

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

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 22～平 24

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：池田 茂、鈴木 穰、北村友一、朴 昶範

【要旨】

下水処理水の水生生物への毒性影響を迅速検出するため、マイクロアレイによる遺伝子発現解析手法の適用を試みた。メダカの遺伝子発現プロファイルの変化から下水処理水に含まれる毒性を評価するためには、作用機序の異なる様々な化学物質の曝露実験から、比較対照として化学物質毎の遺伝子発現プロファイルを得る必要がある。本研究では、公共の遺伝子発現データベースを基に、メダカマイクロアレイを設計し、各遺伝子に機能などのアノテーション情報を追加した。次に、7種類のモデル化学物質をメダカに曝露し、化学物質濃度と臓器（肝臓、エラ、精巣、脳）毎の遺伝子発現プロファイルの取得を行った。さらに、下水試料に曝露したメダカのマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの取得を行い、マーカー候補遺伝子の抽出や統計解析手法を用いて下水処理水の毒性評価を行った。その結果、下水処理過程で毒性が低減していることがわかった。

キーワード：メダカ、マイクロアレイ、遺伝子発現解析、毒性評価、下水処理水

1. はじめに

下水処理水の安全性を個別の化学物質によって管理することは困難であるとの考え方から、バイオアッセイによる排水の総毒性評価と管理が注目されている。排水の毒性評価では、ヒトや生態系への悪影響を未然に防ぐため、迅速かつ高感度の試験法が求められる。現在の水生生物の毒性試験では、魚類、ミジンコ、藻類の生死や生長阻害などを指標として評価されるが、検出感度が低いこと、さらに、検出感度向上のためには、試料の濃縮が必要であることが問題となっている。

一方で、近年のバイオテクノロジーの発展により、生体反応の微小変化を検出できる遺伝子発現解析などの分析技術の開発が進んでおり、水環境分野においてもこれらの技術の応用が期待されている。

本研究は、下水処理水の水生生物への影響評価手法へ遺伝子発現解析技術を適用するための基礎研究と位置付け、処理水の毒性把握のための方法論と評価法の提案を目指した。本研究で使用した水生生物は、遺伝子情報が豊富で、小型で飼育の容易な魚類のモデル生物であるメダカとした。

本研究では、はじめに、遺伝子発現解析に必要なメダカマイクロアレイの設計と作成を行った。次に、下水処理水の生物影響を遺伝子レベルで高感度検出するため、化学物質や下水試料を用いて曝露時間の

最適化実験、さらに、メダカの遺伝子発現の変化から下水処理水に含まれている毒性を評価するため、作用機序の異なる様々な化学物質によるメダカの曝露実験を行い、化学物質毎の遺伝子発現プロファイルの取得を行なった。次に、処理レベルの異なる下水処理水のメダカの曝露実験を行い、各下水処理水曝露時の遺伝子発現プロファイルと化学物質毎の遺伝子発現プロファイルの比較から、下水処理過程での毒性低減の評価を行った。

2. マイクロアレイ搭載遺伝子の設計

2.1 使用マイクロアレイの選定

マイクロアレイは、任意の遺伝子が搭載可能（搭載遺伝子の見直しも可能）で、1 検体当たりの費用が比較的安価となる Agilent 社のプラットフォームを利用することとした。Agilent 社製のマイクロアレイに搭載可能な遺伝子数は、43,803（44K）、103,747（105K）である。44K は、1 枚のスライドガラスで 4 検体(図-1a)、105K は、2 検体(図-1b)の測定が可能である。

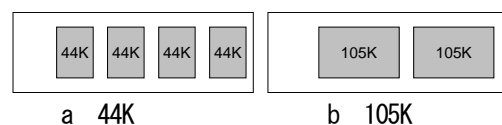


図-1 採用したマイクロアレイの形式

マイクロアレイに搭載するメダカの遺伝子情報は、公共のデータベース DFCI Medaka Gene Index (http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=o_latipes)に登録されている Release8.0 (2009年6月2日更新)とし、このデータベースからマイクロアレイに搭載する遺伝子を抽出した。

2.2 マイクロアレイ搭載遺伝子の抽出条件

DFCI Medaka Gene Index Release8.0に登録されている遺伝子は、68,425あり、その中から、44Kマイクロアレイと105Kマイクロアレイに搭載する遺伝子を以下に示す優先順位に従い選択した。

2.2.1 44K マイクロアレイ搭載遺伝子の抽出

44K マイクロアレイを使用する場合、データベースに登録されている68,425の遺伝子から、43,803個を選抜する必要がある。44K用メダカマイクロアレイの選抜条件は以下のとおりとした。

- 1) TC(Tentative consensus)から始まる ID があるもの。(複数の塩基配列情報が繋ぎ合わされ、統一されたもの)
- 2) TCから始まる ID 以外の ID であるもの。
 - 2)-1 アノテーション情報があるもの。
 - 2)-2 塩基にNを含まないもの。
 - 2)-3 塩基配列が700ベースを超えるもの
- 3) これまで著者らの研究¹⁾²⁾から、搭載した方が

よいと判断された ID のうち、1)、2)と重ならないもの

2.2.2 105K マイクロアレイ搭載遺伝子の抽出

105K マイクロアレイは、遺伝子を選抜せずに DFCI Medaka Gene Index Release8.0に登録されている遺伝子のほぼ全てが搭載可能であり、さらに、搭載遺伝子に余裕がある。そこで、105Kフォーマットは、「1)TC(Tentative consensus)から始まる ID があるもの。」の条件に該当する遺伝子のプローブを2回(duplicate)で搭載した。

2.3 マイクロアレイに搭載するプローブの設計

マイクロアレイに搭載するプローブの設計は、Agilent社のeArray(<https://earray.chem.agilent.com/earray/>)を使用した。eArrayは、ユーザーがアップロードした塩基配列から独自のアルゴリズムによりAgilentフォーマットに適したプローブを設計する事が可能である。プローブ設計の際のパラメータは以下のとおりとした。

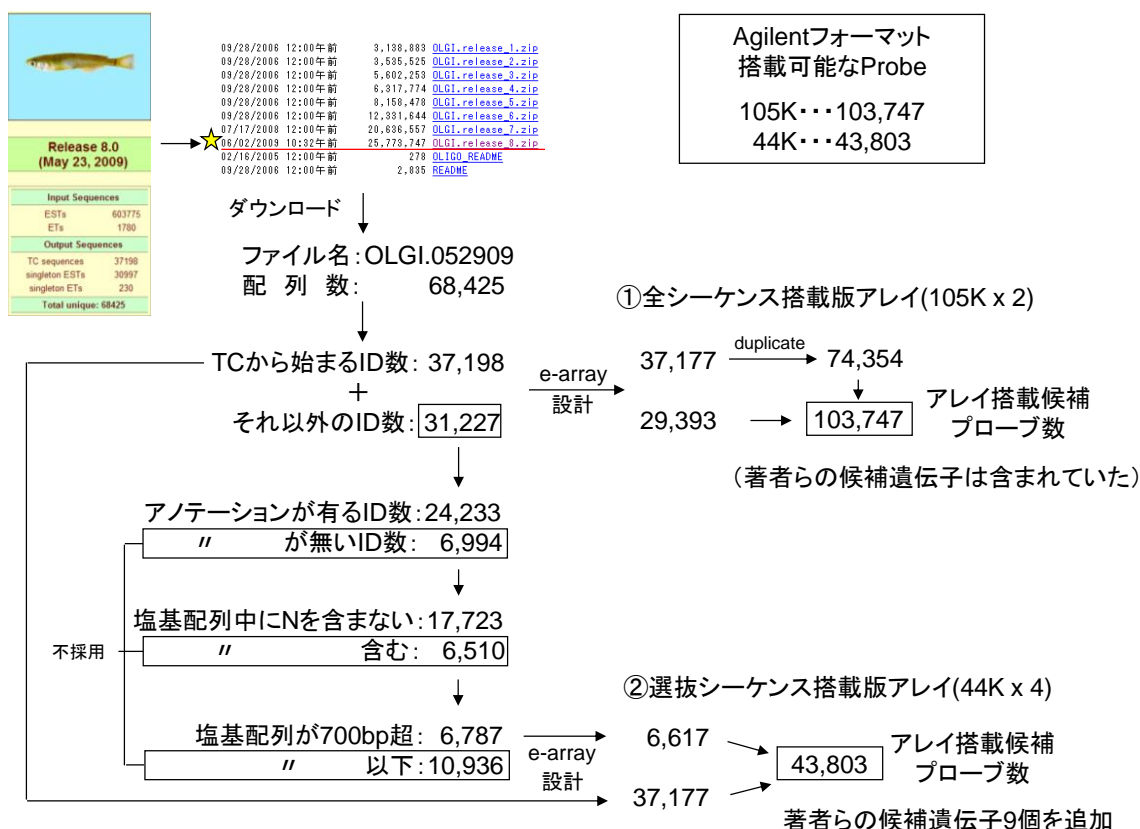
Probe Length: 60bp

Probes per Target: 1

Probe Orientation: Sense

Design Options: Best Probe Methodology, Design with 3' Bias

Target File Details: Upload in FASTA Format



Transcriptome Details: Select Agilent-Provided Transcriptome (by Species)

2.4. マイクロアレイの設計結果

44K と 105K マイクロアレイに搭載する遺伝子の抽出結果を図-2 と表-1 に示した。表-1 は、研究目的と研究費に応じてマイクロアレイを選択できるように、データベース登録遺伝子数に対する搭載遺伝子数とカバー率さらに1検体あたりのコストも記載した。44K アレイ搭載遺伝子は、データベース登録遺伝子の 64%程度であるが、比較的安価で試験が可能である。

表-1 メダカマイクロアレイの設計結果

抽出条件	44K アレイ	105K アレイ
TC から始まる ID	37,177 個	37,177×2 個
TC から始まる ID 以外の ID	6,617 個	29,393 個
搭載遺伝子数/全遺伝子数	(43,803/68,425 =0.64)	(66,587/68,425 =0.97)
カバー率	64%	97%
1 検体当たり価格	27,300 円	54,600 円

2.5 アノテーションの追加方法

DFCI Gene Index Releas8.0 に登録されている遺伝子の機能情報は少ないため、化学物質や下水処理水曝露で発現変動した遺伝子の役割について解析が必要な場合、各遺伝子の機能情報 (アノテーション) が必要となる。機能情報を追加することにより、どのような役割の遺伝子が変動するかを知ることができ、生物影響をより詳細に解析できる。そこで、マイクロアレイに搭載した各遺伝子と相同性の高いヒトとゼブラフィッシュの機能情報 (EntrezID (NCBI のデータベースで染色体の位置、構造、機能などの情報が登録されている ID) と GO : geneontology (遺伝子機能の用語と体系情報) を追加することとした。機能情報の追加作業工程は以下のとおりである。

マイクロアレイに搭載した各遺伝子についてプローブ設計の基になった mRNA 配列情報 (DFCI Gene Index Releas8.0) を用いて Blastx (Blastx: 核酸の相同性検索のひとつで、塩基配列をアミノ酸配列に変換した後、アミノ酸配列データベースに対して検索を行う方法) 検索し、ヒトおよびゼブラフィッシュの RefSeq ID (NCBI (米国バイオテクノロジー

センター) が提供しているデータベースの ID) の遺伝子を取得した。その後、得られた RefSeq ID を用いて NCBI Entrez Gene ID (NCBI の Entrez というデータベース (染色体の位置、構造、機能など) の ID) を検索し、各リストに Entrez ID を追加した。さらに、RefSeq ID を用いてヒトの GO 情報は、Uniprot-GOA (<http://www.ebi.ac.uk/GOA/>)、ゼブラフィッシュは、ZFIN (<http://zfin.org>) データベースから取得した。

2.6 アノテーション情報の追加結果

44K アレイに搭載されている 43,803 プローブのうち 96.4% にヒトの Entrez Gene ID、98.0% にゼブラフィッシュ Entrez Gene ID を取得することができた。ヒトとゼブラフィッシュで Entrez Gene ID まで取得できた割合を比較すると、ゼブラフィッシュの方がその割合が高かった。残りのプローブについては、相同性の高いヒト、ゼブラフィッシュのアミノ酸配列が存在しなかった。

各 Blastx 検索結果からメダカ塩基配列との相同性の高さを表す E-value (相同性が高いほど低い値を示す) について、ヒトおよびゼブラフィッシュそれぞれの分布を調査した。その結果、ヒトでは、E-value が 1.0E-5 以下だったものは、43,803 プローブのうち 65.6%、ゼブラフィッシュでは、69.4% であり、ゼブラフィッシュと相同性の高いプローブが多かった。

得られたヒトとゼブラフィッシュの Refseq ID を基に GO 情報を生物学的プロセス (B : biological process)、分子機能 (M : molecular function)、細胞構成要素 (C : Cellular component) に分けて取得した。43,803 プローブのうち GO 情報が取得できた割合は、ヒト GO では 75.4% (B)、79.0% (M)、83.5% (C)、ゼブラフィッシュ GO では、49.7% (B)、53.7% (M)、54.6% (C) となった。

本アノテーション追加作業で追加した項目は以下のとおりである。

human RefSeqID,	zebra RefSeq ID
human EntrezGeneID,	zebra EntrezGeneID
human biological process,	zebra biological process
human molecular function,	zebra molecular function
human Cellular component,	zebra Cellular component
human GeneSymbol,	zebra GeneSymbol
human E-value,	zebra E-value

今後、追加したアノテーション情報の検証や修正は必要となるが、追加した遺伝子の機能情報を利用することにより、発現変動遺伝子の機能解析が可能

となる。

3. メダカの曝露時間と解析臓器の決定

メダカの遺伝子発現から下水試料の毒性を評価する場合、メダカの遺伝子発現の変化を確実にとらえる必要がある。遺伝子発現の変化は、曝露水質の変化に対して速やかに反応すると考えられるものの、曝露時間と遺伝子発現の関係は明らかでない。さらに、解析に相応しい臓器を明らかにする必要がある。そこで、メダカを3、24、96時間、化学物質（エストロン（女性ホルモン）、トリクロサン（殺菌剤）、NDMA（発がん性物質））、流入下水、2次処理水、に曝露し、各曝露時間での、肝臓、エラ、精巣、脳の遺伝子発現解析を行った。

3.1 実験方法

曝露条件は表-2のとおりである。各化学物質の曝露濃度は、下水試料で検出されるレベルの3段階とした。概ね、高濃度区が流入下水、中濃度区が2次処理水、低濃度が高度処理水レベルとなっている^{3) 4) 5)}。曝露時間は、急性毒性試験で使用される96時間以内とし、3、24、96時間の3条件から最適曝露時間を検討した。なお、対照区には脱塩素水道水を使用した。マイクロアレイは、より網羅的に検出できる105Kを使用することが望ましいが、予算の制約上44Kを使用することとした。

表-2 メダカの曝露条件の一覧

曝露方式	: 半止水式
化学物質と曝露濃度	
エストロン(estrone)	2、20、200 (ng/L)
N-ニトロソジメチルアミン(NDMA)	10、100、1000 (ng/L)
トリクロサン(triclosan)	50、500、5000 (ng/L)
下水試料	: 流入下水、2次処理水
水 温	: 24±1 °C
曝露期間	: 3、24 および 96 時間
供試生物	: d-rR 系メダカ雄魚 (3~9 カ月齢)
供試生物数	: 6~8 個体/曝露区
照 明	: 明期 16 時間/暗期 8 時間
給 餌	: なし
エアレーション	: 緩やかに曝気
遺伝子発現解析臓器	: 肝臓、エラ、精巣、脳
使用マイクロアレイ	: 44K

3.2 曝露実験の操作

エストロン(2、20、200 ng/Lの3濃度区)、NDMA(10、100、1,000 ng/Lの3濃度区)、トリクロサン(50、500、5,000 ng/Lの3濃度区)を添加した脱

塩素水道水で、3~9カ月齢のd-rR系メダカの雄魚を曝露し、曝露開始時から3、24、96時間後に、各試験区6個体を1匹ずつ、RNAlater中で肝臓、エラ、精巣、脳を摘出した。摘出した臓器は1個体毎にRNAlaterに浸漬し、RNA抽出まで-20°Cで保存した。

各臓器は、1個体毎にRNA抽出(RNeasy mini kit)を行い、それぞれ6個体のRNA抽出液の一部を混合し、アジレントのプロトコールに従い、RNAの増幅、Cy3標識、マイクロアレイスキャン、各プローブの数値化を行った。

3.3 遺伝子発現解析の方法

遺伝子発現解析は、subio および Microsoft EXCEL を使用した。はじめに、曝露時間および臓器毎にアレイ間ノーマライズ(75%値で規格化)を行い、バックグラウンド以下と判定されたものを排除した。

ノーマライズされた各プローブのシグナル値を用いて、各臓器毎に時間依存性のある遺伝子を以下の条件で抽出した。

3、24、96時間の経過時間とともに遺伝子発現が増加または減少しているもの

3、24、96時間の遺伝子発現強度が対照区の3倍以上または1/3以下となったもの

さらに、遺伝子発現強度が時間依存性を有している遺伝子群の中から vitellogenin、choriogenin などのバイオマーカー遺伝子の発現挙動も調べた。

3.4 解析結果

図-3、4、5、6は、肝臓、エラ、精巣、脳の遺伝子発現強度が、曝露時間とともに増加(up regulation)、または、減少(down regulation)した時間依存性を有する遺伝子を抽出し、各曝露条件で対照区の3倍以上、1/3以下となった遺伝子数を示したものである。各臓器において時間依存性を有する遺伝子群は、曝露時間96時間で、遺伝子発現強度が対照区の3倍以上、1/3以下となる遺伝子が多くなることがわかった。特に、肝臓は他の臓器と比べ、3倍以上、1/3以下となる遺伝子数が多いことがわかった。これらの遺伝子数は、化学物質によって異なることがわかった。

図-7、8、9は、肝臓での女性ホルモン様物質のバイオマーカー遺伝子として知られている vitellogenin、choriogenin 遺伝子の曝露時間と遺伝子発現強度を示したものである。96時間曝露区で遺伝子発現強度が最も高くなることがわかる。女性ホ

