

レポータージーンアッセイを用いた再生水の安全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 25～平 27

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：岡本誠一郎、北村友一

【要旨】

下水処理過程でのエストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン、抗エストロゲン、抗アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性の流入実態と低減効果を明らかにするため、流入下水、活性汚泥処理水、微生物保持担体処理水中のこれらのホルモン様活性値を測定した。その結果、流入下水では、エストロゲン、アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性が検出された。二次処理水では、エストロゲン様活性が微量であるが検出された。活性汚泥処理でエストロゲン、アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性は低下することがわかったが、エストロゲン様活性は、活性汚泥処理後も残存する可能性があった。微生物保持担体処理水では、エストロゲン様活性は検出されなかった。

キーワード：レポータージーンアッセイ、メダカ、下水処理水、遺伝子発現解析

1. はじめに

下水処理水が放流先の水環境に与える影響の把握や下水を起源とする再生水の安全性の評価のためには、水中に存在する個別の化学物質の実態把握だけでなく、水が水生生物に与える影響を把握する視点も有効であると考えられることから、それぞれの評価法の開発、実態把握、リスク評価に関する研究が進められている。これまで、下水処理水の魚類に対する影響は、下水処理水への魚類の直接曝露試験により調査されてきた。その結果、下水処理水中に女性ホルモン（エストロゲン）が残存している場合、魚類に雌性化影響を与えることが明らかになってきた。下水処理水への魚類の直接曝露法は説得力があり有用な方法であるが、生殖腺の組織観察、マーカー蛋白質や遺伝子発現が指標とされ、試験に要する時間・労力や試験生物のと殺が必要となることから、簡易モニタリングへの適用が困難であり、動物愛護上の問題も発生する。

ここ数年、エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン様活性などを試験管内で評価できるレポータージーンアッセイの開発が進んでおり、レポータージーンアッセイは排水を対象とした評価にも有望¹⁾であると考えられる。

レポータージーンアッセイを下水処理水の安全性評価に利用するためには、下水試料への適用方法（濃縮方法、固相抽出条件）の最適化や実験動物の応答との関係解明が必要となる。

本研究では、実下水試料を用いて、レポータージーンアッセイによる下水試料に含まれるエス

トロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン、抗エストロゲン、抗アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性の測定を行い、これらのホルモン様活性の実態と下水処理過程での低減効果を評価した。さらに、レポータージーンアッセイとメダカの *in vivo* での遺伝子発現との比較も行った。

2. 実験方法

2.1 下水処理実験装置の運転

下水処理実験装置の概要を図-1 に示す。下水処理実験装置は、最初沈殿池（500L）、生物反応槽（500L×4 槽）、最終沈殿池（700L）、担体処理槽（10L×4 槽）から構成されている。

流入下水は、分流式下水道として整備され主に生活排水が流入する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、標準活性汚泥法による処理を行った。水理的滞留時間（HRT）は、7 時間となるように流入水量を制御した。担体処理槽では、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（φ 5mm, 長さ 5mm, 厚さ 1mm）を充填し、水理的滞留時間 2 時間で活性汚泥処理水を処理した。流入下水、二次処理水、担体処理水を H25 年 10 月 23～24 日および H26 年 11 月 5～6 日に微量ポンプを用いて 24 時間連続採水を行い、本試料をレポータージーンアッセイに供した。

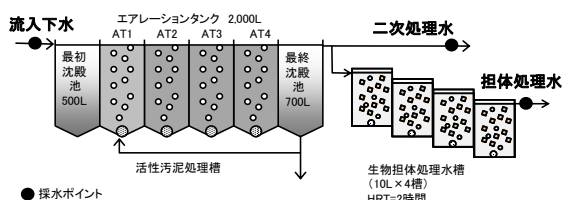


図-1 下水処理実験装置の概要

2.2 下水試料の固相抽出方法

固相抽出の条件は以下のとおりとした。

(1) 固相の種類

固相種類：Oasis HLB Vac cartridge (Waters社製)

カートリッジ容量：6 cc

充填剤重量：500 mg

充填剤粒径：60 μm

(2) コンディショニング

① ジクロロメタン/メタノール (1:1) 10mL

② メタノール 10 mL

③ 純水 20 mL

(3) 通水

通水量：1 L

通水速度：10 mL/min

(4) 脱水

吸引および遠心分離 (3,500 rpm、5 min) による脱水

(5) 溶出

① メタノール 10 mL

② ジクロロメタン/メタノール (1:1) 10 mL

(6) 乾固

窒素気流を吹き付け、40 $^{\circ}\text{C}$ に加温しながら乾固、乾固後、DMSO 50 μL で再溶解させ、メタノール画分とジクロロメタン/メタノール画分の DMSO 溶液を混合し、10,000 倍濃縮試料 100 μL を調製。

2.3 レポーター遺伝子アッセイ方法

レポーター遺伝子アッセイの方法は以下のとおりとした。

(1) 受容体の種類

検出するホルモン様活性は、エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン、抗エストロゲン、抗アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性とし、以下のメダカ受容体を用いた。

- ・メダカエストロゲン受容体 α (ER α)
- ・メダカアンドロゲン受容体 β (AR β)
- ・メダカ甲状腺ホルモン受容体 β (TR β)

