

# 仔魚の遺伝子発現解析による下水処理水の慢性影響評価法の開発

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 29～令元

担当チーム：水質チーム

研究担当者：山下洋正、北村友一、服部啓太

## 【要旨】

本研究では遺伝子発現解析を魚の曝露試験に適用し、下水処理水の魚類慢性影響の検出と評価法の提案を行った。二次処理水を用いてゼブラフィッシュの胚・仔魚期の曝露試験を行い、ふ化率、生存率と網羅的遺伝子発現への影響、および、希釈またはオゾン処理による遺伝子発現影響の低減効果を調査した。二次処理水、オゾン処理水の曝露による遺伝子発現への影響レベルは、河川水の同様の曝露結果と比較した。その結果、二次処理水最大濃度（80%）においてもふ化率や生存率に影響は見られなかったが、遺伝子発現への影響は見られた。二次処理水の割合が減少するに従い、発現変動遺伝子数も少なくなることが確認された。二次処理水曝露により免疫、代謝、ストレス応答、シグナル伝達など様々な影響を受けていることが示唆された。二次処理水は 10 倍希釈、または、オゾン処理により、遺伝子発現への影響を河川水レベルまで低減できることがわかった。

キーワード：ゼブラフィッシュ、短期毒性試験、網羅的遺伝子発現解析、下水処理水

## 1. はじめに

排水の水生生物への影響評価には、毒性値が明らかにされている化学物質の機器分析による排水中の濃度測定と毒性値との比較、または、排水に水生生物を曝露し、死亡や成長阻害などの生物応答から評価する全排水毒性（WET：Whole Effluent Toxicity）試験がある。生物応答を用いた試験は、排水の有害性を直接評価でき、米国等では藻類、無脊椎動物、魚類を用いた WET 試験が導入されている。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、生物応答に基づく排水管理の制度化と導入が検討された。平成 31 年 3 月時点で、事業者の自主的取り組みとして活用されることとなった<sup>3</sup>。これまでに様々な事業所排水について生物応答試験が適用<sup>4,5</sup>されてきたが、下水処理場の放流水への適用<sup>6,7,8</sup>例は少ない。下水放流水の水量は、他の事業所に比べて大きく放流先水域の水質に影響する場合もある。公共用水域の水生生物保全のために、下水放流水の水生生物影響の評価が必要な場合も考えられる。下水処理水に生物応答試験を適用した報告では、藻類への影響<sup>9</sup>は塩素消毒水で、甲殻類への影響<sup>7</sup>は金属を含む排水で確認される場合もあるが、下水処理水の水生生物への影響は一般的に低い<sup>8</sup>。魚類に影響が見られる場合<sup>6</sup>があるものの、3 生物種の中で魚類への影響は特に低い<sup>8</sup>といえる。ただし、生物応答を用いた排水試験法の中で魚類影響については、胚・仔魚期の曝露からふ化率と仔魚の生存率を評価する試験である点に留意が必要である。下水処理水放流先の魚類存続の確保の観点からは、ふ化率、仔魚の生存率だけではなく、成長、繁殖、内分泌かく乱影響など様々な評価軸で下水処理水の魚類への安全性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。

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、遺伝子レベルで生物影響を詳細に解析することが可能となっている。また、OECD を中心に、化学物質の曝露から、分子、細胞、臓器、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；AOP<sup>9</sup>）を整理する取り組みが進められており、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と個体レベルの影響の関係解明が重要となっている。

毒性学や分子生物学の分野で蓄積されてきた遺伝子発現とその機能に関するデータベースを活用し、仔魚期の魚の様々な機能遺伝子を網羅的に解析することで、一回の生物応答試験から、遺伝子レベルではあるが様々な評価軸での影響評価が可能になると考えられる。

下水処理水を対象とし、胚・仔魚期の魚類を用いる曝露試験に網羅的遺伝子発現解析を追加し、魚が受けているストレスの種類判定と希釈や高度処理過程でのその低減効果および遺伝子発現の影響レベルを評価した報告は見られない。

本研究では、下水二次処理水を対象とし、生物応答を用いた排水試験法（検討案）<sup>2</sup>に掲載されている胚・仔魚期のゼブラフィッシュ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、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、また、検出された影響の希釈とオゾン処理による低減効果、および、河川水との比較による遺伝子発現レベルの評価について検討した。さらに、曝露水の水質と遺伝子発現の関係についての解

析も行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 曝露水と曝露試験の方法

図-1 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、写真-1 にオゾン処理装置の外観、処理条件を示す。本実験で使用した装置は、最初沈殿池（500L）、生物反応槽（500L × 4 槽）、最終沈殿池（700L）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、担体処理槽から構成される。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。オゾン処理の条件については、下水処理水の消毒を対象とする場合のオゾン注入量は5 mg/L、接触時間は10～20分が標準<sup>10)</sup>とされる。本実験ではオゾン発生装置の性能に制約があったためオゾン注入量を約3 mg/Lとし、接触時間は約20分で砂ろ過水のオゾン処理を行った。オゾン処理水は滞留槽（10L）を経て生物膜処理を行った。生物膜処理には、一部の医薬品の低減に効果があることが報告<sup>11)</sup>されている微生物保持担体（ポリプロピレン製円筒担体4mmOD×3mmID×5mmL）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