ルモン様物質をより高感度で検出しようとする場合は、96時間曝露が適していることがわかった。

図-10,11 は、エラでの多環芳香族炭化水素のバイオマーカーとして知られる P4501A1 遺伝子と L-SF(choriogenin L) 遺伝子の曝露時間と遺伝子発現強度の関係である。

P4501A1 遺伝子は、下水試料曝露区のみで高発現を示し、曝露時間3時間で最も高く、曝露時間が長くなるに従い低下する傾向を示した。96時間曝露後も遺伝子発現強度は十分に検出できるレベルであった。L-SF 遺伝子は、エラにおいても発現しており、96時間曝露区で遺伝子発現強度は最大となった。

雌の卵巣で高発現を示す ZPC1 と ZPC5 遺伝子は、Estrone20ng/L、96時間曝露で最も高くなった。濃度依存性の傾向はみられなかったものの、影響が出る場合は96時間曝露により検出できる可能性がある。精巣でも L-SF 遺伝子は誘導され、流入下水曝露区では、96時間曝露後に高発現となることがわかった。

脳では、各化学物質曝露区で時間・濃度依存性のある遺伝子はみられなかったが、NDMA 100ng/L、96時間曝露、トリクロサン 500ng/L、3時間曝露時に高発現となっていた。流入下水曝露区では、蛋白質分解酵素遺伝子である Elastase 遺伝子、Carboxypeptidase 遺伝子が時間依存性を有し、96時間後の高発現を示した。

以上の結果から、下水処理水の魚類影響として懸

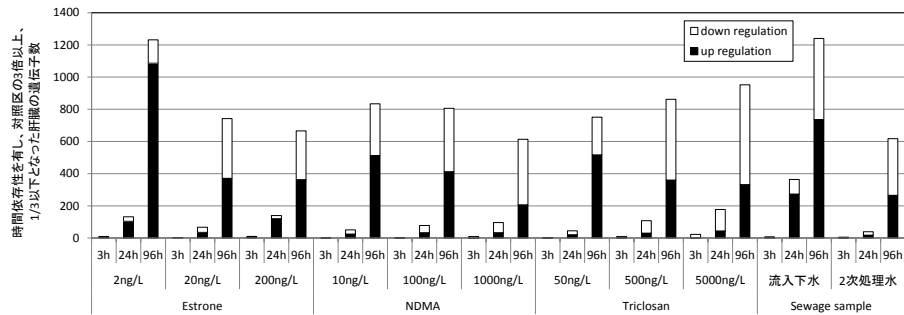


図-3 肝臓で時間依存性を有し、対照区の3倍以上、1/3以下となった遺伝子数

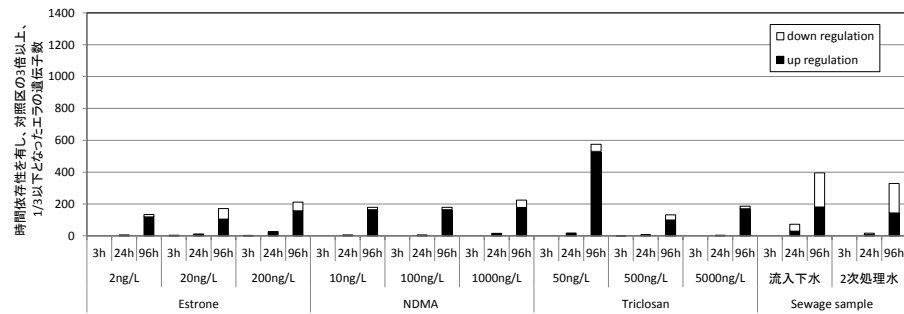


図-4 エラで時間依存性を有し、対照区の3倍以上、1/3以下となった遺伝子数

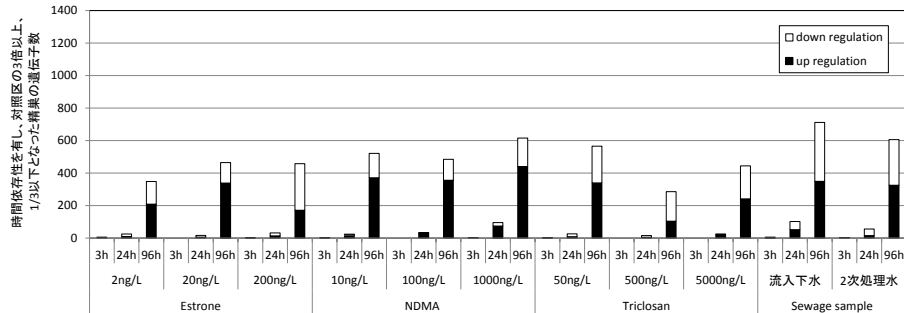


図-5 精巣で時間依存性を有し、対照区の3倍以上、1/3以下となった遺伝子数

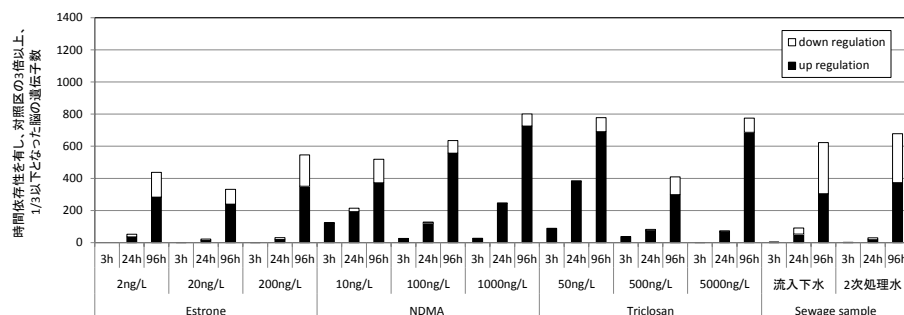


図-6 脳で時間依存性を有し、対照区の3倍以上、1/3以下となった遺伝子数

念されるのは、女性ホルモン様物質であり、女性ホルモン様物質の影響を高感度に検出するには96時間が適していること。また、96時間曝露により高発現となる遺伝子が多かったこと。96時間曝露は、急性毒性試験としても利用できることから、以降の実験では、曝露時間は96時間とした。

4. 化学物質および下水試料に曝露したメダカの網羅的遺伝子発現プロファイルの取得

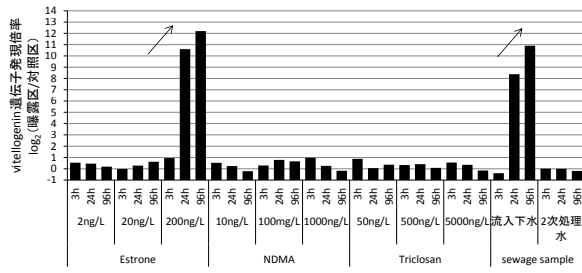


図-7 肝臓での各曝露物質とvitellogenin遺伝子の発現強度の関係

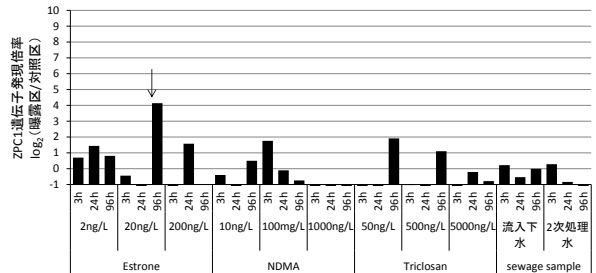


図-12 精巣での各曝露物質とZPC1遺伝子の発現強度の関係

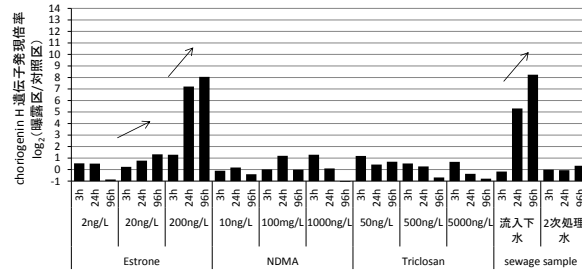


図-8 肝臓での各曝露物質とchoriogenin H遺伝子の発現強度の関係

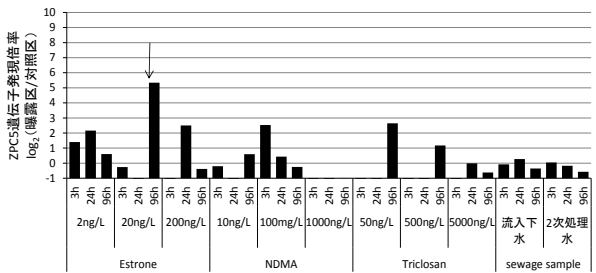


図-13 精巣での各曝露物質とZPC5遺伝子の発現強度の関係

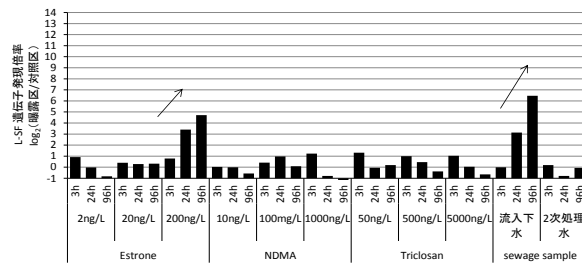


図-9 肝臓での各曝露物質とL-SF遺伝子の発現強度の関係

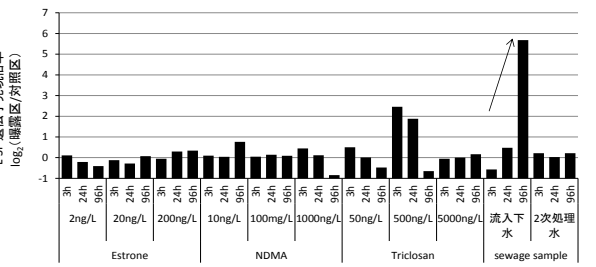


図-14 精巣での各曝露物質とL-SF遺伝子の発現強度の関係

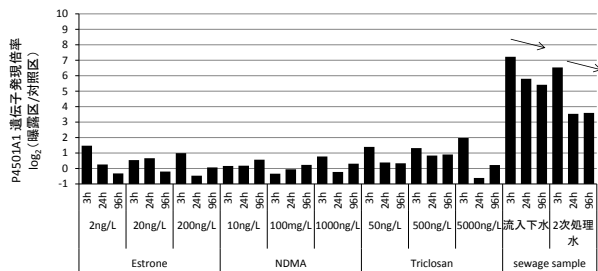


図-10 エラでの各曝露物質とP450A1遺伝子の発現強度の関係

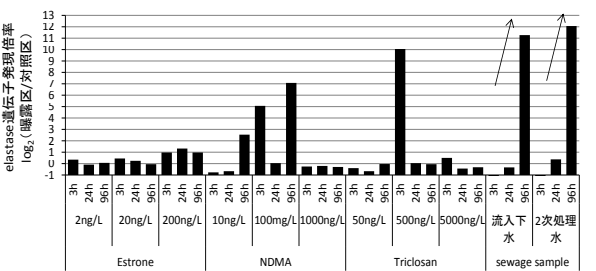


図-15 脳での各曝露物質とelastase遺伝子の発現強度の関係

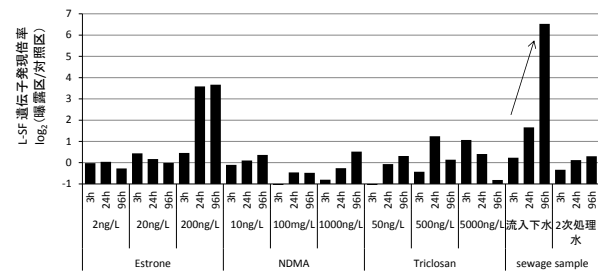


図-11 エラでの各曝露物質とL-SF遺伝子の発現強度の関係

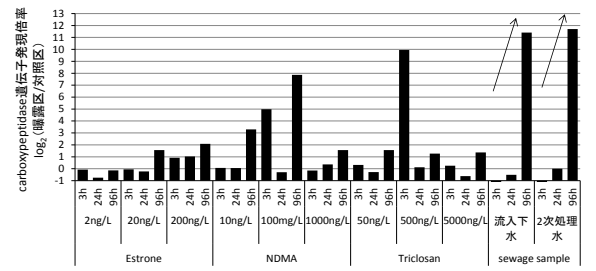


図-16 脳での各曝露物質とcarboxypeptidase遺伝子の発現強度の関係

マイクロアレイによるメダカの遺伝子発現プロファイルの変化から、下水処理水の毒性を予測するためには、作用機序の異なる様々な化学物質のメダカの曝露試験を行い、メダカの遺伝子発現のプロファイルを得る必要がある。そこで、近年、下水処理水に含まれ、水生生物への影響が懸念されている化学物質などから次の7種類を曝露物質として選定した。

曝露物質は、エストロン（女性ホルモン）、N-ニトロソジメチルアミン：NDMA（発がん性物質）、トリクロサン（殺菌剤）、フルタミド（抗男性ホルモン）、クラリスロマイシン（抗生物質）、シクロホスファミド（抗がん剤）、ジヒドロテストステロン：DHT（男性ホルモン）である。毒性を評価する下水試料は、実際の下水試料とし、流入下水、2次処理水、塩素

処理水、担体処理水とした。

4.1 曝露実験の方法

メダカの曝露条件は表-3のとおりである。各化学物質の曝露濃度は、排水試料で検出されるレベルの3段階とした。概ね、高濃度区が流入下水、中濃度区が2次処理水、低濃度が高度処理水レベルとなっている³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾。曝露時間は、96時間とし、対照区は脱塩素水道水とした。使用したマイクロアレイは、44Kとした。下水試料の曝露実験は、化学物質曝露と同条件で行った。

表-3 メダカの曝露条件の一覧

曝露方式	： 半止水式		
曝露物質と濃度			
エストロン*	2, 20, 200	(ng/L)	
NDMA*	10, 100, 1000	(ng/L)	
トリクロサン*	50, 500, 5000	(ng/L)	
フルタミド**	10, 100, 1000	(μ g/L)	
クラリスロマイシン**	50, 500, 5000	(ng/L)	
シクロホスファミド**	5, 50, 500	(ng/L)	
ジヒドロテストステロン***	40, 400, 4000	(ng/L)	
201009	流入下水, 2次処理水****		
201012	流入下水, 2次, 塩素処理水*****		
201111	流入下水, 2次, 塩素, 担体処理水*****		
水温	： 24 \pm 1 $^{\circ}$ C		
曝露期間	： 96時間		
供試生物	： d-rR系メダカ雄魚(3~9カ月齢)		
供試生物数	： 6~8個体/曝露区		
照明	： 明期16時間/暗期8時間		
給餌	： なし		
エアレーション	： DOが低い場合は緩やかに曝気		
遺伝子発現解析臓器	： 肝臓、エラ、精巣、脳		
使用マイクロアレイ	： 44K		

注1 フルタミド濃度は抗男性ホルモン活性値としての検出値
 注2 ジヒドロテストステロンは男性ホルモン活性としての検出値
 注3 全ての曝露実験は、同時にできなかったため、本研究期間中6回、毎回コントロールを含めて行った。(*Run1, **Run2, ***Run3, ****Run4, *****Run5, *****Run6)

4.2 曝露実験の操作

3.2 と同様

4.3 遺伝子発現解析の方法

遺伝子発現解析は、subio および Microsoft EXCEL を使用した。はじめに、曝露濃度および臓器毎にアレイ間ノーマライズ(75%値で規格化)を行い、バックグラウンド以下のシグナルを排除した。次に、各化学物質および流入下水のバイオマーカー探索と全遺伝子セットと各種遺伝子の機能を特定し

た遺伝子セットを用いた統計解析手法により、化学物質や下水処理水の毒性評価を行った。

(1) バイオマーカー探索と下水試料の毒性評価

各化学物質および流入下水のバイオマーカー候補遺伝子の探索は、以下の抽出条件で行った。

各化学物質のマーカー候補遺伝子の抽出条件

1. 遺伝子発現強度が濃度依存性を有しているもの。
2. 曝露濃度中濃度区で、遺伝子発現が対照区の3倍以上、1/3以下となるもの。
3. 他の化学物質の遺伝子発現強度は、遺伝子発現強度に変化がないもの(3倍以内、1/3以上)

流入下水のマーカー候補遺伝子の抽出条件

3回の流入下水の曝露試験で、全てで対照区の3倍以上となるもの

(2) 統計解析による毒性評価

バックグラウンド以上の遺伝子セットを用いて、Kishi¹⁰⁾らの各遺伝子発現をユークリッド距離とピアソン相関係数による解析を試みた。解析法の概要を図-17に示す。ユークリッド距離が全体的な遺伝子発現強度の分布、ピアソン相関が各遺伝子発現強度の違いを反映する。このユークリッド距離とピアソン相関の関係から、生理活性度(Degree of physiological activity)を評価するものである。上記解析は、全遺伝子セットと geneontology 情報の biological process 第一階層の遺伝子セットで行った。

$$d(\text{Euclidean distances}) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

ここで、 i は n 個におよぶ遺伝子の添え字、 x_i は i 番目の遺伝子の発現強度、 \bar{x} は n 個の遺伝子発現強度の平均値(本ケースの n は38,996遺伝子)

$$\text{PearsonCC} = \cos \theta = \frac{\sum_{i=0}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=0}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=0}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

ここで、 θ は2サンプル間ベクトル角度、 \bar{x} , \bar{y} はそれぞれ2サンプルの遺伝子発現強度の平均値(本ケースの n は38,996遺伝子)