(2) リファレンス物質

リファレンス物質は、以下のとおりとした。

- ・ER α : 17 β -エストラジオール (E2)
- ・抗 ER α : 4-ヒドロキシタモキシフェン (4OHT)
- ・AR β : 11-ケトテストステロン (11KT)
- ・抗 AR β : 2-ヒドロキシフルタミド (2OHF)
- ・TR β : トリヨード-Lチロニン (T3)
- ・抗 TR β : Thyroid hormone receptor antagonist, 1-850 (1-850)

(3) ER α レポーター遺伝子アッセイの方法

(3)-1 細胞の播種

96 穴マイクロプレートにヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞を 1.4×10^4 cells/well となるよう播種し、24 時間培養した。

(3)-2 ベクターの細胞導入

メダカの ER α を発現するベクター、ER 応答エレメントをホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだベクター ERE-TK-Luc および恒常的にウミシイタケルシフェラーゼが発現する内部標準ベクター pRL-TK-RLuc を導入した。導入試薬は FuGENE 6 (プロメガ社) を用いた。

(3)-3 リファレンス物質と被験試料の添加

ベクターの導入 4 時間後に任意に濃縮倍率を調整したリファレンス物質および被験試料を添加した。このとき、DMSO の最終濃度は 0.1% とした。また、DMSO を最終濃度 0.1% で添加する陰性対照区を設けた。

(3)-4 発光強度の測定

リファレンス物質および被験試料の添加後、CO₂ インキュベータ内で 40 時間静置培養した。培養完了後、細胞を溶解し、基質を添加してホタル及びウミシイタケルシフェリンの発光強度を Dual-Luciferase Assay System (プロメガ社) を用いてルミノメーターで測定し、相対発光強度 (ホタル/ウミシイタケ) を算出した。

(3)-5 転写活性化倍率の算出

被験試料の濃度区の相対発光強度を、陰性対照区の相対発光強度の平均値で除した転写活性化倍率を算出した。

(4) 抗 ER α レポーター遺伝子アッセイの方法

(4)-1 細胞の播種

(3)-1 と同様に操作した。

(4)-2 ベクターの細胞導入

(3)-2 と同様に操作した。

(4)-3 E2、リファレンス物質および被験試料の添加

ベクターの導入 4 時間後に、最終濃度が 2×10^{-10} M となるように E2 の DMSO 溶液を添加した後、任意に濃縮倍率を調整したリファレンス物質および被験試料を添加した。DMSO の最終濃度は 0.2% とした。また、DMSO を最終濃度 0.2%

で添加する陰性対照区を設けた。

(4)-4 発光強度の測定

(3)-4 と同様に操作した。

(4)-5 転写活性化倍率の算出

(3)-5 と同様に操作した。

(5) AR β レポーター遺伝子アッセイの方法

(5)-1 細胞の播種

96 穴マイクロプレートにヒト肝がん細胞由来の HepG2 細胞を 1.4×10^4 cells/well となるよう播種し、24 時間培養した。

(5)-2 ベクターの細胞導入

メダカの AR β を発現するベクター、AR 応答エレメントを持つ MMTV プロモーターをホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだベクター MMTV-Luc および恒常的にウミシイタケルシフェラーゼが発現する内部標準ベクター pRL-TK-RLuc を導入した。

(5)-3 リファレンス物質と被験試料の添加

(3)-3 と同様に操作した。

(5)-4 発光強度の測定

(3)-4 と同様に操作した。

(5)-5 転写活性化倍率の算出

(3)-5 と同様に操作した。

(6) 抗 AR β レポーター遺伝子アッセイの方法

(6)-1 細胞の播種

(5)-1 と同様に操作した。

(6)-2 ベクターの細胞導入

(5)-2 と同様に操作した。

(6)-3 11KT、リファレンス物質および被験試料の添加

ベクターの導入 4 時間後に、最終濃度が 1×10^{-8} M となるように 11KT の DMSO 溶液を添加した後、任意に濃縮倍率を調整したリファレンス物質および被験試料を添加した。DMSO の最終濃度は 0.2% とした。また、DMSO を最終濃度 0.2% で添加する陰性対照区を設けた。

(6)-4 発光強度の測定

(3)-4 と同様に操作した。

(6)-5 転写活性化倍率の算出

(3)-5 と同様に操作した。

(7) TR β レポーター遺伝子アッセイの方法

(7)-1 細胞の播種

(3)-1 と同様に操作した。

(7)-2 ベクターの細胞導入

メダカの TR β を発現するベクター、TR 応答エレメントをホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだベクター TRE-minP-Luc および恒常的にウミシイタケルシフェラーゼが発現する内部標準ベクター pRL-TK-RLuc を導入した。

(7)-3 リファレンス物質と被験試料の添加

(3)-3 と同様に操作した。

(7)-4 発光強度の測定

(3)-4 と同様に操作した。

(7)-5 転写活性化倍率の算出

(3)-5 と同様に操作した。

(8) 抗 TR β レポーター遺伝子アッセイの方法

(8)-1 細胞の播種

(3)-1 と同様に操作した。

(8)-2 ベクターの細胞導入

(7)-2 と同様に操作した。

(8)-3 T3、リファレンス物質および被験試料の添加

ベクターの導入 4 時間後に、最終濃度が 5×10^{-9} M となるように T3 の DMSO 溶液を添加した後、任意に濃縮倍率を調整したリファレンス物質および被験試料を添加した。DMSO の最終濃度は 0.2% とする。また、DMSO を最終濃度 0.2% で添加する陰性対照区を設けた。