表-1 曝露条件

試験魚種	ゼブラフィッシュ
曝露水 (下水処理水)	採水日：2017年12月7～8日 ・二次処理水（80, 40, 20, 10%） ・オゾン処理水（80%） ・オゾン+担体処理水（80%） ・脱塩素水道水：Control 1 ( )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
	採水日：2019年1月21日 ・山口川（桜川支流）（80%） ・桜川下流（80%） ・恋瀬川（80%） ・山王川（80%） ・脱塩素水道水：Control 2 ( )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
RNA抽出方法	Qiagen RNeasy Mini Kit
ライブラリ調整方法	Illumina Truseq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit
使用シーケンサーと試薬	Miseq, Reagent kit v3 150cycle

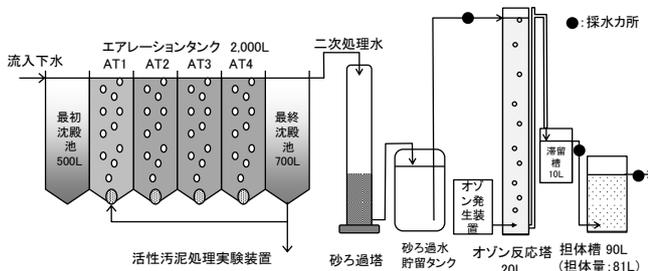


図-1 活性汚泥・オゾン処理実験装置の概要

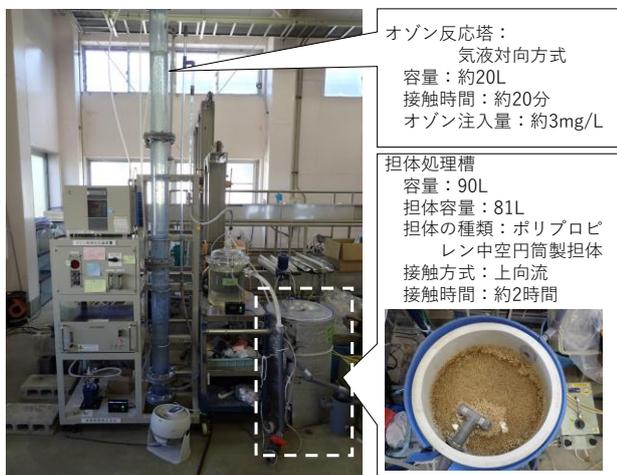


写真-1 オゾン処理実験外観と処理条件

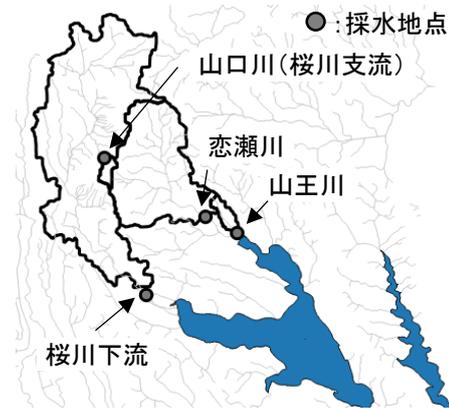


図-2 霞ヶ浦流入河川の採水地点

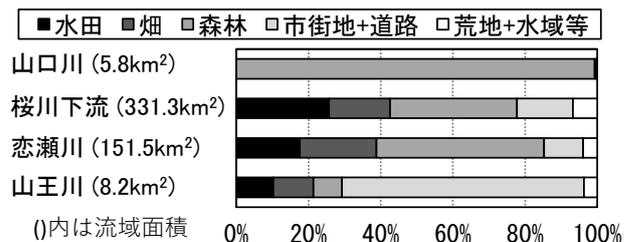


図-3 霞ヶ浦流入河川の土地利用の割合

国土数値情報 H28 年度土地利用から ArcGIS で算出

水し、水理的滞留時間約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、曝露水採水の約1カ月前から上記条件で連続運転した。

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に従い試験を行った。表-1に曝露条件を示す。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。曝露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。

下水処理水曝露による遺伝子発現レベルの評価は、河川水との比較によることとした。比較対象とする河川水は、霞ヶ浦流入河川水とし、土地利用の異なる以下の4地点を選定した。図-2に採水地点、図-3に土地利用の概要を示す。採水地点より上流域の土地利用の特徴は次のとおりである。山口川(桜川支流)は筑波山の溪流で、その流域は森林が99%を占める。桜川下流は霞ヶ浦流入河川の中で最大流域面積をもち、他の流域よりも水田の割合(26%)が高い。恋瀬川は桜川下流に次ぎ流域面積が大きく森林の割合(46%)が高い。山王川は市街地の割合(67%)が大きい。なお、桜川、恋瀬川、山王川は、生物類型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育する水域)に指定<sup>4)</sup>されており、魚類影響は少ない河川であると考えられる。採水は、2019年1月21日にスポット採水した。曝露濃度は最大曝露濃度80%のみとし、試験は1月23日から2月1日にかけて実施した。

各下水試料、各河川試料原水は、下水処理工程での処理の程度、河川水の汚濁度を把握するため、溶存有機炭素濃度DOC(島津製作所製TOC-V)、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N(ビーエルテック製QuAAtro2-HR)とオゾン処理の処理効果や水質のキャラクタリゼーションが簡便に把握できる三次元蛍光スペクトル(日立ハイテクノロジー製F-4500)を測定した。