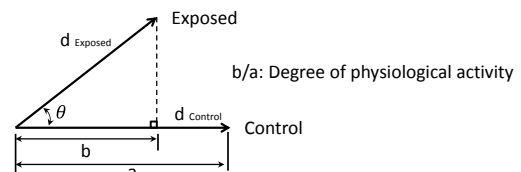


図-17 ユークリッド距離とピアソン相関係数、生理活性度(Degree of physiological activity)の算出法¹⁰⁾

4.4 実験結果

4.4.1 各化学物質と下水試料のマーカー遺伝子の探索と下水試料の評価

■ Estrone 2ng/L ■ Estrone 20ng/L ■ Estrone 200ng/L ■ NDMA 10ng/L ■ NDMA 100ng/L ■ NDMA 1000ng/L ■ Triclosan 50ng/L ■ Triclosan 500ng/L ■ Triclosan 5000ng/L ■ Flutamide 10µg/L ■ Flutamide 100µg/L ■ Flutamide 1000µg/L ■ Cyclophosphamide 5ng/L ■ Cyclophosphamide 50ng/L ■ Cyclophosphamide 500ng/L ■ Clarithromycin 50ng/L ■ Clarithromycin 500ng/L ■ Clarithromycin 5000ng/L ■ DHT 40ng/L ■ DHT 400ng/L ■ DHT 4000ng/L
■ 201111 流入下水 ■ 201111 2次処理水 ■ 201111 塩素処理水 ■ 201111 担体処理水 ■ 201009 流入下水 ■ 201009 2次処理水 ■ 201012 流入下水 ■ 201012 2次処理水 ■ 201012 塩素処理水

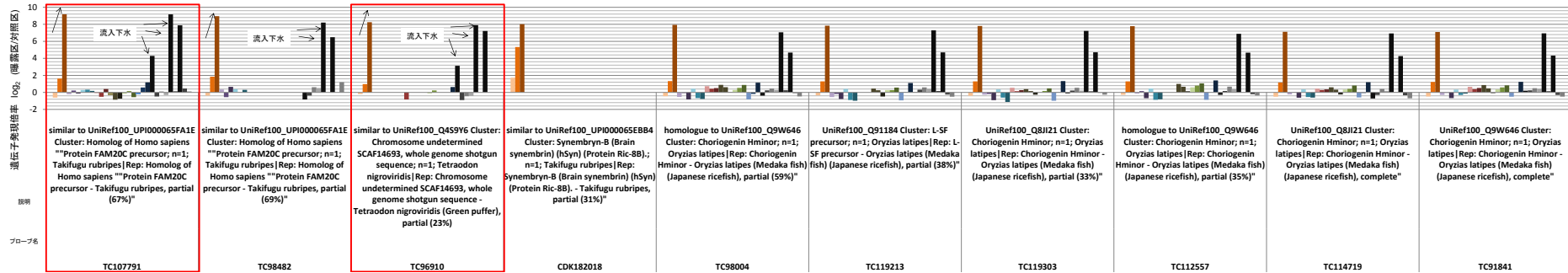


図-18 肝臓でのエストロン (Estrone) マーカー候補遺伝子

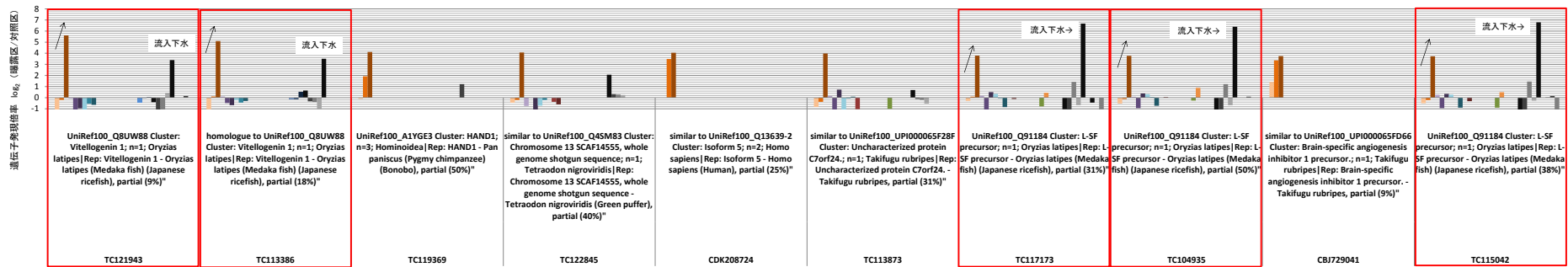


図-19 エラでのエストロン (Estrone) マーカー候補遺伝子

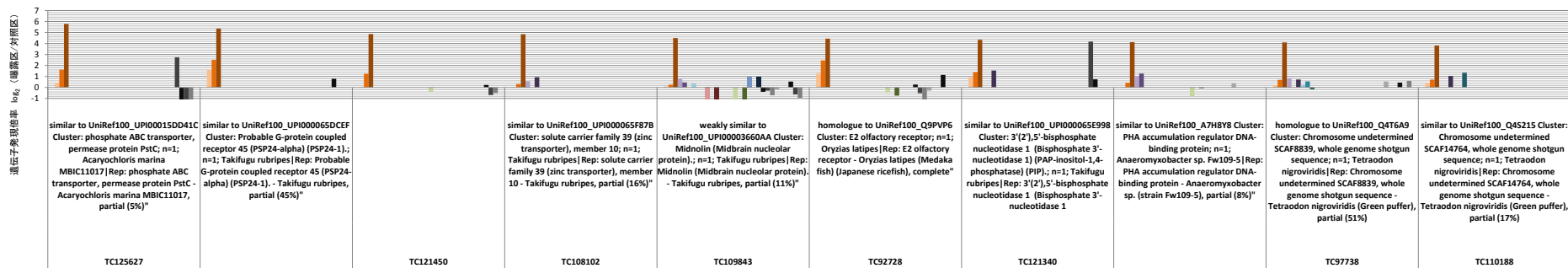


図-20 精巢でのエストロン (Estrone) マーカー候補遺伝子

■ Estrone 2ng/L ■ Estrone 20ng/L ■ Estrone 200ng/L ■ NDMA 10ng/L ■ NDMA 100ng/L ■ NDMA 1000ng/L ■ Triclosan 50ng/L ■ Triclosan 500ng/L ■ Triclosan 5000ng/L ■ Flutamide 10μg/L ■ Flutamide 100μg/L ■ Flutamide 1000μg/L ■ Cyclophosphamide 5ng/L ■ Cyclophosphamide 50ng/L ■ Cyclophosphamide 500ng/L ■ Clarithromycin 50ng/L ■ Clarithromycin 500ng/L ■ Clarithromycin 5000ng/L ■ DHT 40ng/L ■ DHT 400ng/L ■ DHT 4000ng/L
■ 201111 流入下水 ■ 201111 2次処理水 ■ 201111 塩素処理水 ■ 201111 担体処理水 ■ 201009 流入下水 ■ 201009 2次処理水 ■ 201012 流入下水 ■ 201012 2次処理水 ■ 201012 塩素処理水

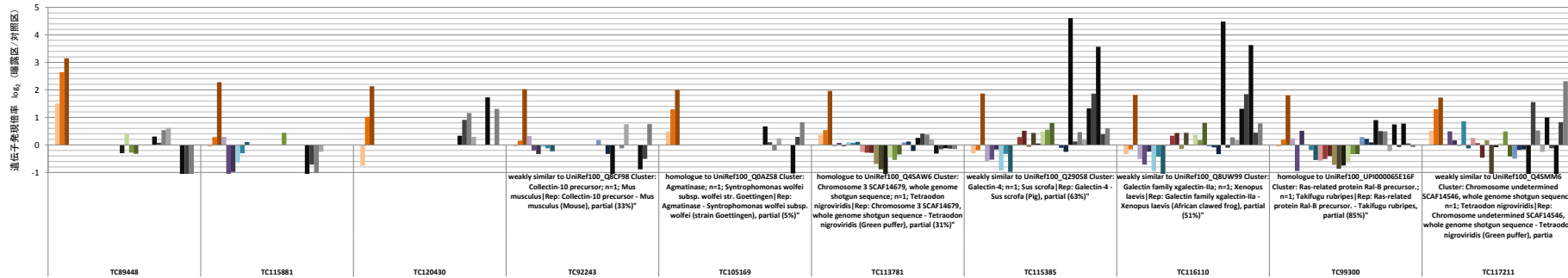


図-21 脳でのエストロン (Estrone) マーカー候補遺伝子

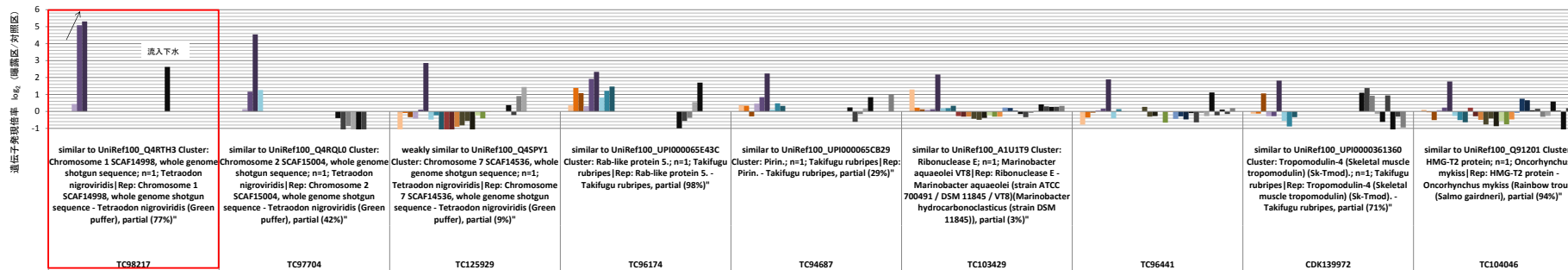


図-22 肝臓でのNDMA マーカー候補遺伝子

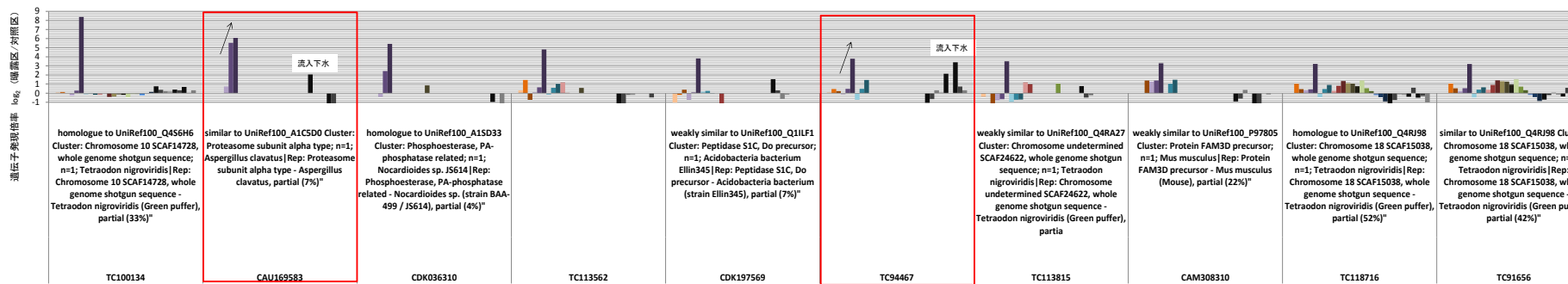


図-23 エラでのNDMA マーカー候補遺伝子

■ Estrone 2ng/L ■ Estrone 20ng/L ■ Estrone 200ng/L ■ NDMA 10ng/L ■ NDMA 100ng/L ■ NDMA 1000ng/L ■ Triclosan 50ng/L ■ Triclosan 500ng/L ■ Triclosan 5000ng/L ■ Flutamide 10µg/L ■ Flutamide 100µg/L ■ Flutamide 1000µg/L ■ Cyclophosphamide 5ng/L ■ Cyclophosphamide 50ng/L ■ Cyclophosphamide 500ng/L ■ Clarithromycin 50ng/L ■ Clarithromycin 500ng/L ■ Clarithromycin 5000ng/L ■ DHT 40ng/L ■ DHT 400ng/L ■ DHT 4000ng/L

■ 201111 流入下水 ■ 201111 2次処理水 ■ 201111 塩素処理水 ■ 201111 担体処理水 ■ 201009 流入下水 ■ 201009 2次処理水 ■ 201012 流入下水 ■ 201012 2次処理水 ■ 201012 塩素処理水

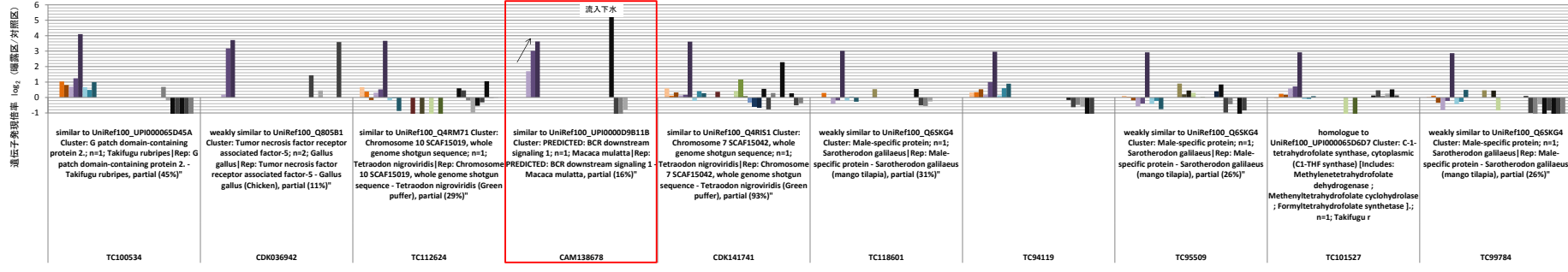


図-24 精巢でのNDMA マーカー候補遺伝子

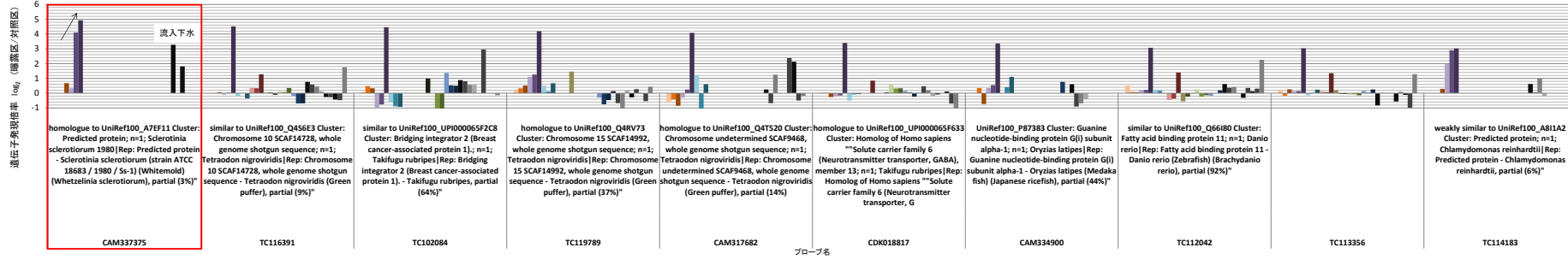


図-25 脳でのNDMA マーカー候補遺伝子

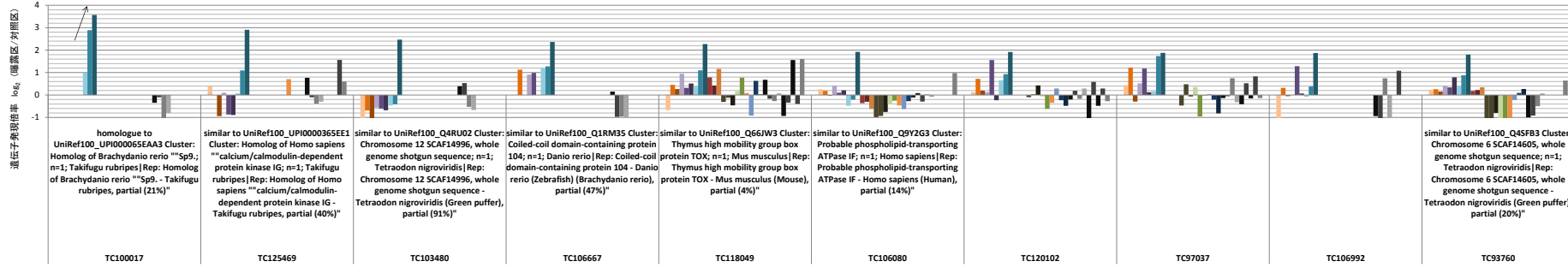


図-26 肝臓でのトリクロサン (Triclosan) マーカー候補遺伝子

■ Estrone 2ng/L ■ Estrone 20ng/L ■ Estrone 200ng/L ■ NDMA 10ng/L ■ NDMA 100ng/L ■ NDMA 1000ng/L ■ Triclosan 50ng/L ■ Triclosan 500ng/L ■ Triclosan 5000ng/L ■ Flutamide 10μg/L ■ Flutamide 100μg/L ■ Flutamide 1000μg/L ■ Cyclophosphamide 5ng/L ■ Cyclophosphamide 50ng/L ■ Cyclophosphamide 500ng/L ■ Clarithromycin 50ng/L ■ Clarithromycin 500ng/L ■ Clarithromycin 5000ng/L ■ DHT 40ng/L ■ DHT 400ng/L ■ DHT 4000ng/L
■ 201111 流入下水 ■ 201111 2次処理水 ■ 201111 塩素処理水 ■ 201111 担体処理水 ■ 201009 流入下水 ■ 201009 2次処理水 ■ 201012 流入下水 ■ 201012 2次処理水 ■ 201012 塩素処理水