(8)-4 発光強度の測定

(3)-4 と同様に操作した。

(8)-5 転写活性化倍率の算出

(3)-5 と同様に操作した。

2.4 データ解析の方法

(1) ホルモン受容体レポーター遺伝子アッセイ結果の解析

(1)-1 EC₅₀ または PC₁₀ の算出

解析ソフト GraphPad Prism (GraphPad Software 社) を用いて、3-parameter の非線形回帰モデルにより最大活性値の 50% の転写活性を示す濃度 (EC₅₀) を算出した。

EC₅₀ が試験最高濃度よりも高濃度となった場合は、リファレンス物質の最大転写活性の 10% 値を挟む 2 点の転写活性化倍率を用いて直線回帰により陽性対照物質の最大転写活性値の 10% の転写活性を示す濃度 (PC₁₀) を算出した。

試験濃度範囲において試料の転写活性化倍率に陰性対照区と比較して主に Dunnet のパラメトリック検定で有意 ($p < 0.05$) な上昇が認められなかった場合、または、最高試験濃度における転写活性化倍率がリファレンス物質の試験から得られた最大転写活性の 10% 値を超えなかった場合は、被験試料は試験濃度範囲において試験対象としたホルモン受容体に対する転写活性化が認められないと結論した。

(1)-2 ホルモン様活性値の算出

EC₅₀ または PC₁₀ が得られた被験試料については、それらのリファレンス物質 (E2、11KT、T3) の EC₅₀ または PC₁₀ で除して各ホルモン様活性値を算出した。

(2) 抗ホルモン受容体レポータージーンアッセイ結果の解析

(2)-1 IC₅₀またはlinIC₃₀の算出

リファレンス物質(4OHT、2OHFおよび1-850)について、解析ソフト GraphPad Prism (GraphPad Software 社)を用いて、3-parameter の非線形回帰モデルにより最大転写活性が 50%阻害を示す濃度 (IC₅₀) を算出した。

IC₅₀ が試験最高濃度より高濃度となった場合は、リファレンス物質の最大転写活性化倍率の 70%値を挟む 2 点の転写活性化倍率を用いて直線回帰により陽性物質の転写活性を 30%阻害する濃度 (linIC₃₀) を算出した。

試験濃度範囲において転写活性化倍率が陰性対照区と比較して主に Dunnet のパラメトリック検定で有意 (p<0.05) な低下が認められなかった場合、または、最高試験濃度における転写活性化倍率がリファレンス物質の 70%値を超えている場合は、被験試料は試験濃度範囲において試験対象としたホルモン受容体に対する転写活性化阻害が認められないと結論した。

(2)-2 ホルモン様活性値の算出

IC₅₀ 又は linIC₃₀ が得られた被験試料については、それらのリファレンス物質 (4OHT、2OHF、1-850) の IC₅₀ または linIC₃₀ で除して各ホルモン様活性値を算出した。

3. 結果および考察

3.1 ホルモン受容体レポータージーンアッセイ

(1) 転写活性化倍率

H25 年度調査の流入下水、二次処理水、担体処理水、脱塩素水道水について、メダカの ER α 、AR β および TR β レポータージーンアッセイの転写活性化倍率と被験試料の濃縮倍率との関係を表す用量反応曲線を、それぞれ図-2、図-3 および図-4 に示す。図には陽性コントロール (E2、11KT、T3) の結果も示した。

(2) EC₅₀、PC₁₀ およびホルモン様活性値の算出

被験試料およびリファレンス物質について、メダカの ER α 、AR β および TR β レポータージーンアッセイで得られた転写活性化倍率から算出した、EC₅₀ または PC₁₀ 値および各ホルモン様活性値をそれぞれ表-1 に示した。

ER α レポータージーンアッセイにおける EC₅₀ は、流入下水についてのみ算出され、1.73 であった。このとき、E2 の EC₅₀ は 7.18×10^{-10} M (logEC₅₀: -9.14) であった。PC₁₀ は流入下水および二次処理水について算出され、それぞれ 0.63