## 2.2 遺伝子発現解析の方法

曝露試験終了時に生存していた仔魚は、液体窒素で急速凍結し、RNA抽出まで-80℃で保存した。冷凍保存した仔魚のRNAは、RNeasy Mini Kit(Qiagen製)を用いて、1連最大15匹をまとめて1検体として抽出した。RNA試料はBioanalyzer(Agilent製)を用いて、分解を受けていないことを確認し、Truseq Stranded mRNA prep kit(Illumina製)を用いてライブラリ調製後、次世代シーケンサーMiseq(Reagent kit v3, 150cycle, Illumina製)により、1ラン2検体でシーケンシングを実施した。81塩基のペアエンドで1検体につき約1,600万リードの塩基配列を取得した。

遺伝子発現解析は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>13)</sup>にリードデータをアップロードして実施した。Tophat2を用いてゼブラフィッシュゲノム(DanRer11)にマッピング後、Cufflinks2を用いて遺伝子発現量をFPKM(Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped)で表した。得られた遺伝子配列は、NCBIに登録されているゼブラフィッシュ蛋白質配列(Refseq Protein)<sup>14)</sup>に対してBlastxによる同源性検索を行い、E-valueとBit scoreから最も同源性が高いRefseq IDを得た。そして、UniProt<sup>15)</sup>およびUniProt-GOA<sup>16)</sup>のデータベースを用いて各遺伝子のRefseq IDに対応したゼブラフィッシュの遺伝子機能情報(Gene Ontology: GO)を取得した。

発現変動遺伝子の抽出およびGene Ontology解析は、subio ver.1.24(subio社製)により行った。発現変動遺伝子の抽出条件は、各曝露区でコントロール区の2倍以上、1/2以下(Fold change 2)、およびT検定でp値が0.05以下となる遺伝子とした。なお、下水試料と河川水曝露試験の時期が異なったため、コントロール区は下水試料のControl 1と河川試料のControl 2の2種類あるが、発現変動遺伝子の抽出の際は2種類のコントロールを統合し1つとし解析した。Gene Ontology解析では、Biological processの機能情報を用いることとし、Fisherの正確確率検定により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(検定条件: overlap 3以上、p値0.05以下)し、各曝露区間をp値で比較した。

## 3. 実験結果

### 3.1 曝露原水の水質分析結果

図4、5、6に脱塩素水道水(Control 1、2)、各下水試料、各河川水試料のDOC、形態別窒素、蛍光強度の分析結果を示す。DOC濃度は二次処理水が最も高く、オゾン処理水とその後段の担体処理水で若干の低下が見られた。この値は都市河川である山王川よりも高い値であった。二次処理水中のNH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N濃度は低く硝化が十分な進行した処理水であった。NH<sub>4</sub>-Nの値はいずれの河川水よりも高い値であった。図7に全ての曝露試料原水の三次元蛍光スペクトルの結果を示した。図6は二次処理水の三次元蛍光スペクトルで高い値を示した励起波長(Ex)240nm/蛍光波長(Em)430nm、Ex:340nm/Em430nmのピーク強度である。二次処理水で見られたこれらのピークは、オゾン処理で約1/3~1/4まで低下し、桜川下流や山王川と同程度となった。

### 3.2 胚仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験露の結果

図8、9に各曝露区のふ化率と生存率の平均値と標準偏差を示した。ふ化率と生存率の平均値は、Control 1区ではそれぞれ95%、92%、Control 2区では100%、

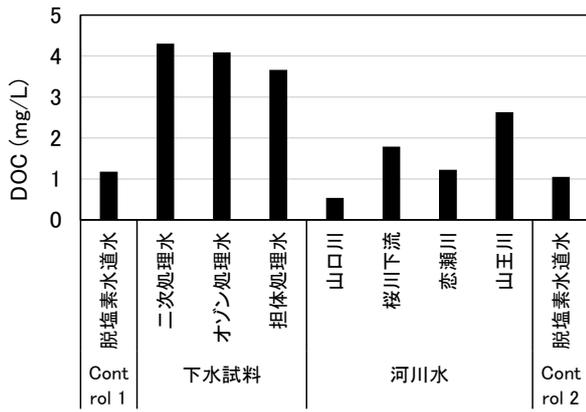


図-4 曝露水原水の DOC 濃度

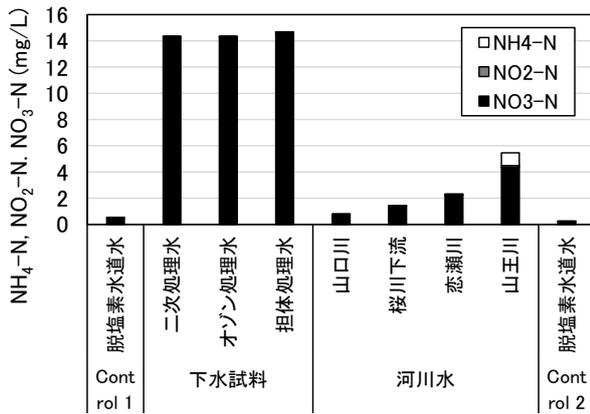


図-5 曝露水原水の NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N 濃度

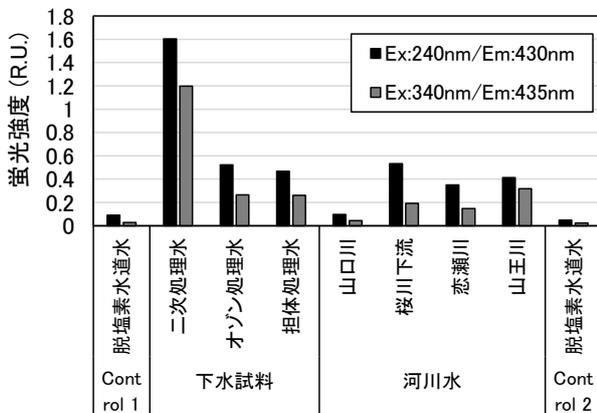


図-6 曝露水原水の蛍光強度

100%であり、いずれの曝露区も80%を超え試験は成立していた。Dunnnettの多重比較法を用いて、コントロール区と各曝露区とのふ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にならなかった(有意水準1%)。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。