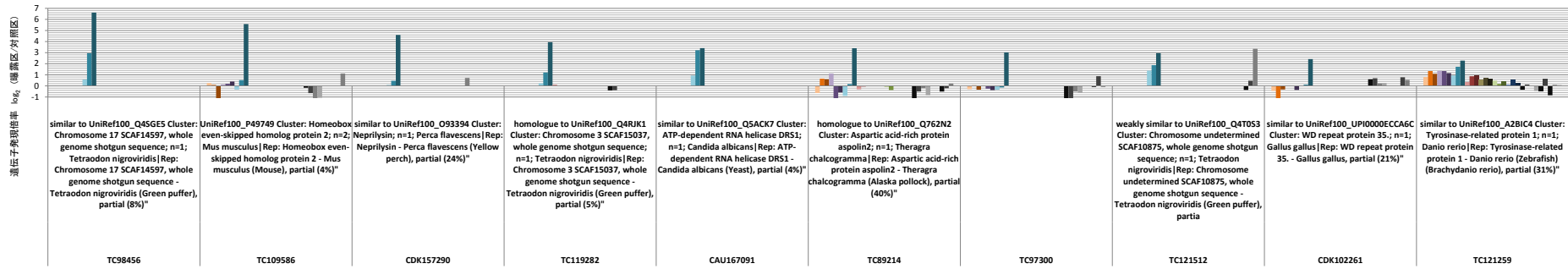


図-27 エラでのトリクロサン (Triclosan) マーカー候補遺伝子

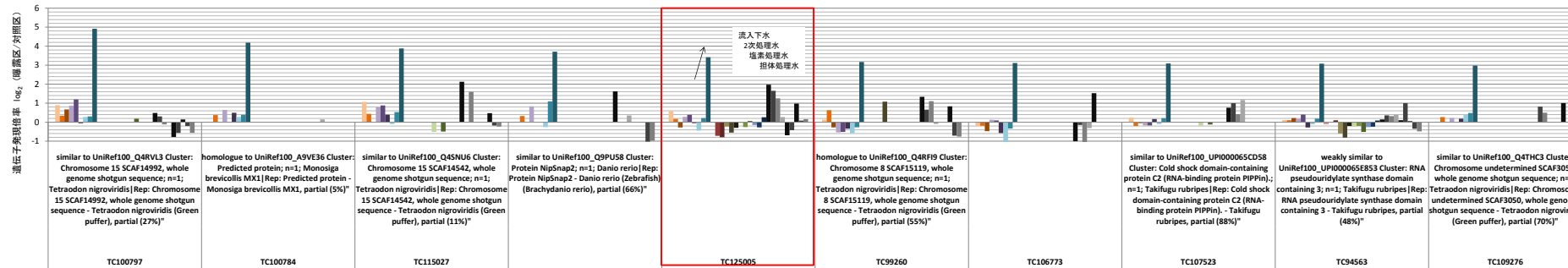


図-28 精巣でのトリクロサン (Triclosan) マーカー候補遺伝子

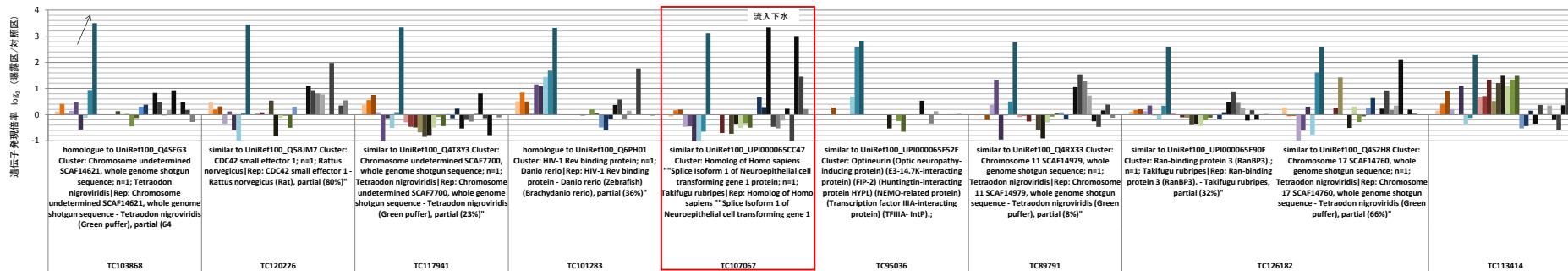


図-29 脳でのトリクロサン (Triclosan) マーカー候補遺伝子

■ Estrone 2ng/L ■ Estrone 20ng/L ■ Estrone 200ng/L ■ NDMA 10ng/L ■ NDMA 100ng/L ■ NDMA 1000ng/L ■ Triclosan 50ng/L ■ Triclosan 500ng/L ■ Triclosan 5000ng/L ■ Flutamide 10μg/L ■ Flutamide 100μg/L ■ Flutamide 1000μg/L ■ Cyclophosphamide 5ng/L ■ Cyclophosphamide 50ng/L ■ Cyclophosphamide 500ng/L ■ Clarithromycin 50ng/L ■ Clarithromycin 500ng/L ■ Clarithromycin 5000ng/L ■ DHT 40ng/L ■ DHT 400ng/L ■ DHT 4000ng/L
■ 201111 流入下水 ■ 201111 2次処理水 ■ 201111 塩素処理水 ■ 201111 担体処理水 ■ 201009 流入下水 ■ 201009 2次処理水 ■ 201012 流入下水 ■ 201012 2次処理水 ■ 201012 塩素処理水

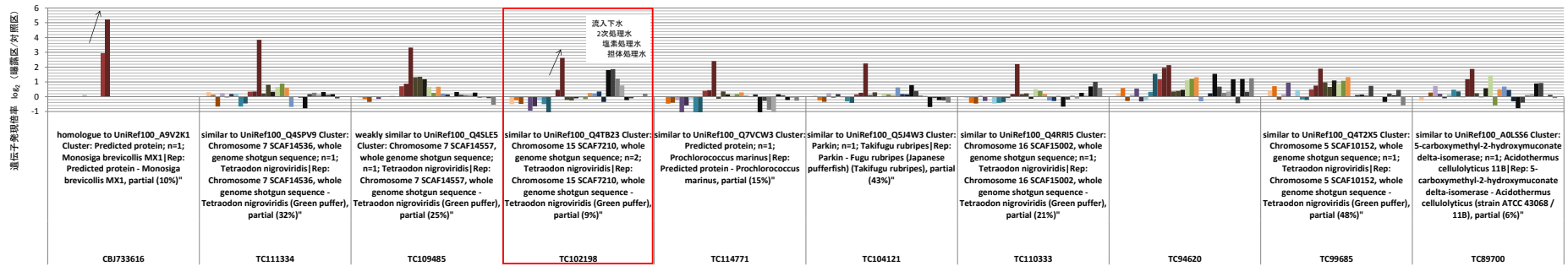


図-30 肝臓でのフルタミド (Flutamide) マーカー候補遺伝子

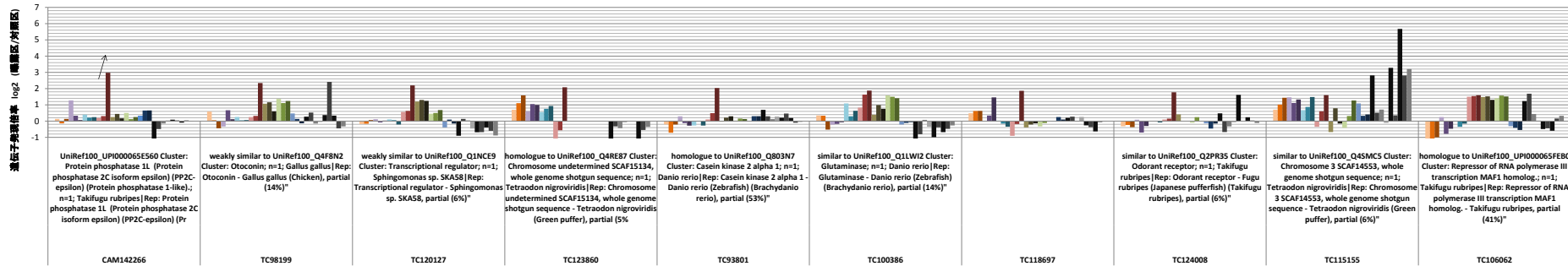


図-31 エラでのフルタミド (Flutamide) マーカー候補遺伝子

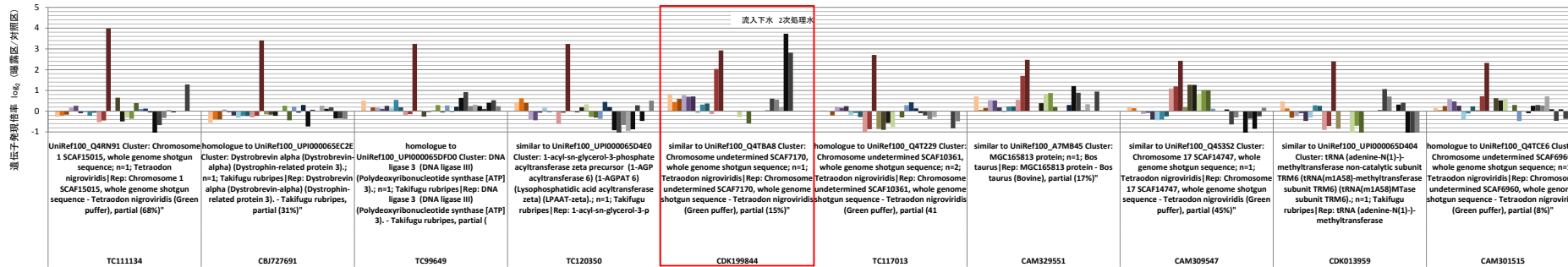


図-32 精巣でのフルタミド (Flutamide) マーカー候補遺伝子

■ Estrone 2ng/L ■ Estrone 20ng/L ■ Estrone 200ng/L ■ NDMA 10ng/L ■ NDMA 100ng/L ■ NDMA 1000ng/L ■ Triclosan 50ng/L ■ Triclosan 500ng/L ■ Triclosan 5000ng/L ■ Flutamide 10μg/L ■ Flutamide 100μg/L ■ Flutamide 1000μg/L ■ Cyclophosphamide 5ng/L ■ Cyclophosphamide 50ng/L ■ Cyclophosphamide 500ng/L ■ Clarithromycin 50ng/L ■ Clarithromycin 500ng/L ■ Clarithromycin 5000ng/L ■ DHT 40ng/L ■ DHT 400ng/L ■ DHT 4000ng/L
■ 201111 流入下水 ■ 201111 2次処理水 ■ 201111 塩素処理水 ■ 201111 担体処理水 ■ 201009 流入下水 ■ 201009 2次処理水 ■ 201012 流入下水 ■ 201012 2次処理水 ■ 201012 塩素処理水

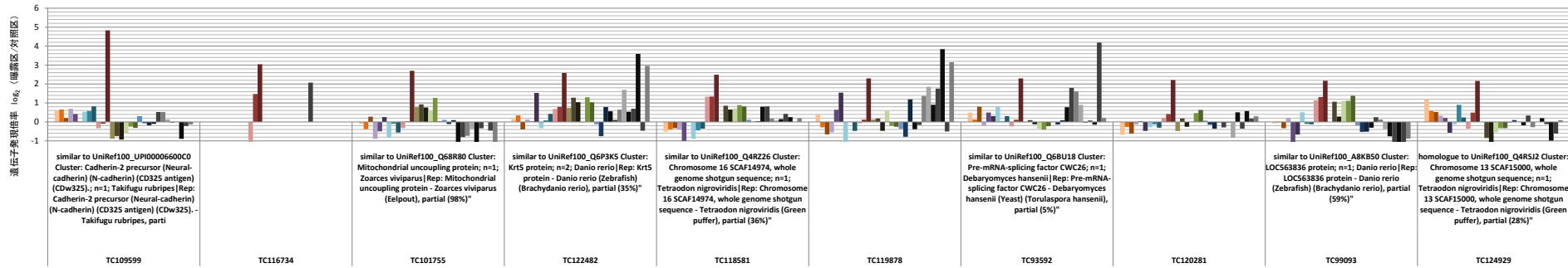


図-33 脳でのフルタミド (Flutamide) マーカー候補遺伝子

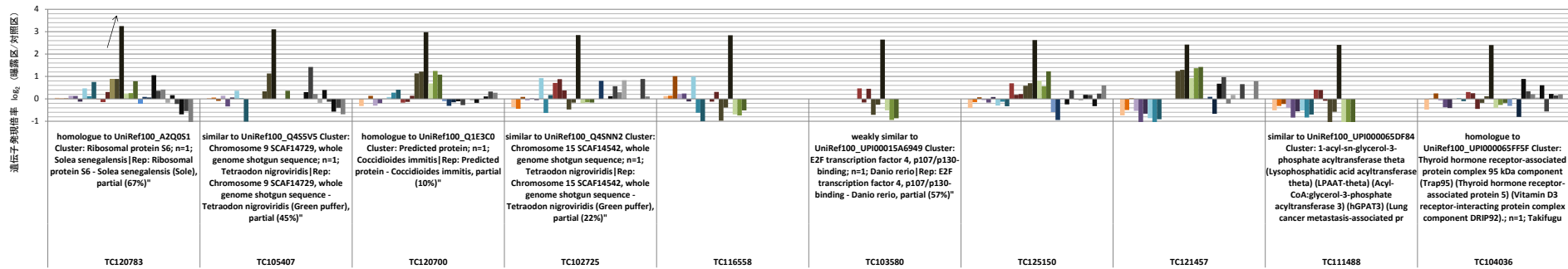


図-34 肝臓でのシクロホスファミド (Cyclophosphamide) マーカー候補遺伝子

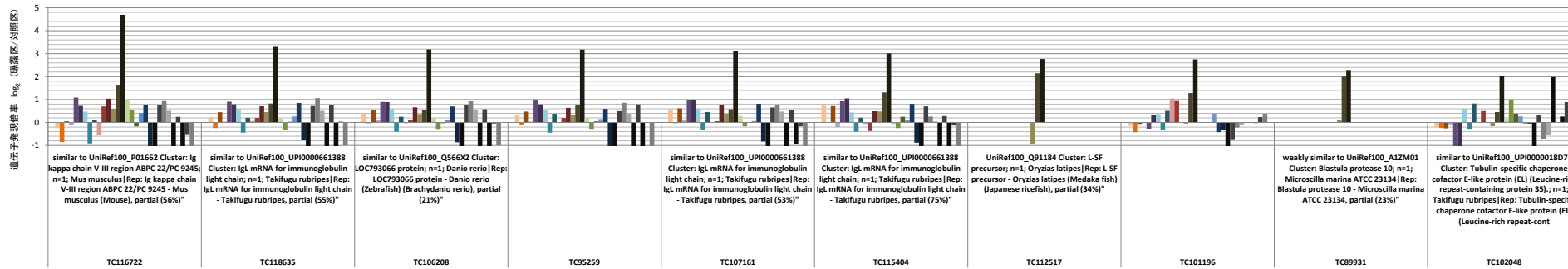


図-35 エラでのシクロホスファミド (Cyclophosphamide) マーカー候補遺伝子

■ Estrone 2ng/L ■ Estrone 20ng/L ■ Estrone 200ng/L ■ NDMA 10ng/L ■ NDMA 100ng/L ■ NDMA 1000ng/L ■ Triclosan 50ng/L ■ Triclosan 500ng/L ■ Triclosan 5000ng/L ■ Flutamide 10 μ g/L ■ Flutamide 100 μ g/L ■ Flutamide 1000 μ g/L ■ Cyclophosphamide 5ng/L ■ Cyclophosphamide 50ng/L ■ Cyclophosphamide 500ng/L ■ Clarithromycin 50ng/L ■ Clarithromycin 500ng/L ■ Clarithromycin 5000ng/L ■ DHT 40ng/L ■ DHT 400ng/L ■ DHT 4000ng/L
■ 201111 流入下水 ■ 201111 2次処理水 ■ 201111 塩素処理水 ■ 201111 担体処理水 ■ 201009 流入下水 ■ 201009 2次処理水 ■ 201012 流入下水 ■ 201012 2次処理水 ■ 201012 塩素処理水

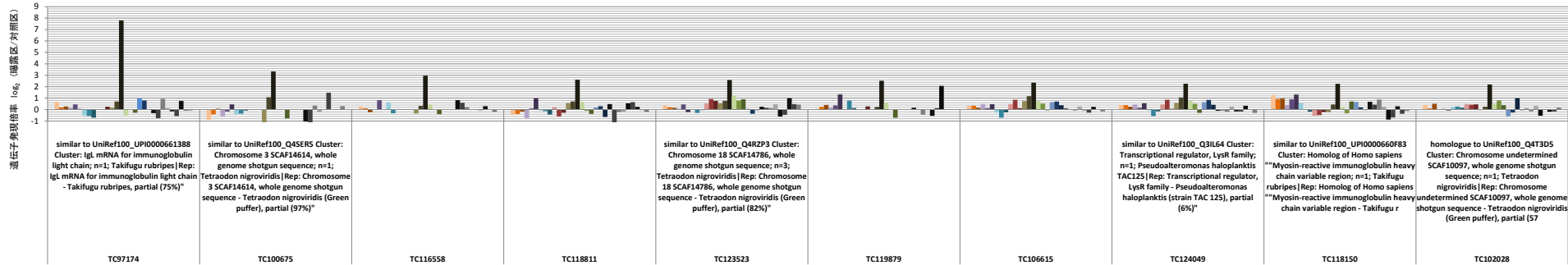


図-36 精巣でのシクロホスファミド (Cyclophosphamide) マーカー候補遺伝子

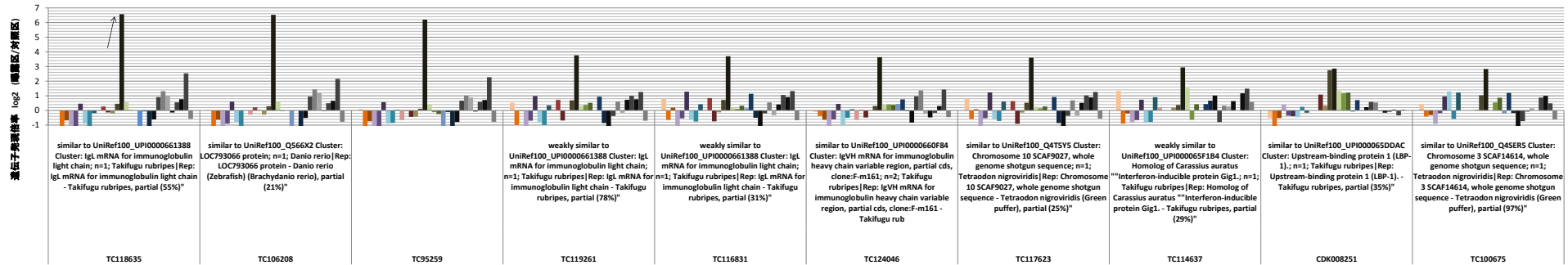


図-37 脳でのシクロホスファミド (Cyclophosphamide) マーカー候補遺伝子

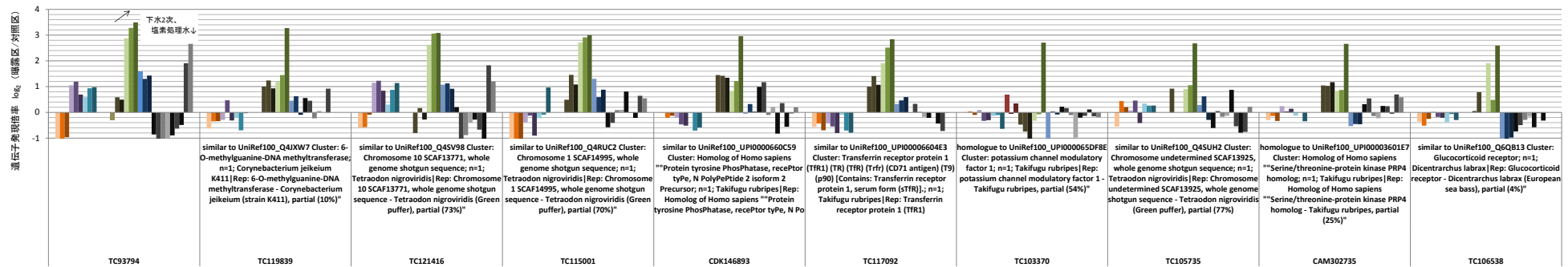


図-38 肝臓でのクラリスロマイシン (Clarithromycin) マーカー候補遺伝子

■ Estrone 2ng/L ■ Estrone 20ng/L ■ Estrone 200ng/L ■ NDMA 10ng/L ■ NDMA 100ng/L ■ NDMA 1000ng/L ■ Triclosan 50ng/L ■ Triclosan 500ng/L ■ Triclosan 5000ng/L ■ Flutamide 10µg/L ■ Flutamide 100µg/L ■ Flutamide 1000µg/L ■ Cyclophosphamide 5ng/L ■ Cyclophosphamide 50ng/L ■ Cyclophosphamide 500ng/L ■ Clarithromycin 50ng/L ■ Clarithromycin 500ng/L ■ Clarithromycin 5000ng/L ■ DHT 40ng/L ■ DHT 400ng/L ■ DHT 4000ng/L
■ 201111 流入下水 ■ 201111 2次処理水 ■ 201111 塩素処理水 ■ 201111 担体処理水 ■ 201009 流入下水 ■ 201009 2次処理水 ■ 201012 流入下水 ■ 201012 2次処理水 ■ 201012 塩素処理水