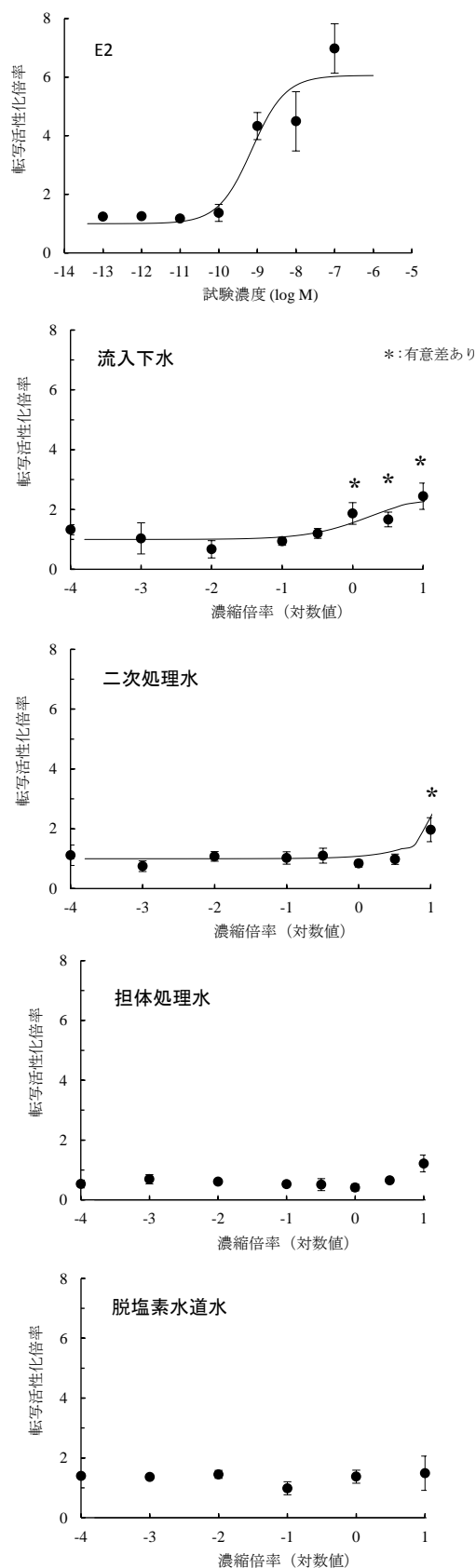


図-2 各下水試料の ER α の転写活性化倍率

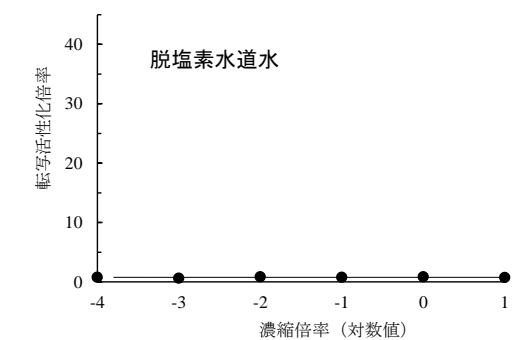
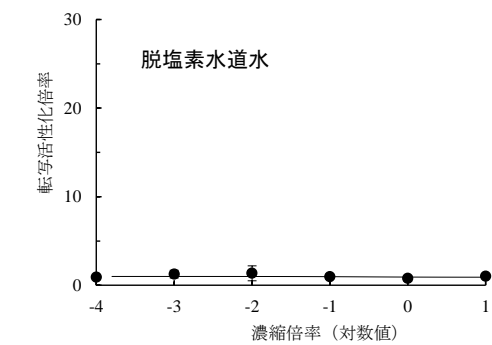
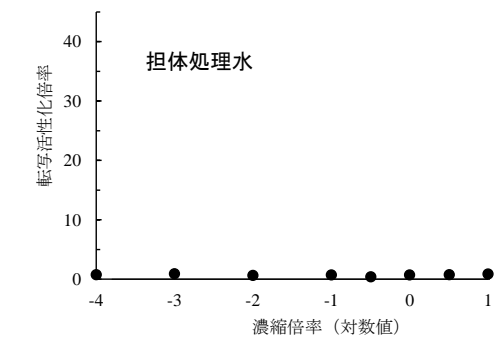
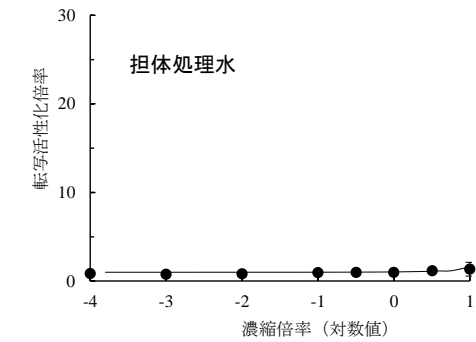
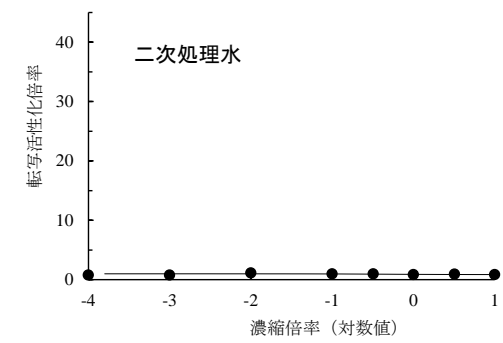
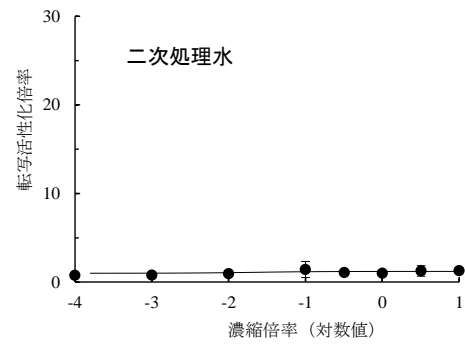
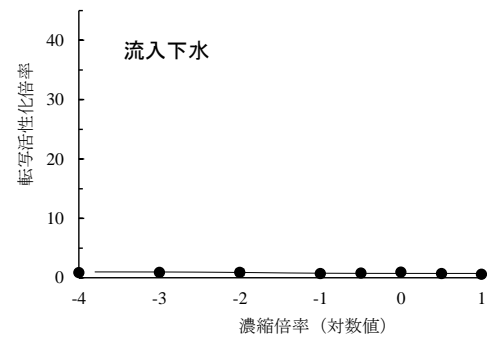
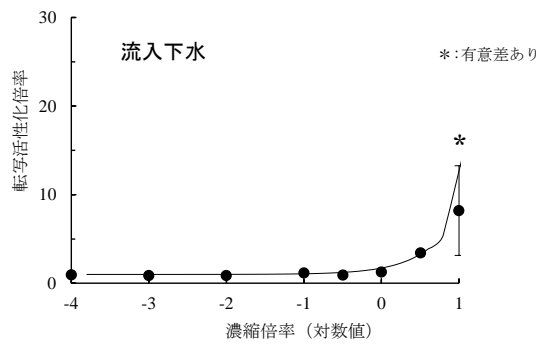
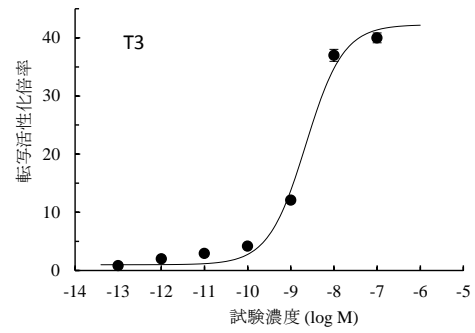
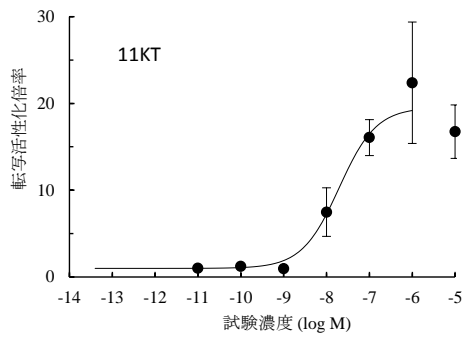