### 3.3 遺伝子発現解析結果

#### 3.3.1 ゲノムマッピングによる遺伝子の検出と発現変動解析結果

Tophat 2-Cufflinks 2によるゼブラフィッシュゲノムへのマッピングの結果、25,567遺伝子が検出された。25,567

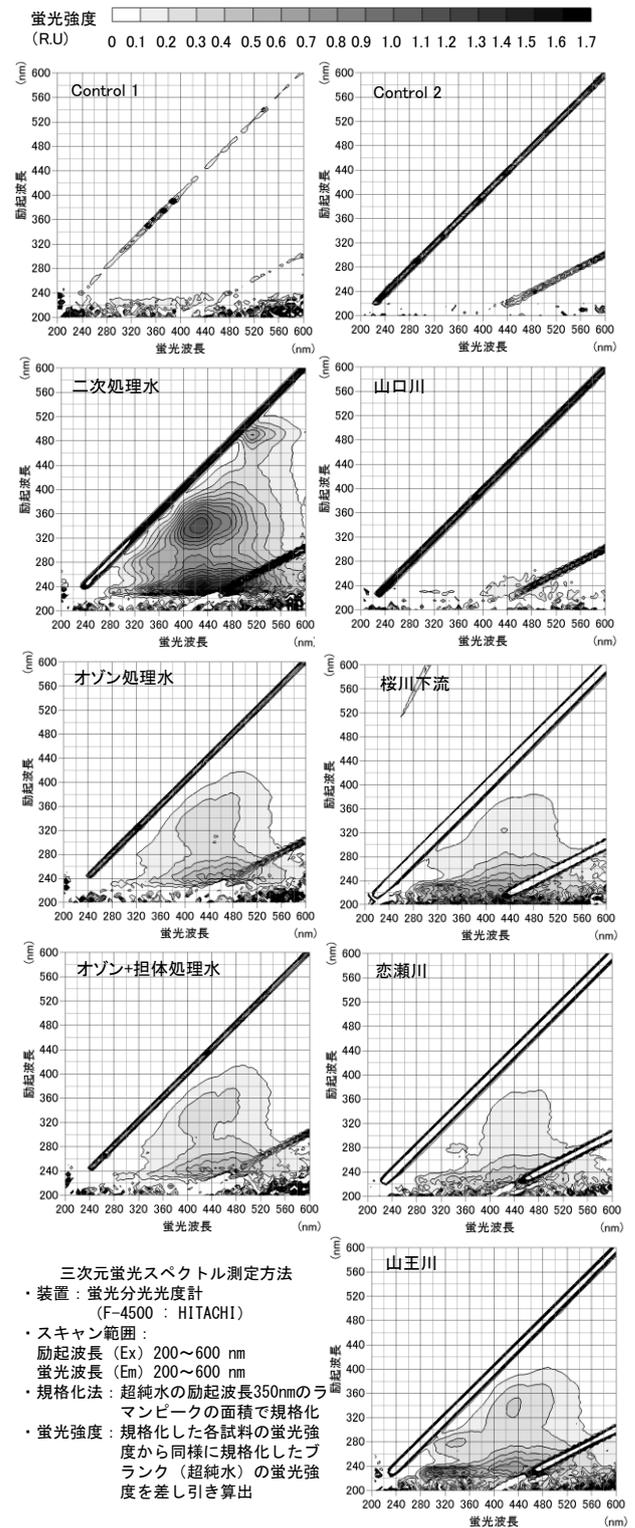


図-7 曝露水原水の三次元蛍光スペクトル

遺伝子のうち75%にあたる19,317遺伝子にBiological processの機能情報(GO: Gene ontology)を与えることができた。図-10はコントロール区と各曝露区との各遺伝子発現量の散布図である。図中のプロットが検出された各遺伝子を反映しており、Fold change 2、かつ、p値0.05以下と判定された発現変動遺伝子を黒色で示した。二次処理水