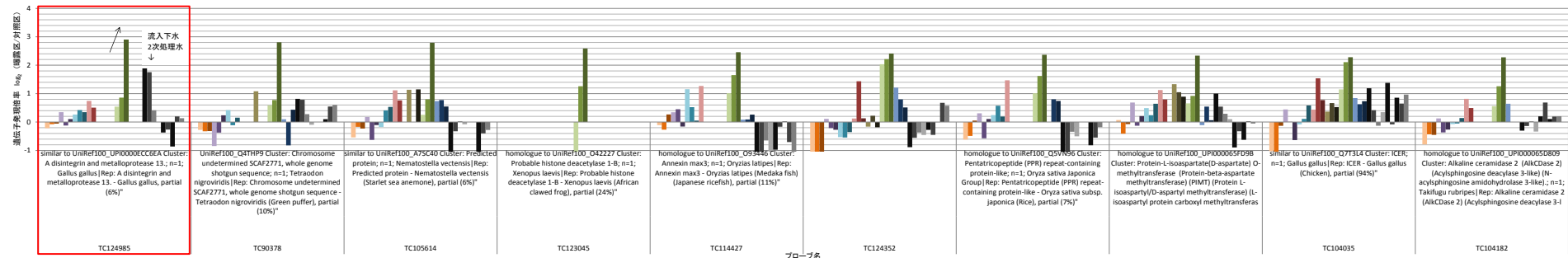


図-39 エラでのクラリスロマイシン (Clarithromycin) マーカー候補遺伝子

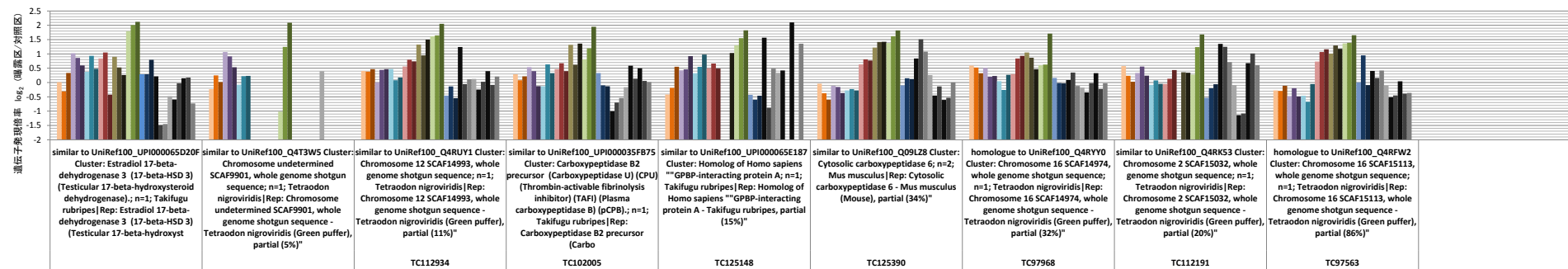


図-40 精巣でのクラリスロマイシン (Clarithromycin) マーカー候補遺伝子

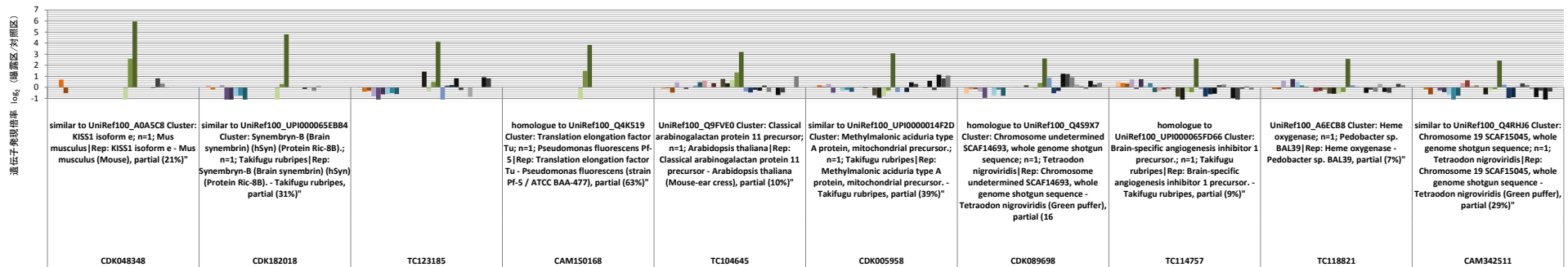


図-41 脳でのクラリスロマイシン (Clarithromycin) マーカー候補遺伝子

■ Estrone 2ng/L ■ Estrone 20ng/L ■ Estrone 200ng/L ■ NDMA 10ng/L ■ NDMA 100ng/L ■ NDMA 1000ng/L ■ Triclosan 50ng/L ■ Triclosan 500ng/L ■ Triclosan 5000ng/L ■ Flutamide 10 μ g/L ■ Flutamide 100 μ g/L ■ Flutamide 1000 μ g/L ■ Cyclophosphamide 5ng/L ■ Cyclophosphamide 50ng/L ■ Cyclophosphamide 500ng/L ■ Clarithromycin 50ng/L ■ Clarithromycin 500ng/L ■ Clarithromycin 5000ng/L ■ DHT 40ng/L ■ DHT 400ng/L ■ DHT 4000ng/L
■ 201111 流入下水 ■ 201111 2次処理水 ■ 201111 塩素処理水 ■ 201111 担体処理水 ■ 201009 流入下水 ■ 201009 2次処理水 ■ 201012 流入下水 ■ 201012 2次処理水 ■ 201012 塩素処理水

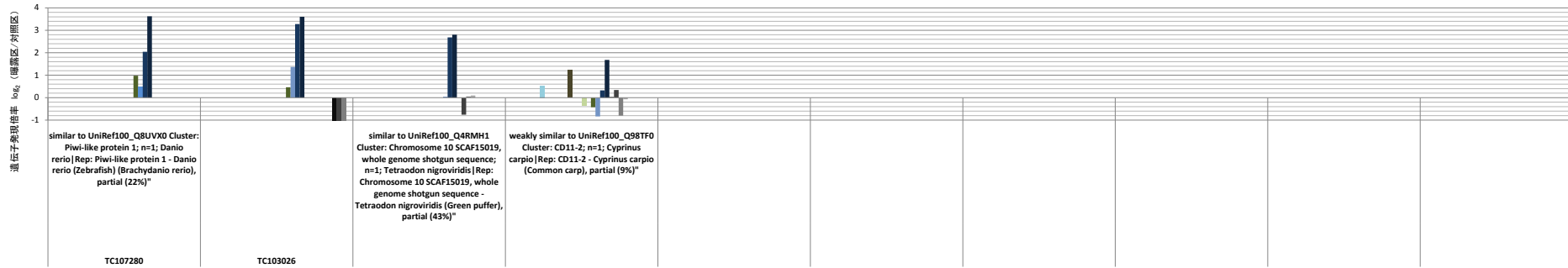


図-42 肝臓でのジヒドロテストステロン (DHT) マーカー候補遺伝子

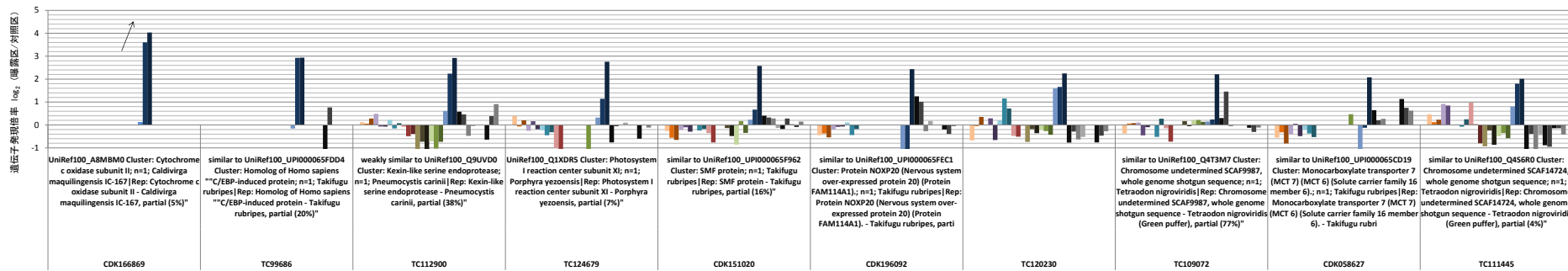


図-43 エラでのジヒドロテストステロン (DHT) マーカー候補遺伝子

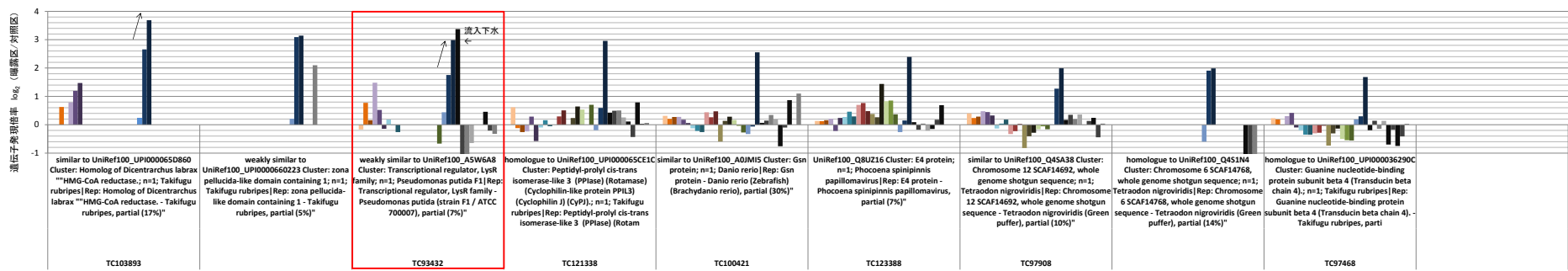


図-44 精巢でのジヒドロテストステロン (DHT) マーカー候補遺伝子

■ Estrone 2ng/L ■ Estrone 20ng/L ■ Estrone 200ng/L ■ NDMA 10ng/L ■ NDMA 100ng/L ■ NDMA 1000ng/L ■ Triclosan 50ng/L ■ Triclosan 500ng/L ■ Triclosan 5000ng/L ■ Flutamide 10μg/L ■ Flutamide 100μg/L ■ Flutamide 1000μg/L ■ Cyclophosphamide 5ng/L ■ Cyclophosphamide 50ng/L ■ Cyclophosphamide 500ng/L ■ Clarithromycin 50ng/L ■ Clarithromycin 500ng/L ■ Clarithromycin 5000ng/L ■ DHT 40ng/L ■ DHT 400ng/L ■ DHT 4000ng/L
■ 201111 流入下水 ■ 201111 2次処理水 ■ 2011112 塩素処理水 ■ 201111 担体処理水 ■ 201009 流入下水 ■ 201009 2次処理水 ■ 201012 流入下水 ■ 201012 2次処理水 ■ 201012 塩素処理水

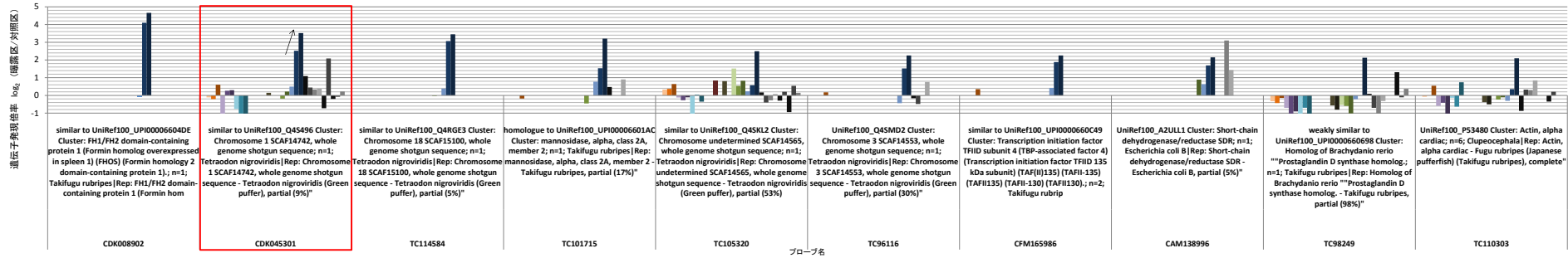


図-45 脳でのジドロテストステロン (DHT) マーカー候補遺伝子

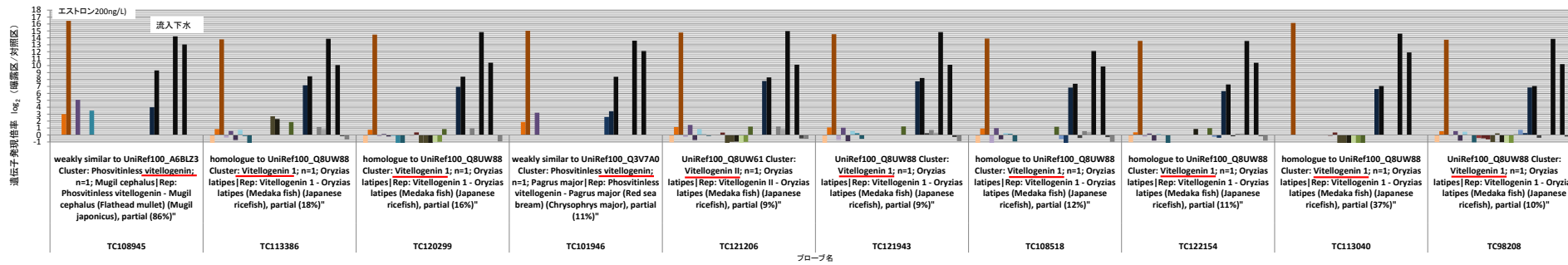


図-46 流入下水曝露時の肝臓マーカー候補遺伝子 (高発現遺伝子上位 1~10)

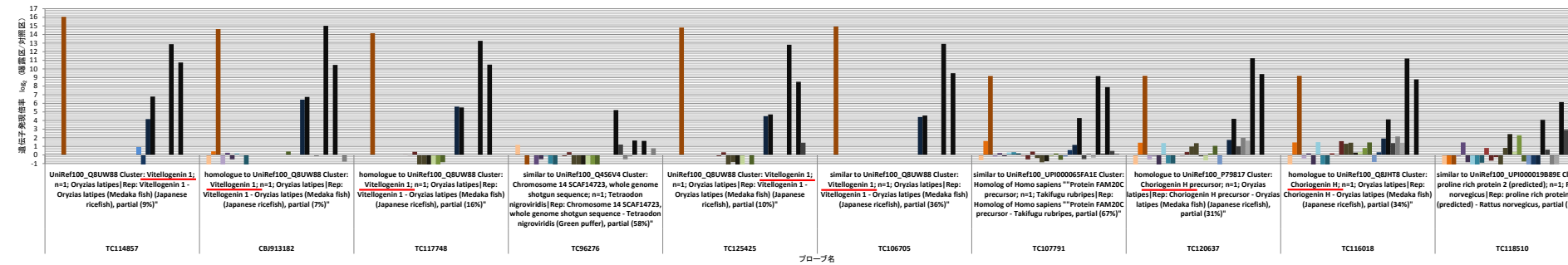


図-47 流入下水曝露時の肝臓マーカー候補遺伝子 (高発現遺伝子 10~20)