図-3 各下水試料の ARβ の転写活性化倍率

図-4 各下水試料の TRβ の転写活性化倍率

および 6.51 であった。このとき、E2 の PC₁₀ は 1.20×10^{-10} M であった。担体処理水および脱塩素水道水についてはエストロゲン受容体の転写活性は認められなかった。

AR β レポータージーンアッセイにおける PC₁₀ は、流入下水について算出され、2.03 であった。このとき、11KT の PC₁₀ は 1.77×10^{-9} M であった。二次処理水、担体処理水および脱塩素水道水についてはアンドロゲン受容体の転写活性が認められなかった。

TR β レポータージーンアッセイにおいては、すべての被験試料について甲状腺ホルモン受容体の転写活性は認められなかった。

流入下水および二次処理水のエストロゲン様活性値は、EC₅₀、PC₁₀ 値を用いて算出した結果、それぞれ 20.1 および 5.0 ng-E2/L となった。担体処理水および脱塩素水道水については、エストロゲン受容体の転写活性が認められなかったため、エストロゲン様活性値は算出しなかった。

流入下水のアンドロゲン様活性値は、264 ng-11KT/L であった。二次処理水、担体処理水および脱塩素水道水については、アンドロゲン受容体の転写活性が認められなかったため、アンドロゲン様活性値は算出されなかった。

TR β レポータージーンアッセイでは、すべての被験試料について甲状腺ホルモン受容体の転写活性が認められなかったため、甲状腺ホルモン様活性値は算出しなかった。

表-1 エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン様活性値の結果 (H25 年度調査)

被験試料	EC ₅₀ (濃縮倍率)	PC ₁₀ (濃縮倍率)	エストロゲン様活性値	
			(M)	(ng-E2/L)
流入下水	1.73	0.63	7.36×10^{-11}	20.1
二次処理水	-	6.51	1.84×10^{-11}	5.0
担体処理水	na	na	n.d.	n.d.
脱塩素水道水	na	na	n.d.	n.d.
E2	7.18×10^{-10}	1.20×10^{-10}	-	-

被験試料	EC ₅₀ (濃縮倍率)	PC ₁₀ (濃縮倍率)	アンドロゲン様活性値	
			(M)	(ng-11KT/L)
流入下水	-	2.03	8.73×10^{-10}	264
二次処理水	na	na	n.d.	n.d.
担体処理水	na	na	n.d.	n.d.
脱塩素水道水	na	na	n.d.	n.d.
11KT	1.96×10^{-8}	1.77×10^{-9}	-	-