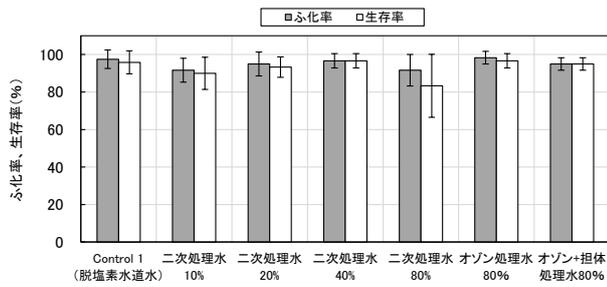


図-8 下水試料のふ化率, 生存率の結果

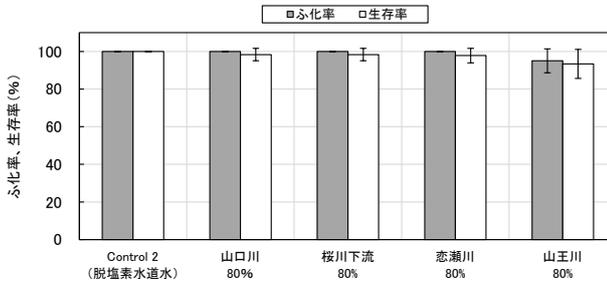


図-9 河川試料のふ化率, 生存率の結果

80%曝露区は発現変動遺伝子数が多いこと、山口川で少ないことがわかる。

図-11 は各曝露区の発現変動遺伝子数で、各下水試料、河川水試料への曝露により遺伝子発現量が上昇したものと下降したものを分けて図示した。下水処理水曝露区で上昇する遺伝子が多くなっていた。コントロール区に対して上昇と下降を示した発現変動遺伝子の総数は、二次処理水80%、40%、20%、10%曝露区でそれぞれ223、128、101、66個となり、下水処理水の割合が減少するに従い、発現変動遺伝子も少なくなった。オゾン処理水80%、オゾン+担体処理水80%曝露区の発現変動遺伝子数は63、47個となり、オゾン処理により発現変動遺伝子数を抑制できることがわかった。発現変動遺伝子数でみると、オゾン処理は二次処理水の10倍希釈に相当する結果となった。本実験ではオゾン処理の後段に担体処理を設けていた。本処理により若干ではあるが発現変動遺伝子数のさらなる低下が見られた。

河川水試料では溪流である山口川で29個と最も少なく、都市河川である山王川で65個と最も多くなった。二次処理水10%、オゾン処理水曝露区の発現変動遺伝子数は、桜川下流、山王川に、オゾン+担体処理水曝露区は、恋瀬川に曝露した時と近い数になっていた。

### 3.3.2 ゼブラフィッシュのGOを用いた機能解析結果

図-12 に発現変動遺伝子の機能解析をゼブラフィッシュのBiological process情報を用いて実施した結果を示す。図はBiological Process関連のGOを、二次処理水80%曝露区でp値0.05 (-log<sub>10</sub>表示で1.3)以下まで示したものである。二次処理水80%曝露区で影響が高いと判定された機能は、defense response、cytokine-mediated signaling pathwayで、これらは免疫に関係する機能である。その他にも代謝、ストレス応答、シグナル伝達など様々な機

