と断定はできない。より安全側の水質管理の観点からは、発現変動遺伝子数や有意に検出される機能への影響について、必要に応じて低減を目指すことも考えられるが、今後、試験法の確立に向けて遺伝子発現と成長や繁殖の関係について、さらなる知見の蓄積が必要である。

## 参考文献

- 1) 有菌幸司：バイオアッセイと WET 法の展望、環境技術、47(2)、60~65 (2018)
- 2) 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
- 3) 生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会：生物応答試験を用いた排水の評価手法とその活用の手引き（中間とりまとめ）、平成 31 年 3 月
- 4) 岡本 他：生物応答手法を用いた下水処理水の評価の高度化に関する研究、土木研究所 平成 30 年度 研究開発プログラム報告、p.37、<https://www.pwri.go.jp/jpn/results/report/report-program/2018/pdf/pro-13-1.pdf>
- 5) 北村 他：ゼブラフィッシュの胚・仔魚期の生物応答と網羅的遺伝子発現解析による下水処理水の短期毒性評価、土木学会論文集 G(環境)、Vol.76、No.7、pp.III\_121~III\_130、2020
- 6) セレイノバージョン（国立遺伝学研究所データ解析拠点）<https://cell-innovation.nig.ac.jp/>
- 7) [http://www.ebi.ac.uk/GOA/zebrafish\\_release](http://www.ebi.ac.uk/GOA/zebrafish_release)

北村友一



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

山下洋正



土木研究所 流域水環境研究グループ水質チーム 上席研究員、博士（工学）  
Dr. YAMASHITA Hiromasa