被験試料	EC ₅₀ (濃縮倍率)	PC ₁₀ (濃縮倍率)	甲状腺ホルモン様活性値	
			(M)	(ng-T3/L)
流入下水	na	na	n.d.	n.d.
二次処理水	na	na	n.d.	n.d.
担体処理水	na	na	n.d.	n.d.
脱塩素水道水	na	na	n.d.	n.d.
T3	2.23×10^{-9}	1.23×10^{-10}	-	-

na: 有意な転写活性なし, nd: 不検出

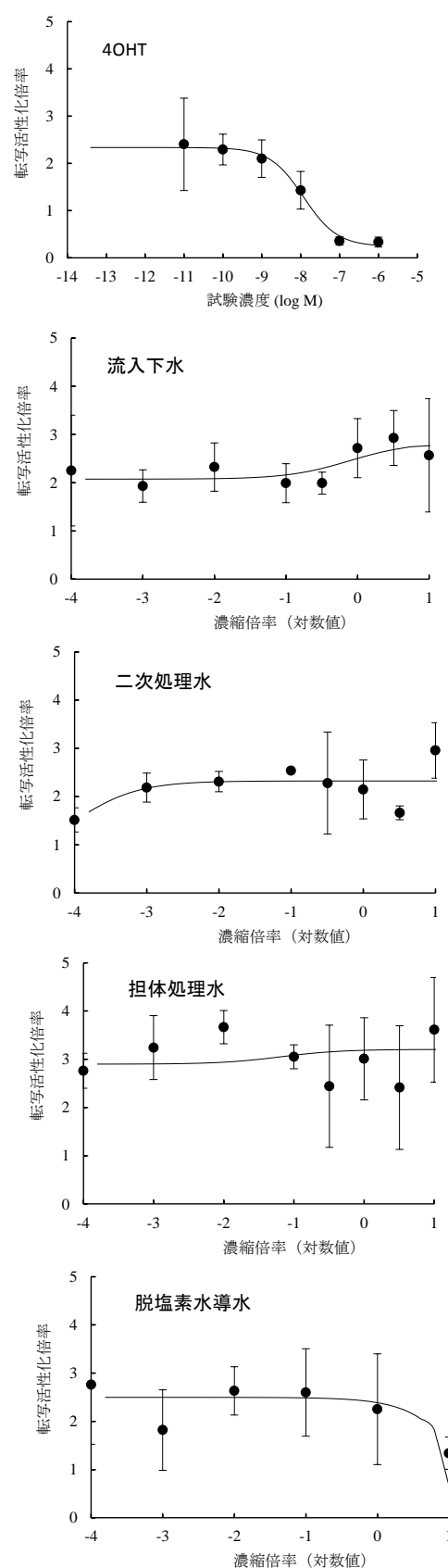


図-5 各下水試料の抗 ERα の転写活性化倍率

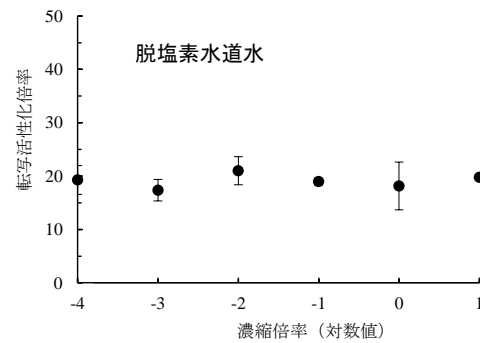
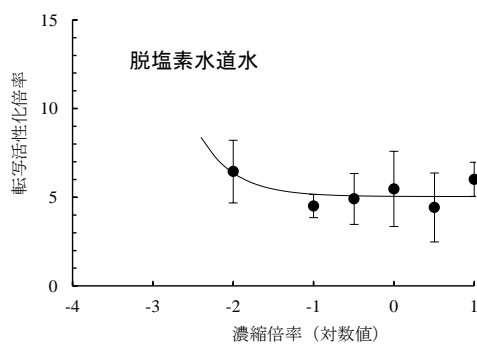
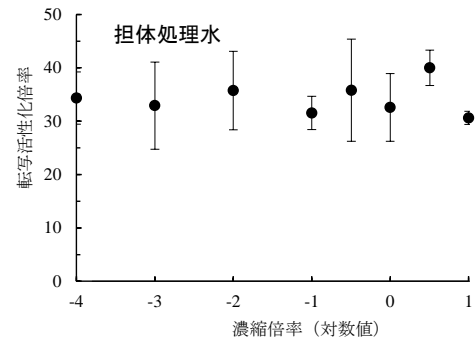
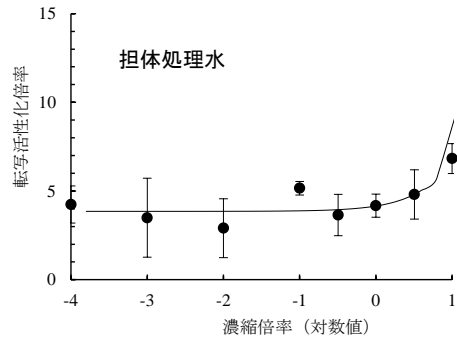
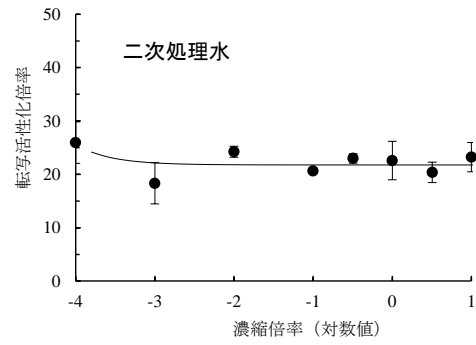
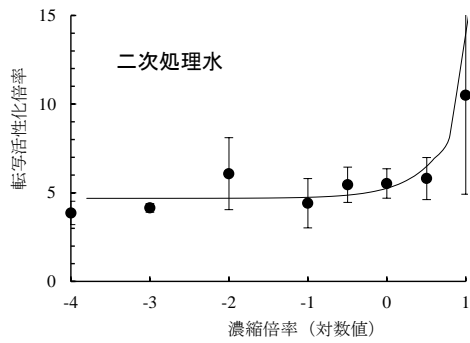
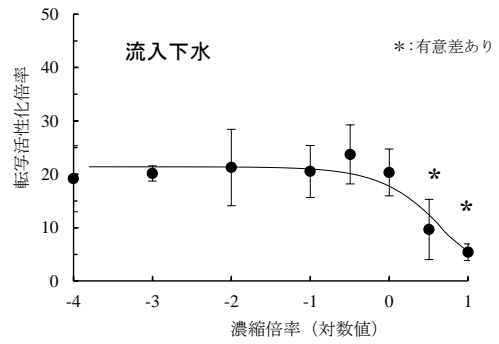
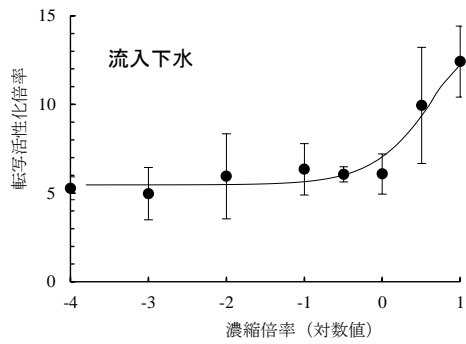
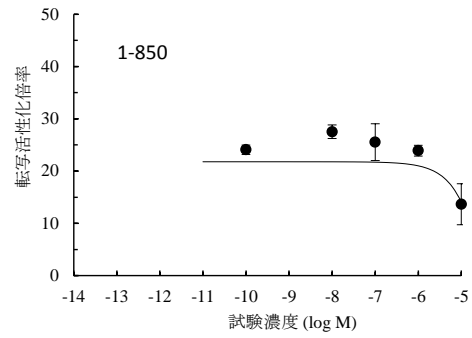
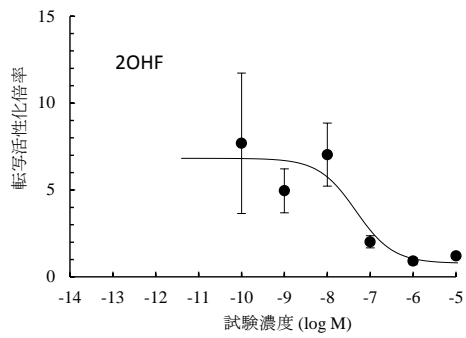