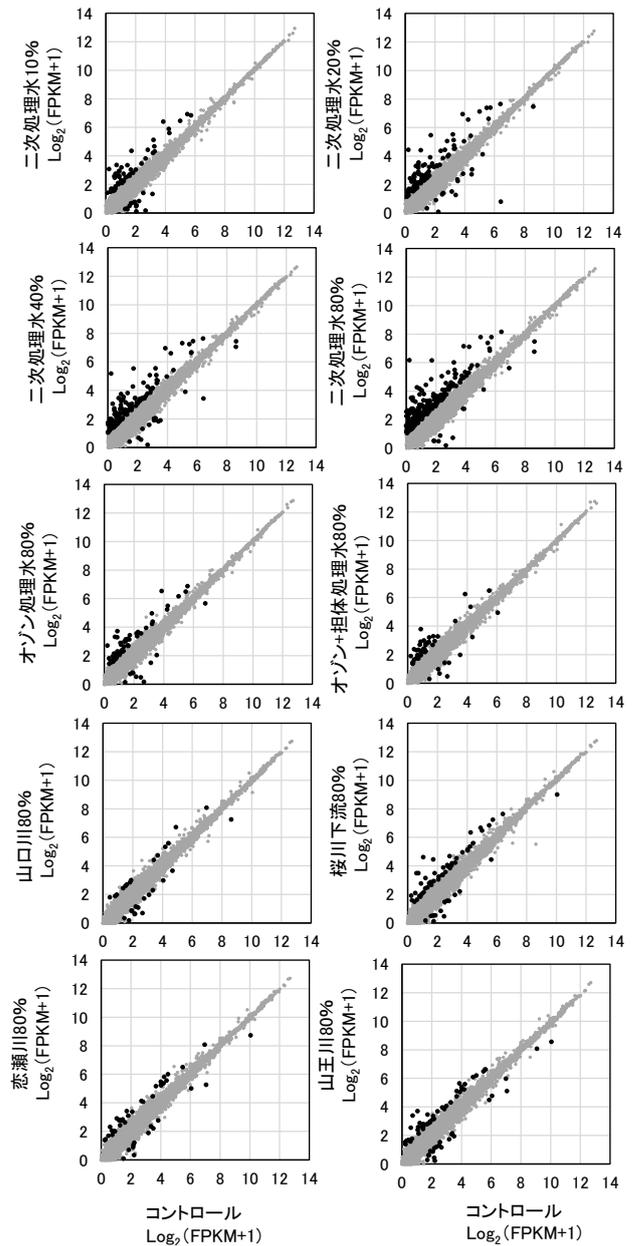


図-10 コントロール区と各曝露区の各遺伝子発現量の散布図

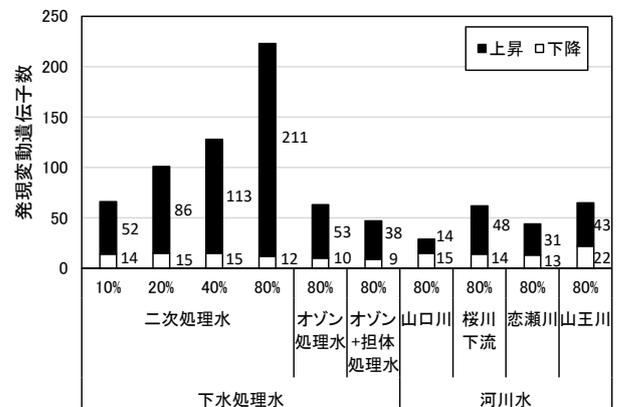


図-11 各曝露区が発現変動遺伝子数

能への影響を生じている可能性があった。これらの機能のp値は希釈倍率が高くなるに従い大きくなる傾向が見

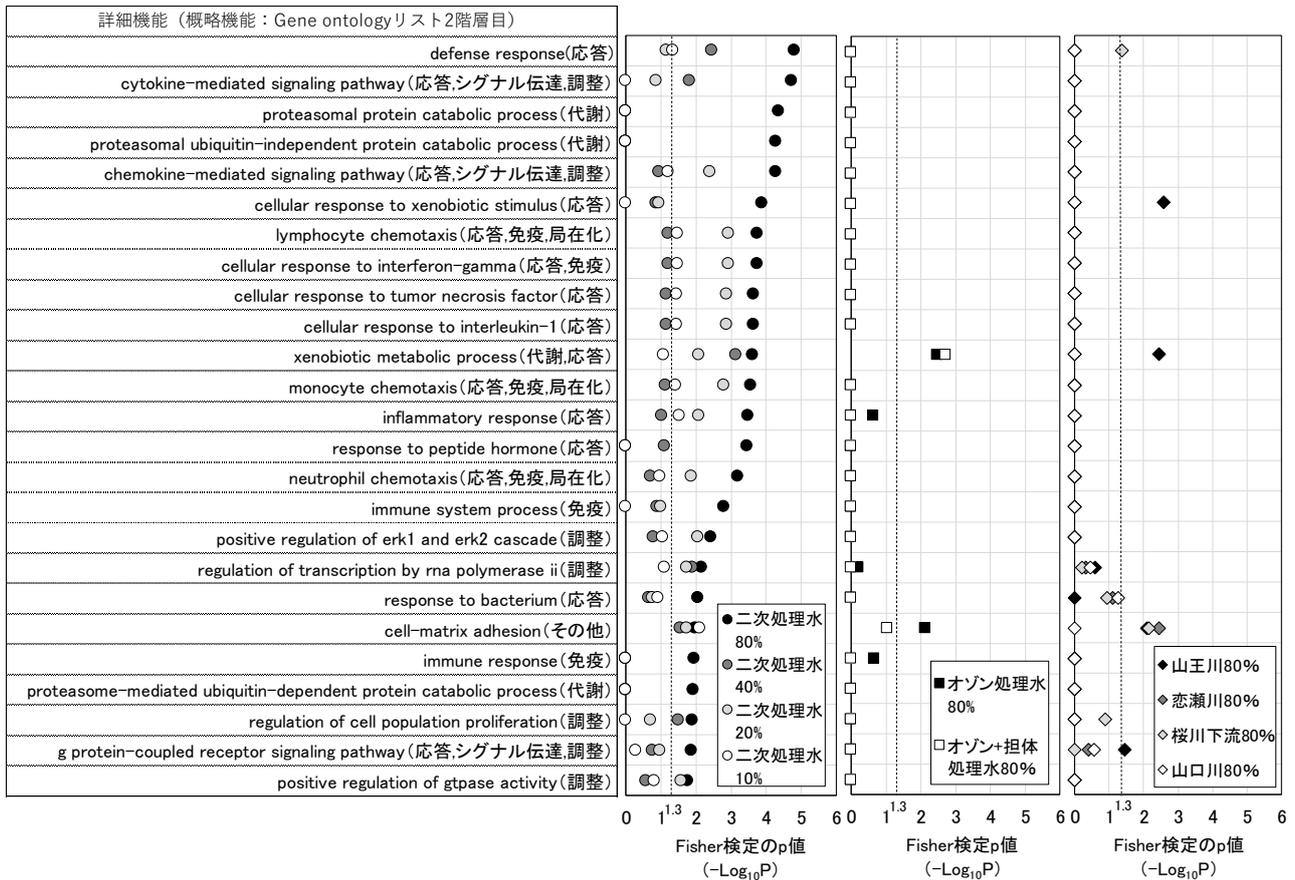


図-12 ゼブラフィッシュの機能情報(Biological Process)を用いた機能解析(Fisherの正確確率検定)の結果

られ、二次処理水 10%曝露区で p 値が 0.01 以下になるのものは 1 機能(cell-matrix adhesion)のみとなった。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。

オゾン処理では二次処理水 80% 曝露区で見られた各機能への影響が顕著に低下していることがわかる。河川水では山王川で数個の機能で p 値が低いものがみられるものの、魚類の遺伝子発現に与える影響は低いことがわかる。

#### 4. 考察

##### 4.1 生物応答と遺伝子発現の関係について

ふ化率、生存率の生物応答を指標にした二次処理水の希釈系列の曝露試験では、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、遺伝子発現への影響は見られた。二次処理水で見られた遺伝子発現への影響は、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、悪影響であるとは断定はできない。しかし、機能解析の結果、免疫、代謝、ストレス応答、シグナル伝達などへの影響を受けている可能性が示唆され、二次処理水 80%の曝露条件で成魚に至るまで長期間曝露された場合、成長阻害や生存率に影響が生じる可能性も否定できない。より安全側の観点からは、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、河川水レベルまでの低減を目指すことも考えられ、今後、さらなる知見の蓄積を踏まえた検討が求められる。