■ Estrone 2ng/L ■ Estrone 20ng/L ■ Estrone 200ng/L ■ NDMA 10ng/L ■ NDMA 100ng/L ■ NDMA 1000ng/L ■ Triclosan 50ng/L ■ Triclosan 500ng/L ■ Triclosan 5000ng/L ■ Flutamide 10μg/L ■ Flutamide 100μg/L ■ Flutamide 1000μg/L ■ Cyclophosphamide 5ng/L ■ Cyclophosphamide 50ng/L ■ Cyclophosphamide 500ng/L ■ Clarithromycin 50ng/L ■ Clarithromycin 500ng/L ■ Clarithromycin 5000ng/L ■ DHT 40ng/L ■ DHT 400ng/L ■ DHT 4000ng/L
■ 201111 流入下水 ■ 201111 2次処理水 ■ 201111 塩素処理水 ■ 201111 担体処理水 ■ 201009 流入下水 ■ 201009 2次処理水 ■ 201012 流入下水 ■ 201012 2次処理水 ■ 201012 塩素処理水

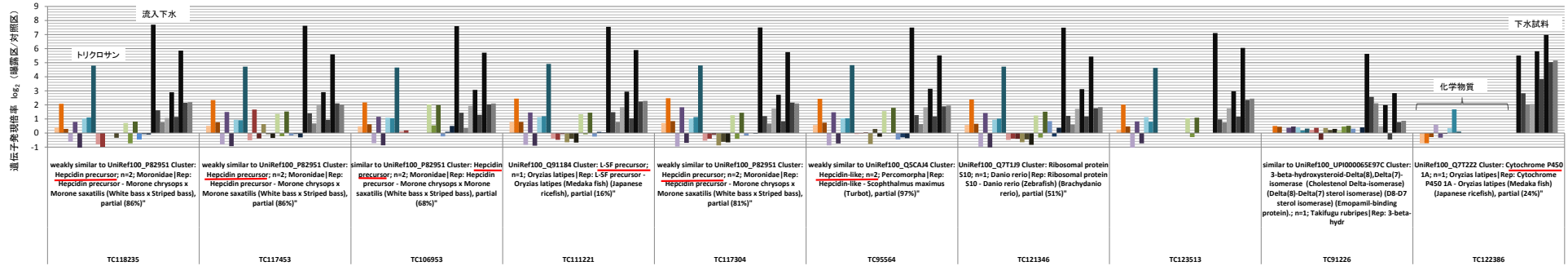


図-48 エラでの流入下水マーカー候補遺伝子(高発現遺伝子 1-10)

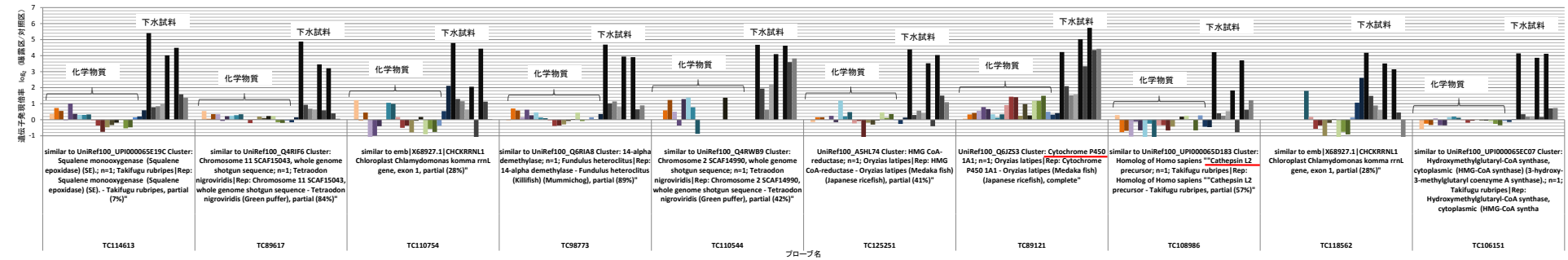


図-49 エラでの流入下水マーカー候補遺伝子(高発現遺伝子 10-20)

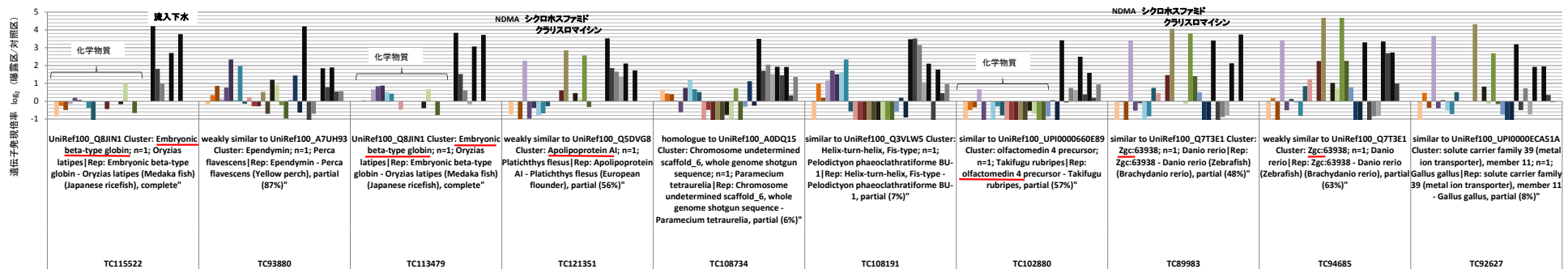


図-50 精巣での流入下水マーカー候補遺伝子(高発現遺伝子 1-10)

■ Estrone 2ng/L ■ Estrone 20ng/L ■ Estrone 200ng/L ■ NDMA 10ng/L ■ NDMA 100ng/L ■ NDMA 1000ng/L ■ Triclosan 50ng/L ■ Triclosan 500ng/L ■ Triclosan 5000ng/L ■ Flutamide 10µg/L ■ Flutamide 100µg/L ■ Flutamide 1000µg/L ■ Cyclophosphamide 5ng/L ■ Cyclophosphamide 50ng/L ■ Cyclophosphamide 500ng/L ■ Clarithromycin 50ng/L ■ Clarithromycin 500ng/L ■ Clarithromycin 5000ng/L ■ DHT 40ng/L ■ DHT 400ng/L ■ DHT 4000ng/L
■ 201111 流入下水 ■ 201111 2次処理水 ■ 201111 塩素処理水 ■ 201111 担体処理水 ■ 201009 流入下水 ■ 201009 2次処理水 ■ 201012 流入下水 ■ 201012 2次処理水 ■ 201012 塩素処理水

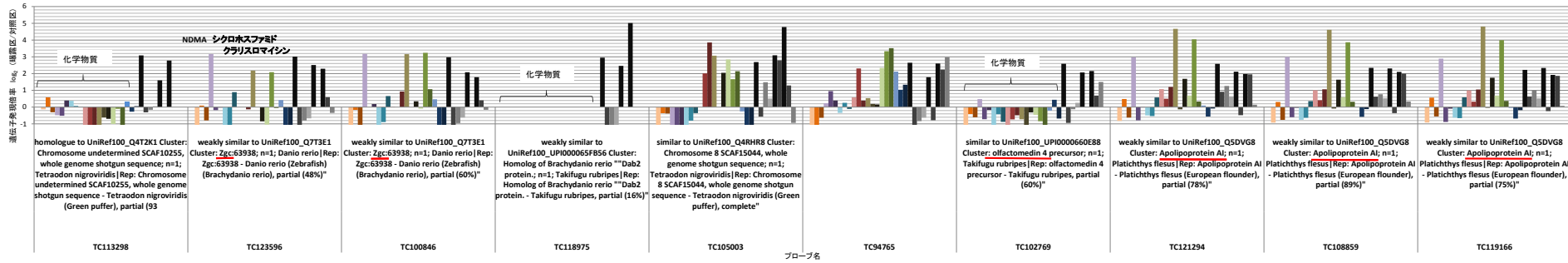


図-51 精巣での流入下水マーカー候補遺伝子(高発現遺伝子 10-20)

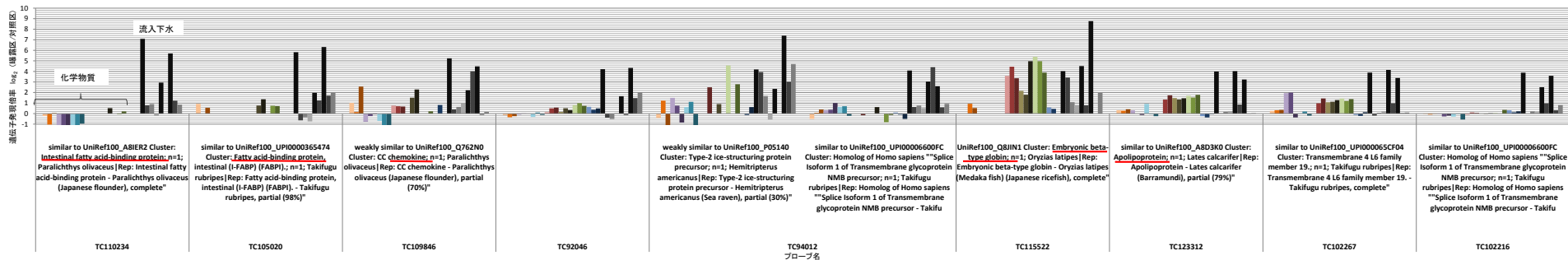


図-52 脳での流入下水マーカー候補遺伝子(高発現遺伝子 1-10)

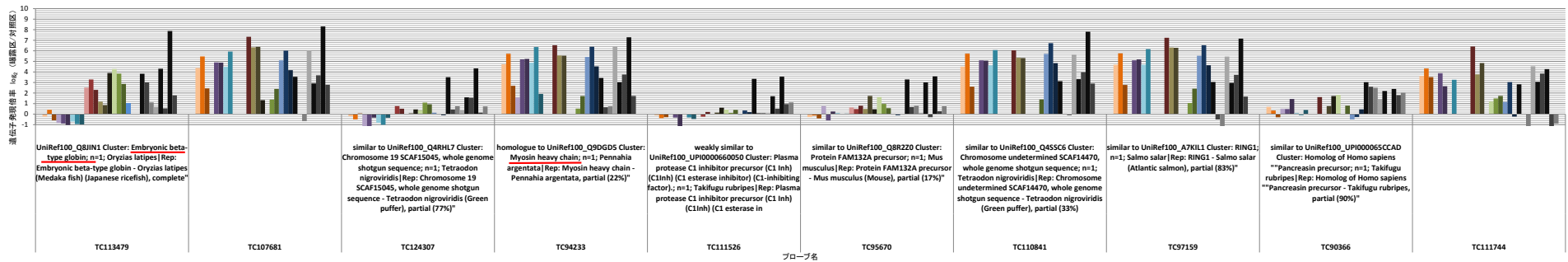


図-53 脳での流入下水マーカー候補遺伝子(高発現遺伝子 10-20)

図-18~45は、各化学物質、臓器毎にマーカー探索を行った結果である。横軸は抽出された遺伝子名とその説明、縦軸は対照区との発現倍率である。なお、図は、高濃度区で遺伝子発現倍率が高くなった上位10遺伝子を掲載している。例えば、エストロン曝露時の肝臓での抽出された遺伝子をみると(図-18)、TC107791、TC9610 遺伝子は、エストロン曝露区で濃度依存性がみられ、他の化学物質では遺伝子発現は変化していない。流入下水では遺伝子発現が高倍率になっていることから、流入下水には、エストロンすなわち女性ホルモンが含まれていることがわかる。これらの遺伝子は、エストロン(女性ホルモン物質)のマーカー候補遺伝子になると考えられる。2次処理水、塩素処理水、担体処理水では、遺伝子発現強度は低いことから、女性ホルモン物質は下水処理過程で除去されていることがわかる。エストロンはエラ(図-19)、精巢(図-20)、脳(図-21)でも応答しているが、全ての流入下水曝露区で応答していないことから、エストロンの検出は、肝臓が適していると考えられる。

図-22~25は、NDMAのマーカー遺伝子の抽出結果である。肝臓ではTC98217、エラではCAU169583、精巢ではCAM138678、脳ではCAM337375 遺伝子が、NDMAと濃度依存性を有し、流入下水曝露区でも高発現となっていた。これらの遺伝子は、各下水処理水曝露区で高発現となっていないことから、下水処理過程で発がん性物質は除去されていると考えられる。

図-26~29は、トリクロサンのマーカー遺伝子の抽出結果である。肝臓、エラではマーカー遺伝子は抽出されてこなかったが、精巢ではTC125005、脳ではTC107067がトリクロサンと濃度依存性を有し、下水試料でも高発現となっていた。下水処理レベルの高度化に従い、遺伝子発現倍率も低下していることから、下水処理過程でトリクロサン様物質は減少していると考えられる。

図-30~33はフルタミドのマーカー遺伝子の抽出結果である。肝臓ではTC102198、精巢ではCDK199844 遺伝子が、濃度依存性を有し、下水処理曝露区でも検出された。肝臓のTC102198 遺伝子は、下水処理レベルの高度化に従い、遺伝子発現強度が低下する傾向を示した。

図-34~37は、シクロホスファミドの結果である。濃度依存性を有する遺伝子は抽出されたが、下水試料で高発現となるものはなかった。シクロホスファミドは、抗がん剤であるが流入下水に高濃度で含まれていない可能性があり、このため流入下水試料で遺伝子発現が高発現にならなかった可能性がある。

ミドは、抗がん剤であるが流入下水に高濃度で含まれていない可能性があり、このため流入下水試料で遺伝子発現が高発現にならなかった可能性がある。

図-38~41はクラリスロマイシンのマーカー遺伝子の抽出結果である。エラのTC124985 遺伝子は、濃度依存性を有し、流入下水、2次処理水曝露区で高発現となった。

図-42~45はDHTのマーカー遺伝子の抽出結果である。精巢のTC9432 遺伝子は濃度依存性を有し、流入下水曝露区で高発現となった。

今回曝露実験に使用したモデル化学物質以外にも、下水試料には様々な物質が含まれていると考えられる。そこで、流入下水で高発現となる遺伝子を抽出し、化学物質の曝露実験での遺伝子発現との関係を調べた。

図-46,47は、肝臓で流入下水に高応答を示した遺伝子である。図は、201111 流入下水曝露区で昇順ソートした上位20位までを掲載している。図より vitellogenin、choriogenin と情報が付く遺伝子が多いことがわかる。エストロンも高くなっており、流入下水のメダカへの影響としては、女性ホルモン作用が大きいことがわかる。

図-48,49は、エラで流入下水に高応答を示した遺伝子である。ヘプシジン(hepcidin)と情報が付いた遺伝子が、上位を占め、トリクロサン高濃度曝露区でも高発現となっていることがわかる。P4501A1 遺伝子なども下水試料曝露区で高発現となっているが、モデル化学物質では低発現である。未知の物質が、エラに影響を与えていることがわかる。

図-50,51は、精巢で流入下水に高応答を示した遺伝子である。Embryonic beta-type globin の遺伝子発現が高発現になることがわかった。この遺伝子はモデル化学物質曝露区では高発現になっていないことから、下水試料中の未知物質が影響を与えている。Apolipoprotein 遺伝子は、下水で高発現になると同時にNDMA、シクロホスファミド、クラリスロマイシンで高発現となっていた。

図-52,53は、脳で流入下水に高応答を示した遺伝子である。Faty acid-binding protein, chemokine は、流入下水曝露区で高発現となっている。この遺伝子はモデル化学物質曝露区では高発現になっていないことから、下水試料中の未知物質が影響を与えている。脳でもApolipoprotein 遺伝子が高発現になることがわかった。

臓器によって化学物質の応答遺伝子が異なることがわかった。下水試料に含まれる化学物質の影響を幅広

く検出する場合は、臓器毎の遺伝子発現解析を行う必要がある。例えば、女性ホルモン様作用の検出は肝臓、発がん性物質の検出は脳、医薬品類はエラというように臓器毎に解析することにより、多角的な