図-6 各下水試料の抗 ARβ の転写活性化倍率

図-7 各下水試料の抗 TRβ の転写活性化倍率

3.2 抗ホルモン受容体レポータージーンアッセイ

(1) 転写活性化倍率

H25 年度調査の流入下水、二次処理水、担体処理水、脱塩素水道水について、メダカの抗 ER α 、抗 AR β および抗 TR β レポータージーンアッセイの転写活性化倍率と被験試料の濃縮倍率との関係を表す用量反応曲線を、それぞれ図-5、図-6 および図-7 に示す。図には陽性コントロール (4OHT、2OHF、1-850) の結果も示した。

(2) IC₅₀、linIC₃₀ および各抗ホルモン様活性値の算出

被験試料およびリファレンス物質について、メダカの抗 ER α 、抗 AR β および抗 TR β レポータージーンアッセイで得られた転写活性化倍率から算出した。IC₅₀ または linIC₃₀ の値をそれぞれ表-2 に示した。

抗 ER α レポータージーンアッセイおよび抗 AR β レポータージーンアッセイにおいて、すべての被験試料について各ホルモン受容体の転写活性の阻害が認められなかった。抗 TR β レポータージーンアッセイにおいて、流入下水の linIC₃₀ は 2.04 となった。このとき 1-850 の linIC₃₀ は 9.71×10^{-6} M であった。

抗 ER α および抗 AR β レポータージーンアッセイにおいて、すべての被験試料について各ホルモン受容体の転写活性阻害が認められなかったため、各抗ホルモン様活性値は算出しなかった。

抗 TR β レポータージーンアッセイにおいて、流入下水の抗甲状腺ホルモン様活性値は 2.20×10^6 ng-1-850/L と算出された。

3.3 25 年度と 26 年度調査の結果の比較

図-8 は、H25 と H26 年度調査の各ホルモン様活性値の測定結果である。H25 と H26 とも同様の傾向を示し、流入下水では、エストロゲン、アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性が検出され、二次処理水では、エストロゲン様活性が微量に検出された。活性汚泥処理でエストロゲン、アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性は、低下していることがわかるが、エストロゲン様活性は、活性汚泥処理後も残存する可能性があった。担体処理後は、エストロゲン様活性は検出されなかった。担体処理は二次処理水に残存するエストロゲン様活性の低下に効果があることがわかった。

表-2 抗エストロゲン、抗アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性値の結果 (H25 年度調査)

被験試料	IC ₅₀ (濃縮倍率)	linIC ₃₀ (濃縮倍率)	抗エストロゲン様活性値	
			(M)	(ng-4OHT/L)
流入下水	na	na	n.d.	n.d.
二次処理水	na	na	n.d.	n.d.
担体処理水	na	na	n.d.	n.d.
脱塩素水道水	na	na	n.d.	n.d.
4OHT	1.19E-08	1.92E-09	-	-