本研究からは二次処理水曝露により免疫への影響が生じる可能性が高いことが示唆されたが、ヒト細胞に下水処理水を曝露し、遺伝子発現量の変化をマイクロアレイで測定し、Biological Processで機能解析した報告<sup>17)</sup>においても、本研究で影響が見られた defense response (防御反応)、inflammatory response (炎症応答)への影響が見られている。こうした免疫機能に影響を与える原因物質は明らかではないが、response to bacterium(細菌による応答)、芳香族炭化水素により誘導される xenobiotic metabolic process (生体外物質の代謝)や、医薬品などにより誘導される g protein-coupled receptor signaling pathway (Gタンパク質共役受容体シグナル)への影響が見られることから、処理水中の細菌と化学物質の両方の影響を受けていたと考えられる。

生物応答試験に網羅的遺伝子発現解析を適用することにより、生物応答試験だけでは捉えられないことができなかった、魚類の免疫、代謝、ストレス応答、シグナル伝達などの様々な遺伝子レベルでの影響とその原因物質の推測に利用できると考えられた。今後、魚類遺伝子の機能情報の充実や AOP の解明が進むことが予想され、遺伝子発現解析は魚類個体の詳細影響や影響予測のツ-

ルとして発展していくものと考えられる。

#### 4. 2 下水処理水の希釈とオゾン処理による遺伝発現レベルでの影響低減効果について

二次処理水 80%曝露区で見られた遺伝子発現レベルの影響は、希釈されることにより低減できることがわかった。概ね 10 倍程度希釈されることにより、発現変動遺伝子数は河川水 downstream 程度まで、機能解析で有意と判定された様々な機能影響は、有意水準以下 (p 値 0.05 以上) まで低減できることがわかった。環境基準値と排水基準値の関係など、下水処理水の影響は 10 倍希釈で議論されることが多く、遺伝子発現解析の結果はこれを支持する形となった。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。本研究からは、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等において、オゾン処理が有効な処理方法となりうると考えられた。一方で、下水処理水をオゾン処理したことにより、雄魚の肝臓で CYP1a1 (薬物代謝酵素)、VTG (卵黄前区駆蛋白質) のマーカー遺伝子が誘導されることがあるとも報告<sup>18)</sup> されていることから、オゾン処理の魚類への安全性を確定するためには、オゾン処理条件 (後処理も含め) と魚の遺伝子発現および成長、繁殖への影響についての知見の充実が必要である。

#### 4. 3 河川水との比較による下水処理水の遺伝子発現レベルの評価について

遺伝子発現レベルと魚類の成長、繁殖影響の関係は明確になっておらず、この解明には長期間を要すと考えられる。当分は魚類の安全性を保障できる各遺伝子の発現量を示すことはできない。現時点では、魚類調査が行われ、魚類の存続が確認されている河川水を比較対象とすることが最適と考えられる。本研究で比較対象とした霞ヶ浦流入河川下流は、生物類型 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育する水域) に指定されている水域であり、ゼブラフィッシュのふ化率や生存率を指標にした生物応答試験でも影響は見られなかった。他に、比較対象とする河川の選定方法には、河川水辺の国勢調査地点の活用も考えられる。また、下水放流口より上流の河川水を比較対象とするのも一案と考えられる。下水処理水の魚類影響レベルをどの程度にするのかについては、魚類の生息状況も含め放流先で求められる水環境像によって異なり、比較対象として相応しい地点の選定が必要となる。

#### 4. 4 遺伝子発現と水質の関係について

本研究では、曝露水原水の水質の簡易水質分析を行っていた。図-13 は各下水試料、各河川試料原水の蛍光強度と各下水、各河川試料 80%曝露区の発現変動遺伝子

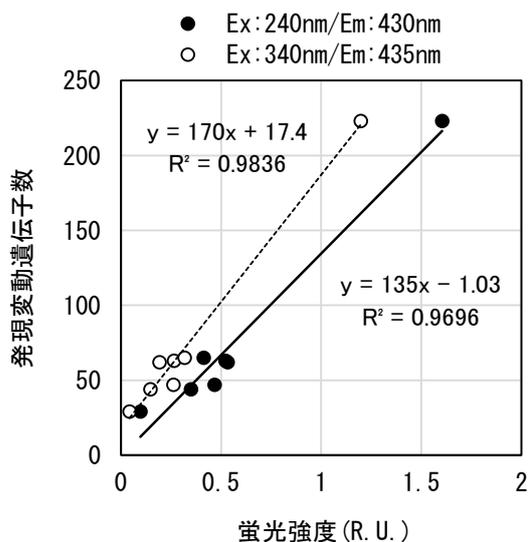


図-13 曝露水の蛍光強度と発現変動遺伝子数の関係

数の関係を示したものである。図より各曝露水の蛍光強度と発現変動遺伝子数が正の相関関係を示していることがわかる。二次処理水原水で見られた蛍光ピークはブロードであることから、曝露水には様々な化学物質が含まれていると考えられる。三次元蛍光分析から魚類に影響を与える化学物質を特定することはできないが、水質のキャラクターゼーションは可能である。こうしたキャラクターゼーション可能な機器分析による水質分析と生物応答試験による有害性評価に相関を見いだせる可能性がある。そのためには、生物応答試験とキャラクターゼーション可能な機器分析 (三次元蛍光分析、LC-GC-TOF/MS など) を併用したデータ集積と統計解析が必要である。機器分析でのスクリーニングが可能となれば、水生生物への有害性が疑わしい試料のみを、生物応答試験に供することができ、生物応答試験の労力や費用を低減できると考えられる。