毒性評価が可能となる。

4.4.2 統計解析による毒性評価

図-54、55は、代表例としてエストロン曝露区と下水道試料曝露区的全遺伝子発現データを用いて、ユーク

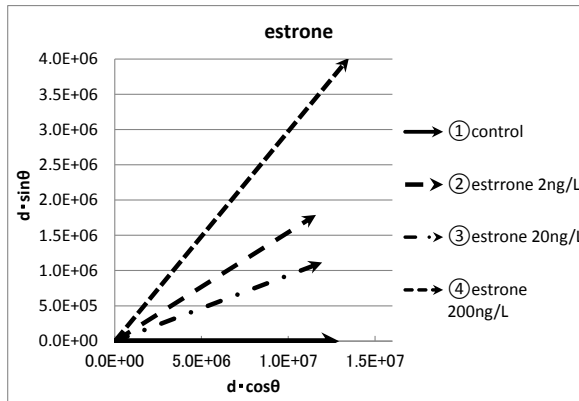


図-54 肝臓でのエストロン曝露区のユークリッド距離とピアソン相関の関係

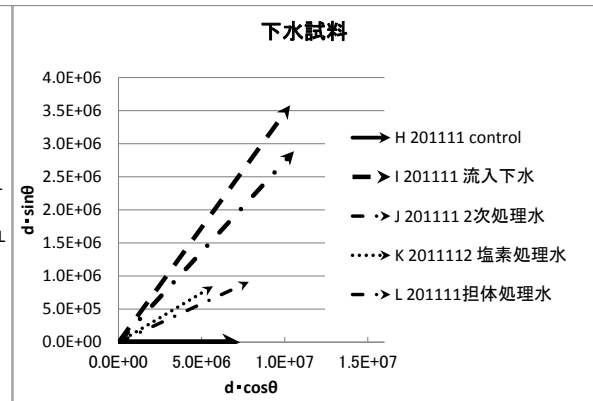


図-55 肝臓での下水道試料曝露区のユークリッド距離とピアソン相関の関係

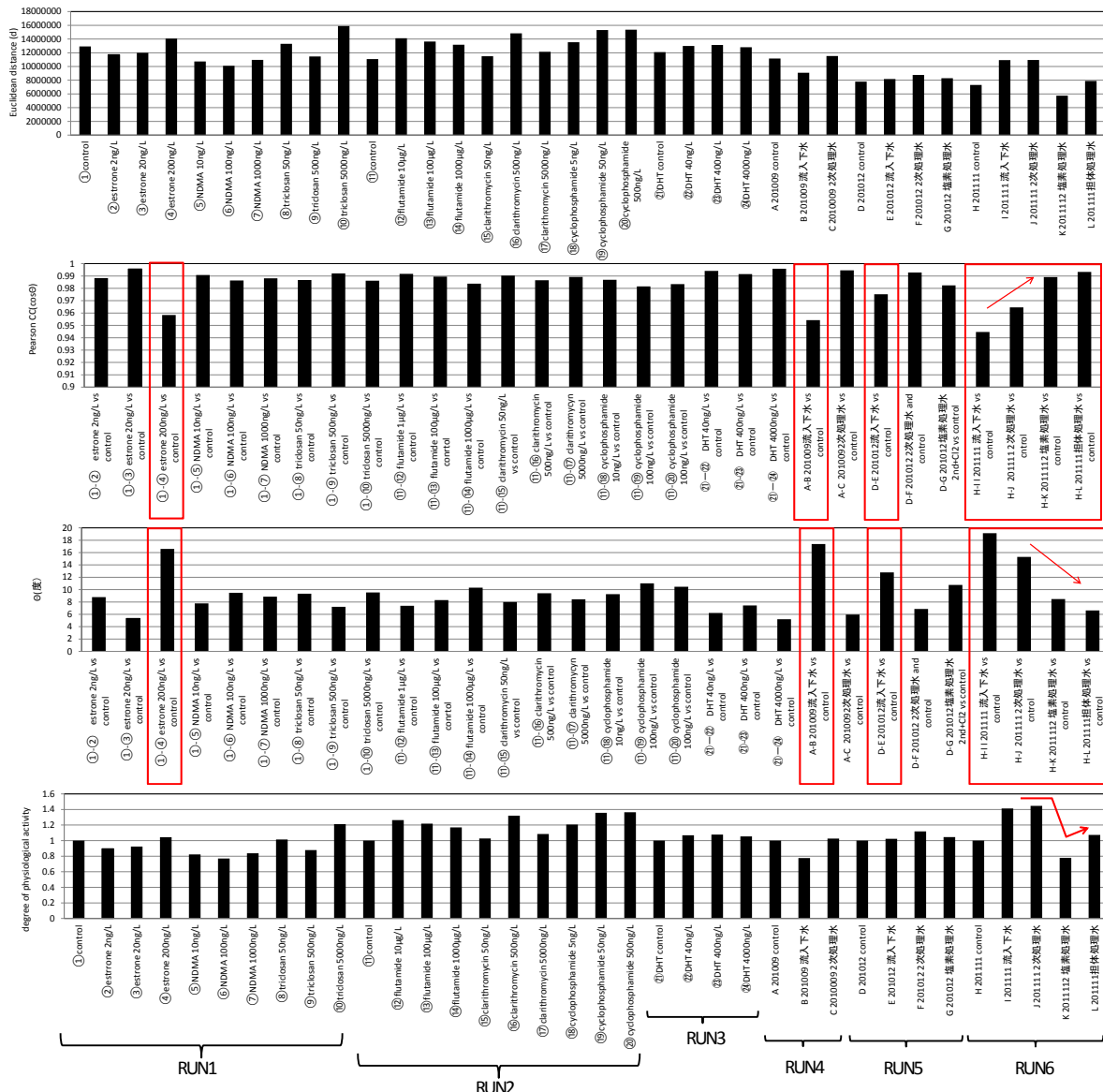


図-56 肝臓での化学物質、下水道試料曝露区のユークリッド距離(d)、ピアソン相関係数、θ、生理活性度

リッド距離とピアソン相関の関係を作図したものである。図より、エストロン曝露では高濃度曝露区で、ピアソン相関係数が低下 (θ の増加) することがわかる。下水試料でも流入下水曝露区でピアソン相関

係数が低下 (θ の増加) し、処理レベルが上がるにたがい、 θ が小さくなり、ベクトルの方向がコントロールに近づくことがわかる。図-56 は、各曝露区のユークリッド距離(d)、ピアソン相関係数 ($\cos\theta$)、 θ 、生

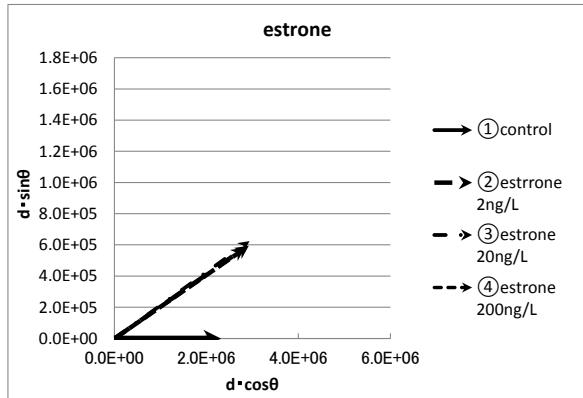


図-57 エラでのエストロン曝露区のユークリッド距離とピアソン相関の関係

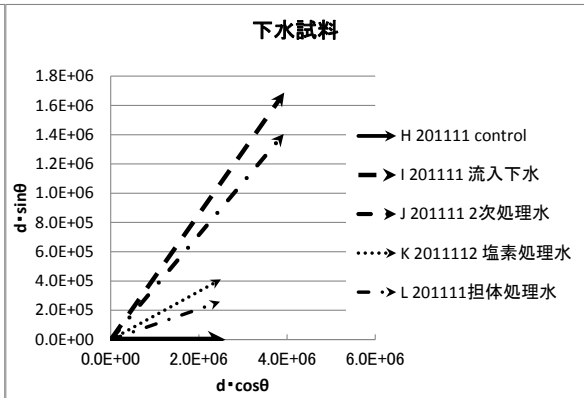


図-58 エラでの下水試料曝露区のユークリッド距離とピアソン相関の関係

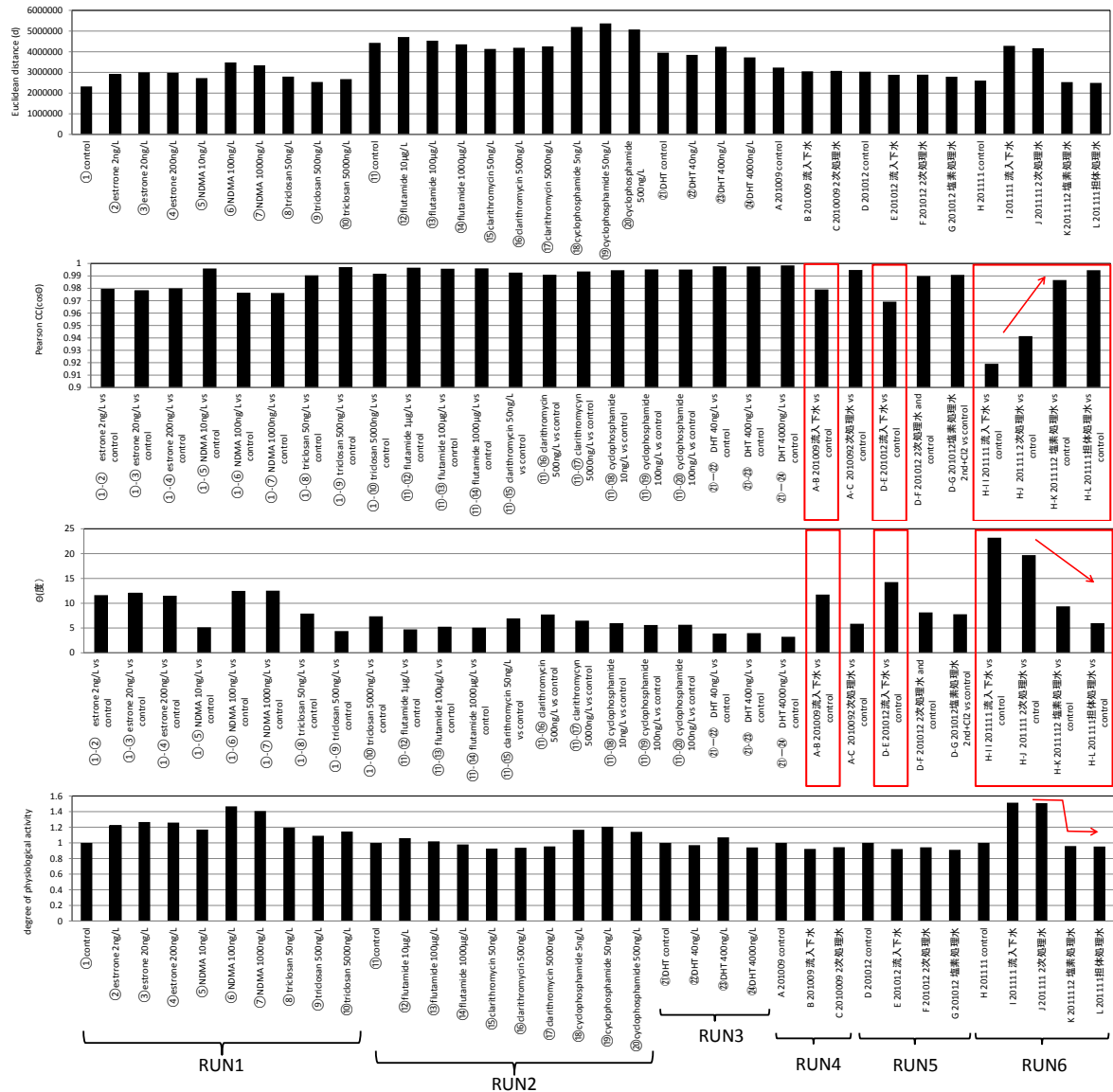


図-59 エラでの化学物質、下水試料曝露区のユークリッド距離(d)、ピアソン相関係数、 θ 、生理活性度

理活性度 (Degree of physiological activity) を表示したものである。図より、エストロン高濃度区、流入下水でピアソン相関係数の低下 (θ の増加) がみられる。201111 下水試料でこれらの傾向をみると処

理レベルが高度化するに従い、ピアソン相関係数の上昇 (θ の低下)、生理活性度は、1 に近づくことがわかる。

図-57,58,59 はエラの結果である。ベクトル表示の

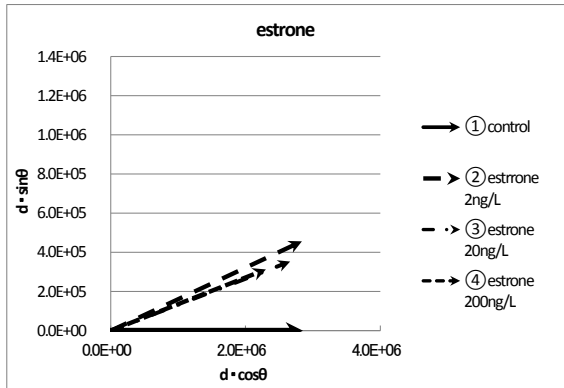


図-60 精巢でのエストロン曝露区のユークリッド距離とピアソン相関の関係

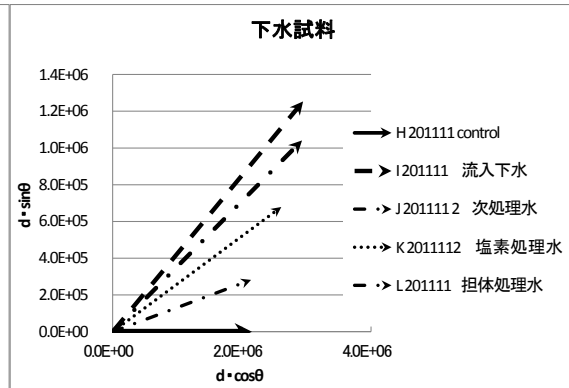


図-61 精巢での下水試料曝露区のユークリッド距離とピアソン相関の関係

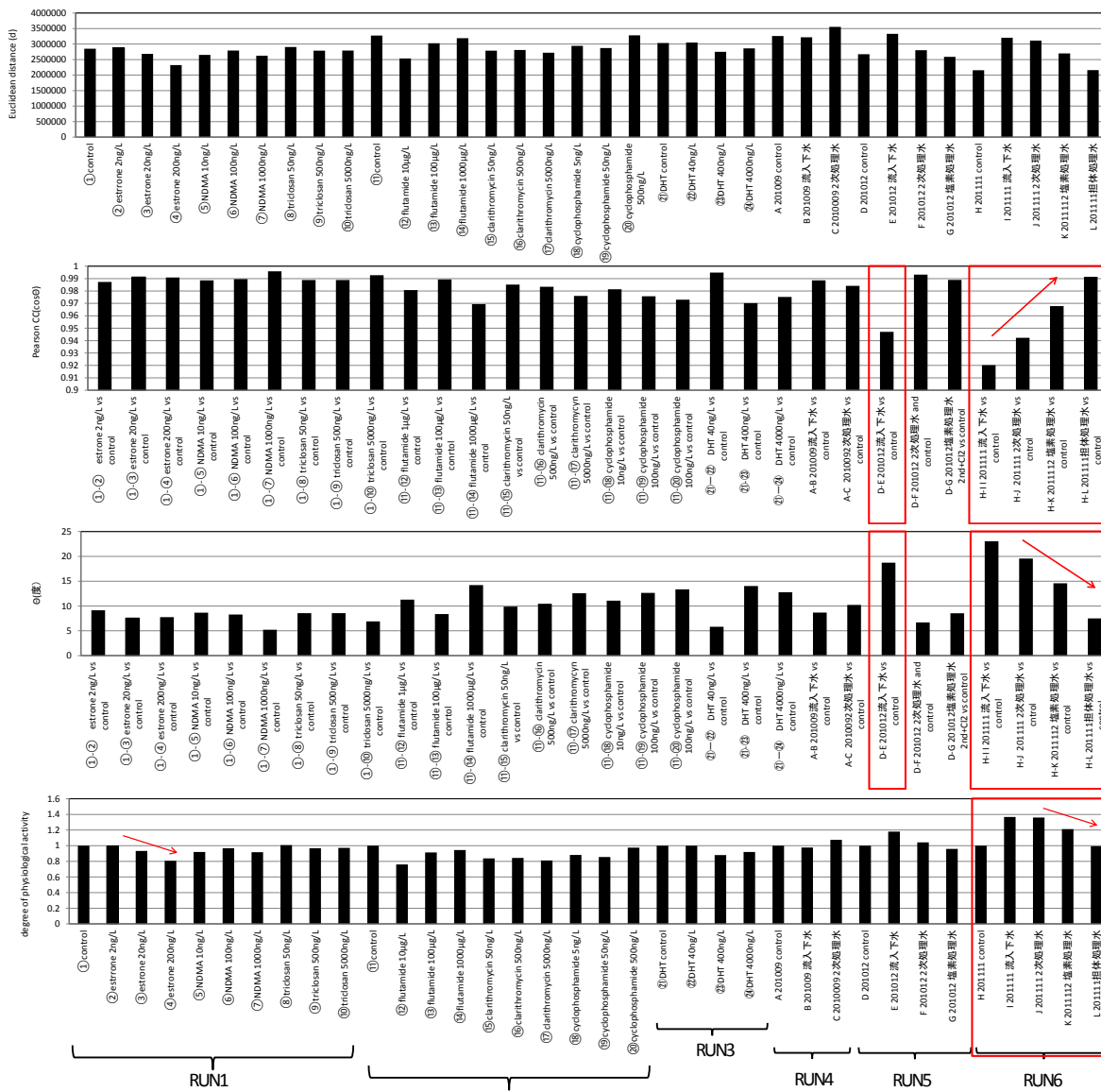


図-62 精巢での化学物質、下水試料曝露区のユークリッド距離(d)、ピアソン相関係数、 θ 、生理活性度

図より、エアではエストロン濃度の違いは顕著にみられないが、下水試料では、処理レベルが高度化するに従い、ベクトルがコントロールに近づくことがみて取れる。処理レベルの高度化によりピアソン相