#### 5. おわりに

本研究では、下水処理水を試験水とし、胚・仔魚期のゼブラフィッシュを用いる短期毒性試験に網羅的遺伝子発現解析を追加し、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検出が可能かどうかを検討するとともに、希釈とオゾン処理による遺伝子発現影響の低減効果を探った。さらに、河川水との比較から下水処理水の遺伝子発現レベルの評価を行った。本研究で得られた知見を以下に示す。

- (1) ふ化や生存への影響が低い下水処理水においても、網羅的遺伝子発現解析を追加することにより、魚の生体維持に関わる様々な機能への影響の可能性が検出できることがわかった。生物応答試験への網羅的遺伝子発現解析の適用は、下水処理水のより安全側

での魚類影響評価に利用できると考えられた。

- (2) 二次処理水の希釈系列の生物応答試験では、最大濃度 80%でもふ化率と生存率に影響は見られなかったが、網羅的遺伝子発現解析では発現変動遺伝子数の増加が確認され、遺伝子発現への影響が見られた。
- (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、免疫、代謝、ストレス応答、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 80%曝露区で見られた遺伝子発現影響は、希釈されることにより低減できることがわかった。10 倍希釈されることにより、発現変動遺伝子数を概ね河川水 downstream 程度まで低減でき、機能への影響も低減できることがわかった。
- (5) オゾン処理は発現変動遺伝子数の抑制に顕著な効果があった。
- (6) 下水処理水が魚類に与える遺伝子発現レベルの影響は、河川水を比較対象とすることで相対的評価が可能と考えられた。
- (7) 曝露水原水の三次元蛍光分析の蛍光強度と発現変動遺伝子数に類似した傾向が見られた。

**謝辞：**次世代シーケンサーの解析には国立遺伝学研究所データ解析拠点、Maser データ解析システムを利用させていただいた。ここに記して謝意を表す。

#### 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）,2014
- 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）,2019
- 4) 板津靖之,高野智弘,金俊, 福富真実子, 楠井隆史：事業所排水の生態毒性学的評価：毒性原因物質の特徴化と放流先河川への影響,25(1),19-26,2015
- 5) 渡部春奈,林岳彦,田村生弥,中村中,阿部良子,高信ひとみ,荻野仁子,小塩正朗,鎌迫典久：生物応答を用いた排水試験法案の検証と事業場排水の実態調査,環境化学,25(1),43-53,2015
- 6) 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）,69(7),III\_375-384,2013

- 7) 真野 浩行,武田 文彦,南山 瑞彦：溶存態金属の濃度が高い下水処理水を対象としたミジンコ 2 種への影響の調査と毒性同定評価試験の適用,土木学会論文集 G（環境）72(7),III\_107-115,2016
- 8) 岡本誠一郎,南山瑞彦,小川文章,北村友一,真野浩行,武田文彦,村田里美,服部啓太,藤村幸裕：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書,表-21, p.38, <https://www.pwri.go.jp/jpn/results/report/report-program/2018/pdf/pro-13-1.pdf>
- 9) Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, Hoff DJ, Homung MW, Johnson RD, Mount DR, Nichols JW, Russom CL, Schmieder PK, Serrano JA, Tietge JE, Villeneuve DL.: Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment, *Environ Toxicol Chem.*29(3), 730-741, 2010
- 10) 日本下水道協会：オゾン消毒,下水道維持管理指針実務編-2014 年版, pp.681-682, 2014
- 11) 小森行也, 岡本誠一郎: 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), 15-17, 2014
- 12) 茨城県：平成 30 年度版環境白書（データ）表 2-43 水生生物の保全に係る水質環境基準の類型指定状況, <https://www.pref.ibaraki.jp/seikatsukankyo/kansei/kankyo/08hakusho/hakusyo-h30data.html>（最終確認日 2020 年 5 月 19 日）
- 13) セルイノベーション（国立遺伝学研究所データ解析拠点）<https://cell-innovation.nig.ac.jp/>（最終利用日：2020/3/5）
- 14) Refseq-Protein データベース, National Center for Bio-technology Information (NCBI), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>（データベース利用日：2019/11/1）
- 15) The UniProt Consortium: UniProt: a worldwide hub of protein knowledge, *Nucleic Acids Res.* 47: D506-515 (2019), <http://www.uniprot.org/>（データベース利用日：2019/11/1）
- 16) Huntley RP, Sawford T, Mutowo-Muullen P, Shypitsyna A, Bonilla C, Martin MJ, O’ Donovan C: The GOA database: Gene Ontology annotation updates for 2015. , *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan; 43:D1057-63, [http://www.ebi.ac.uk/GOA/zebrafish\\_release](http://www.ebi.ac.uk/GOA/zebrafish_release)（データベース利用日：2019/11/1）
- 17) Hiroe Hara-Yamamura, Toshikazu Fukushima, Lea Chua Tan, Satoshi Okabe\*: Transcriptomic analysis of HepG2 cells exposed to fractionated wastewater effluents suggest-ed humic substances as potential inducer of whole effluent toxicity, *Chemosphere* 240, 124894, 2020
- 18) Pohl J, Björlerius B, Brodin T, Carlsson G, Fick J, Larsson DGJ, Norrgren L, Öm S: Effects of ozonated sewage effluent on reproduction and behavioral endpoints in zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology*, 200, 93-101, 2018