関係数の上昇 (θ の低下)、生理活性度も1へ近づいており、影響が低減していることがわかる。

図-60,61,62 は精巢の結果である。下水試料曝露区ではエアと同様の結果を示した。エストロン曝露区で

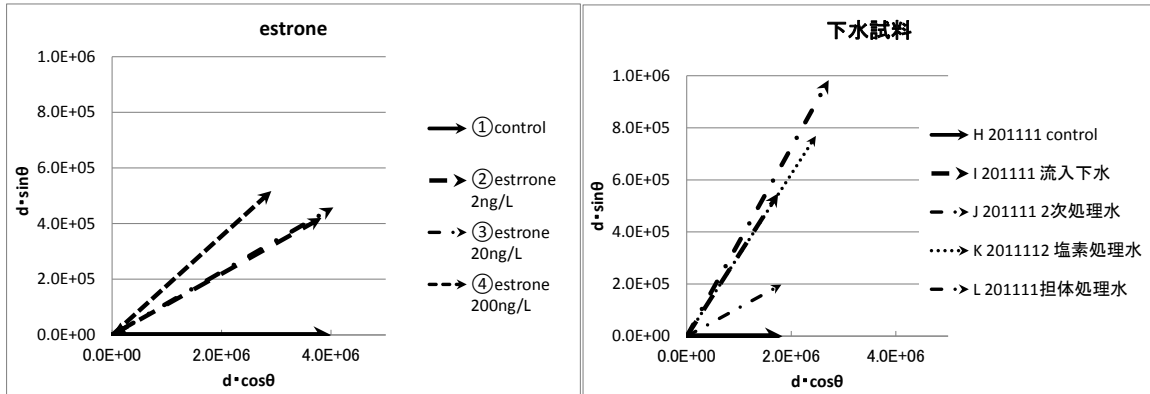


図-63 脳でのエストロン曝露区のユークリッド距離とピアソン相関の関係

図-64 脳での下水試料曝露区のユークリッド距離とピアソン相関の関係

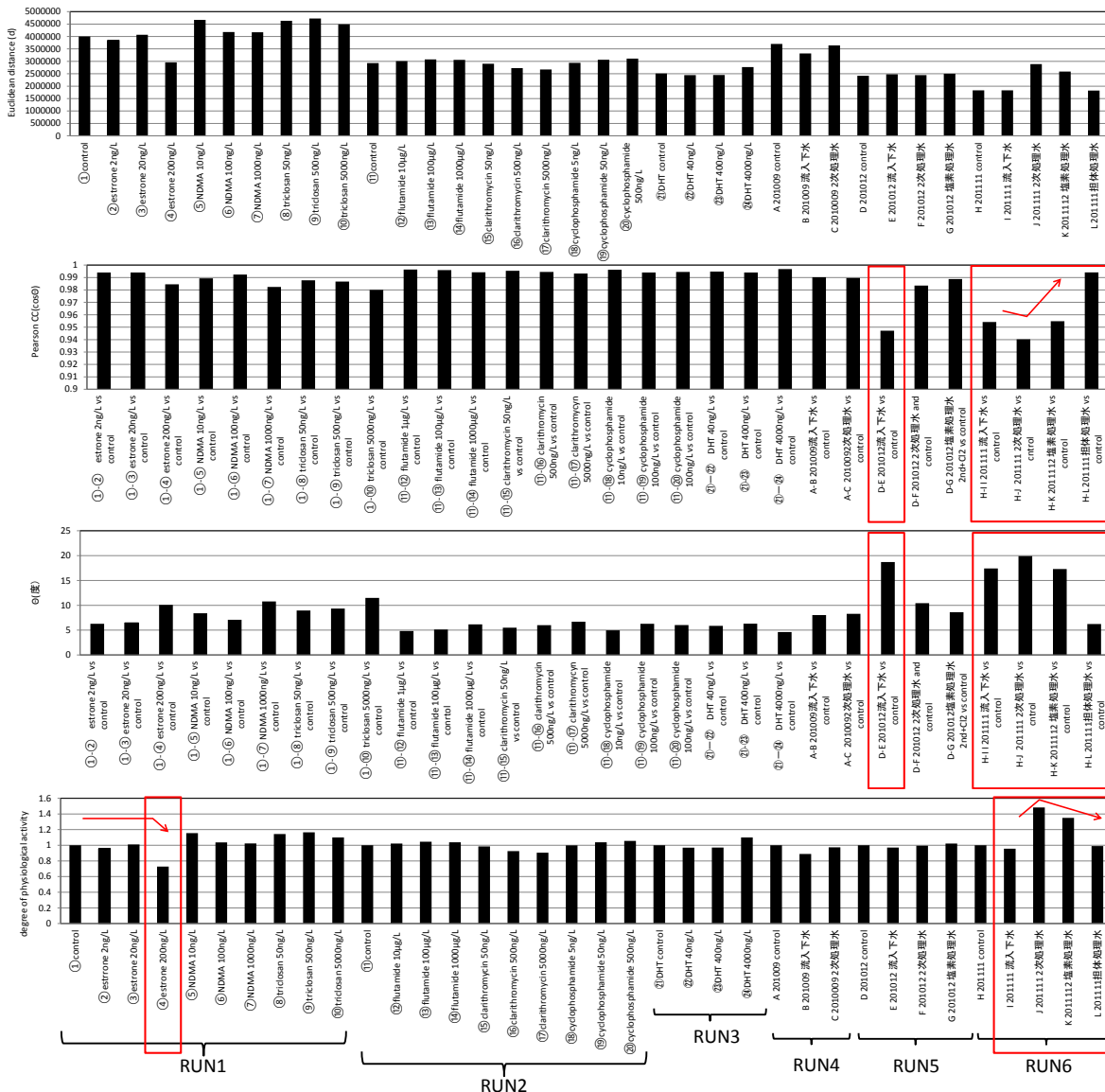


図-65 脳での化学物質、下水試料曝露区のユークリッド距離(d)、ピアソン相関係数、 θ 、生理活性度

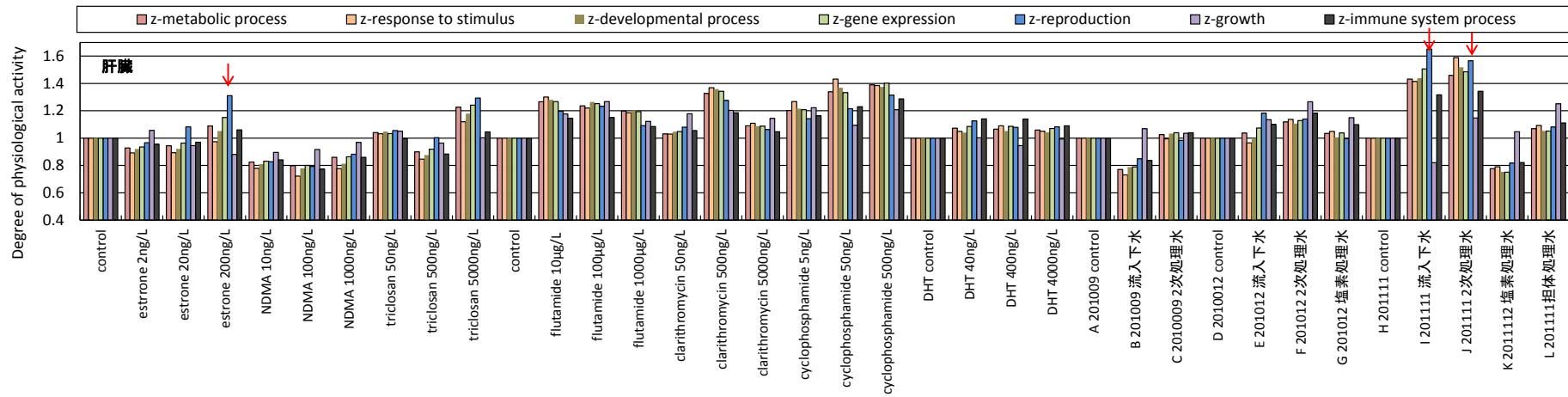


図-61 肝臓での機能別遺伝子セットによる化学物質、下水試料曝露区の生理活性度

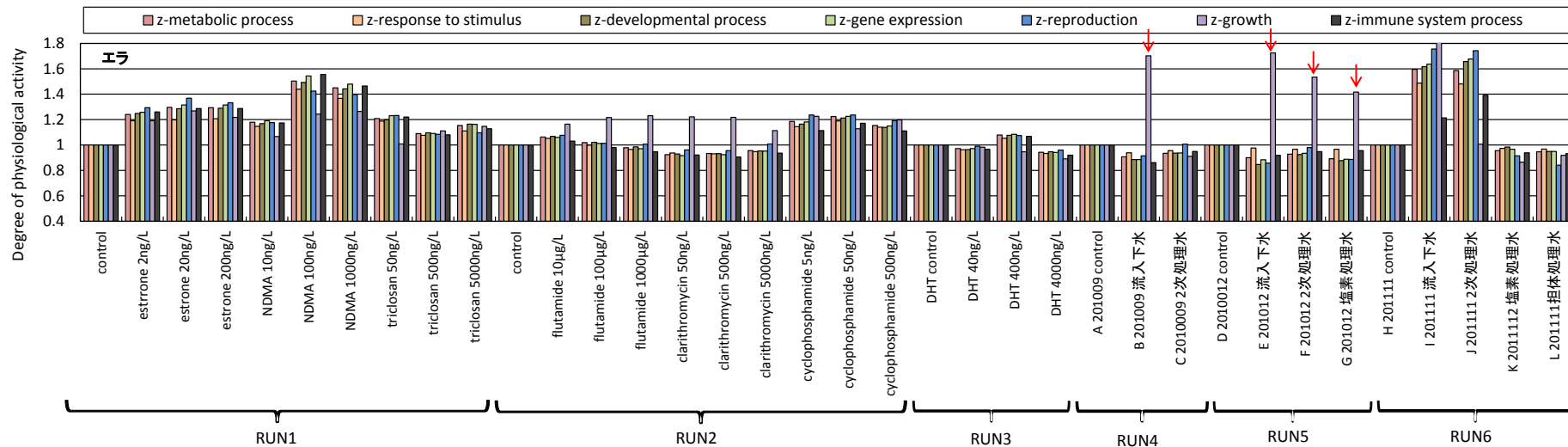


図-62 エラでの機能別遺伝子セットによる化学物質、下水試料曝露区の生理活性度

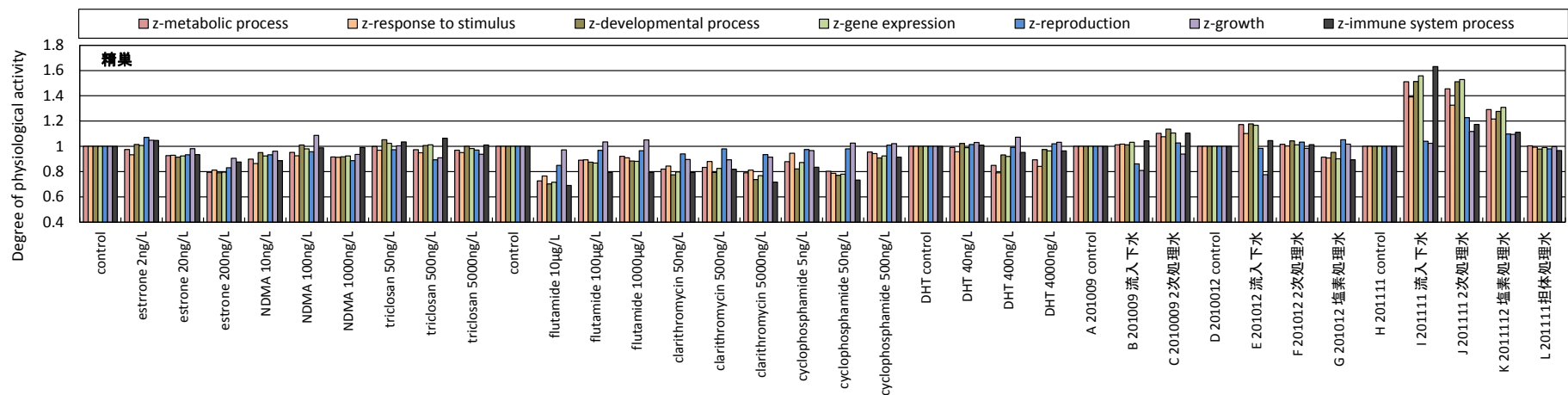


図-63 精巣での機能別遺伝子セットによる化学物質、下水試料曝露区の生理活性度

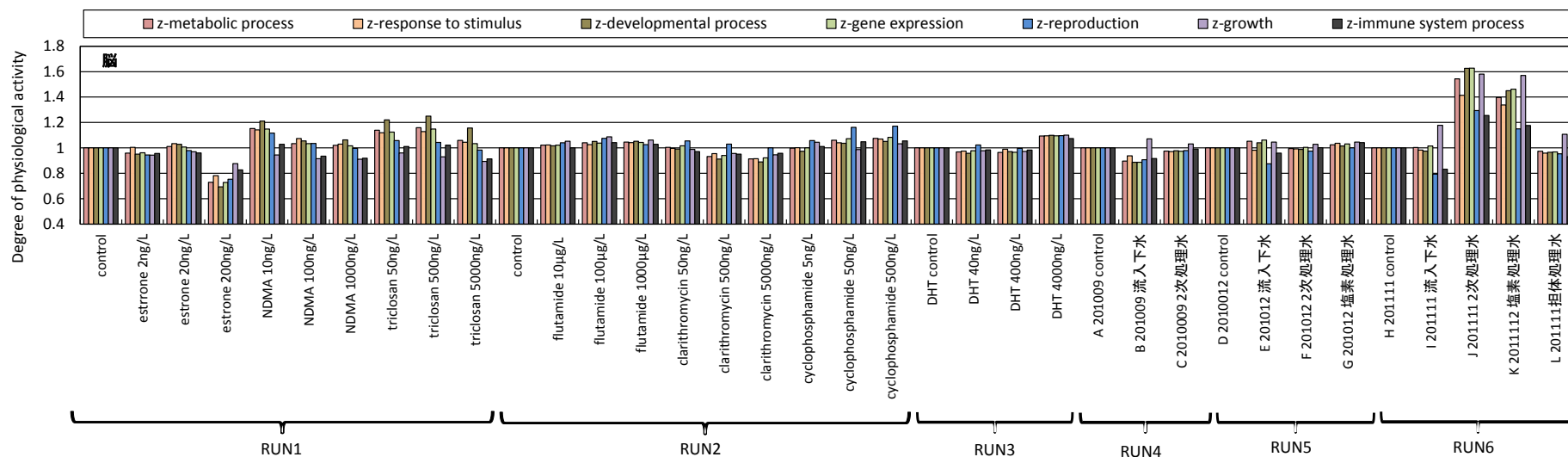


図-64 脳での機能別遺伝子セットによる化学物質、下水試料曝露区の生理活性度

は、濃度の上昇に従い、生理活性度が低下する傾向がみられた。図-63,64,65 は脳の結果である。下水試料曝露区では肝臓、エラ、精巣と同様の結果を示した。エストロン曝露区では、高濃度曝露区で、生理活性度が低下する傾向がみられた。

以上は全遺伝子セットによる解析であるが、より生物影響を明確にするため、遺伝子を生物機能毎にグルーピングした遺伝子セットを用いて、ユークリッド距離とピアソン相関係数から、生理活性度を算出した。遺伝子のグルーピングは、geneontology 情報の biological process1 階層目でグルーピングした。グループは、代謝プロセス (metabolic process)、刺激反応 (response to stimulation)、発達プロセス (developmental process)、遺伝子発現 (gene expression)、再生産 (reproduction)、生長 (growth)、免疫システムプロセス (immune system process) である。

図-66~69 は、上記グループの遺伝子セットを用いて、生理活性度を算出した結果である。図-66 は肝臓の結果であるが、201111 に着目すると、流入下水、2次処理水では、metabolic process, response to stimulation, developmental process, reproduction, immune system process が1より高い値となり影響を受けていることがわかる。reproduction はエストロン高濃度区でも、影響がみられている。処理レベルが高度化するに従い影響は低減していることがわかる。図-67 はエラの結果であるが、流入下水曝露区では、growth への影響がみられたが、処理レベルの高度化ともに影響は減少していた。精巣、脳では、グループ間での顕著な違いはみられなかった。以上、統計解析手法による毒性評価からも、下水処理レベルの高度化により、毒性影響が低減することがわかった。

5. おわりに

本研究では下水処理水に含まれる毒性影響を迅速検出するため、マイクロアレイによる遺伝子発現解析手法の適用を試み、以下の順序で研究を進めた。

1. メダカマイクロアレイの設計と作成
2. 化学物質濃度と臓器 (肝臓、エラ、精巣、脳) 毎の遺伝子発現プロファイルの取得
3. 下水試料に曝露したメダカのマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの取得
4. マーカー候補遺伝子の抽出と統計解析手法を

用いた下水処理水の毒性評価

本研究成果は以下のとおりである。

- (1) 約 4 万種類の遺伝子を搭載したメダカマイクロアレイの設計と作成を行った。各遺伝子の機能情報も収集した。
- (2) 女性ホルモン、抗男性ホルモン、男性ホルモン、発がん性物質、殺菌剤、抗生物質、抗がん剤に曝露したメダカの肝臓、エラ、精巣、脳の結果の遺伝子発現プロファイルの取得を行った。
- (3) 流入下水、2次処理水、塩素処理水、担体処理水に曝露したメダカの遺伝子発現プロファイルの取得を行った。
- (4) 化学物質曝露と下水試料曝露時の遺伝子発現プロファイルを用いて各物質のマーカー候補遺伝子の抽出を行った。
- (5) 下水試料曝露時のマーカー候補遺伝子の遺伝子発現の変化から、流入下水の生物影響は、女性ホルモンの影響が大きいことがわかった。処理レベルの高度化に従いこの影響は低減されることがわかった。
- (6) 遺伝子セットを用いた統計解析から、流入下水に含まれる毒性は、処理レベルの高度化に従い、低下することがわかった。

参考文献

- 1) 澤井淳 他(2009),都市河川水に曝露されたメダカの遺伝子発現解析,第43回水環境学会年会講演集,186
- 2) 澤井淳 他(2009),仔魚期からの下水処理水の長期間曝露が雄メダカ精巣に及ぼす影響,第12回環境ホルモン学会,157
- 3) Kkomori et al.(2004), Analysis and occurrence of estrogen in waste water in japan, Water Science and Technology, 50, 5, 93-100.
- 4) M Krauss,(2009), Occurrence and removal of N-nitrosamines in wastewater treatment plants, Water Research, 43,17,4381-4391
- 5) R.U.Halden et al.(2005),Co-Occurrence of triclocarban and triclosan in U.S water resource, Environ. Sci. Technol. 39,6,1420-1426
- 6) Daniel Stalter et al.(2011), Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity Water Research, 45, 3, 1015-1024
- 7) Ghosh GC(2009), Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in japan and their effects on bacteria ammonia oxidation, Water Science and Technology, 59,4 779-786
- 8) T.Steger-Hartmann(1997)Biological Degradation of Cyclophosphamide and Its Occurrence in sewage water, Ecotoxicology and Environmental safety, 36, 2,174-179
- 9) Lucy A. Kirk et al. (2002), Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works, Environmental Toxicology and Chemistry, 21, 5, 972-979
- 10) Kishi, K., Kitagawa, E., Iwahashi, H., Suzuki, K., Hayashi, Y.(2008). Medaka DNA Microarray: A Tool for Evaluating physiological Impacts of Various Toxicants, Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Biological Responses to Chemical Pollutants, 143-154

Study on Toxicity Evaluation of Treated Sewage Using Biological Response of Aquatic Organisms

Budget: Grants for operating expenses (General Account)

Research Period: FY2010-2012

Research Team: Water Environment Research Group (Water Quality)

Authors: IKEDA Shigeru, SUZUKI Yutaka, KITAMURA Tomokazu

Abstract:

We attempted to apply gene expression analysis by microarray to rapidly assess the toxicity of treated sewage. In this study, a medaka microarray was designed on the basis of a public gene expression database, and annotation information was added to each gene. Medaka were exposed to seven model substances (estrone, triclosan, N-nitrosamine, flutamide, clarithromycin, cyclophosphamide and dihydrotestosterone) and sewage samples (wastewater influent, secondary effluent, chlorinated water following secondary treatment, and carrier treated water following secondary treatment), and the gene expression profile of the organs (liver, gill testis and brain) was acquired. The toxicity of each sewage sample was evaluated based on the gene expression intensity of a marker gene and statistical analysis. As a result, the toxicity of untreated sewage was reduced by the sewage treatment process.

Key words: medaka, microarray, gene expression, treated sewage, toxicity