被験試料	IC ₅₀ (濃縮倍率)	linIC ₃₀ (濃縮倍率)	抗アンドロゲン様活性値	
			(M)	(ng-2OHF/L)
流入下水	na	na	n.d.	n.d.
二次処理水	na	na	n.d.	n.d.
担体処理水	na	na	n.d.	n.d.
脱塩素水道水	na	na	n.d.	n.d.
2OHF	4.61E-08	2.61E-08	-	-

被験試料	IC ₅₀ (濃縮倍率)	linIC ₃₀ (濃縮倍率)	抗甲状腺ホルモン様活性値	
			(M)	(ng-1-850/L)
流入下水	-	2.04	4.75E-06	2.20E+06
二次処理水	na	na	n.d.	n.d.
担体処理水	na	na	n.d.	n.d.
脱塩素水道水	na	na	n.d.	n.d.
1-850	7.29E-01	9.71E-06	-	-

na: 有意な転写活性なし, nd: 不検出

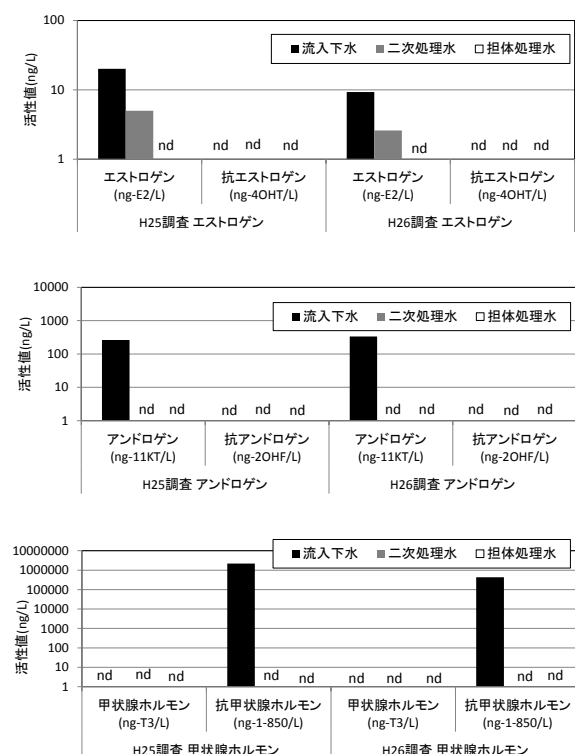


図-8 H25 年度の各ホルモン様活性値の測定結果

4. レポータージーンアッセイと実験動物の応答の比較

4.1 メダカ曝露試験と遺伝子発現解析の方法

レポータージーンアッセイを下水処理水の安全性評価に利用するためには、実際に動物で観察される生体影響と、レポータージーンアッセイでの影響の関係を把握する必要がある。そこで、メダカ成魚を3章で用いたホルモン、抗ホルモン物質と下水試料に曝露し、遺伝子発現解析を行った。表-3 は実施した試験の一覧である。雄メダカは17β-エストラジオール (E2; エストロゲン) および2-ヒドロキシフルタミド (flutamide; 抗アンドロゲン)、雌メダカは4-ヒドロキシタモキシフェン (4OHT; 抗エストロゲン) および11-ケトテストステロン (11KT; アンドロゲン) について曝露試験を実施した。対照区は雄と雌のどちらも脱塩素水道水とした。試験物質の濃度は、レポータージーンアッセイでの転写活性が低(数%)、中(約50%)、高(約90%)となる濃度とした。また、下水処理過程での内分泌かく乱作用の *in vivo* での低減効果を把握するため、図-1の活性汚泥処理実験装置から3章のレポータージーンアッセイに供したものと同時に採水(平成25年度)した流入下水、二次処理水、担体処理水で曝露試験を実施した。

表-4 はメダカ曝露試験の実施方法である。1曝露区あたり1個の水槽に試験水5Lとメダカ10匹を入れ、24時間おきに水を交換し、96時間まで曝露した。曝露終了後メダカを氷冷麻酔して1匹ずつ肝臓を摘出し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) でRNAを抽出した。RNA試料は3匹ずつ混合して1曝露区3検体とし、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析に供した。

表-3 実施したメダカ曝露試験の一覧

ホルモン・抗ホルモン物質曝露		下水曝露
試験① 平成25年10月	試験② 平成26年8月	試験③ 平成25年10月
雄メダカ ・対照区 ・E2_2.7ng/L ・E2_27ng/L ・E2_270ng/L	雄メダカ ・対照区 ・flutamide_1.5ng/L ・flutamide_15ng/L ・flutamide_150ng/L	雄メダカ ・対照区 ・流入下水 ・二次処理水 ・塩素処理水 ・担体処理水
雌メダカ ・対照区 ・4OHT_39ng/L ・4OHT_390ng/L ・4OHT_3900ng/L	雌メダカ ・対照区 ・11KT_1.5ng/L ・11KT_15ng/L ・11KT_150ng/L	雌メダカ ・対照区 ・流入下水 ・二次処理水 ・塩素処理水 ・担体処理水

表-4 メダカ曝露試験の実施条件

試験魚	d-rR系 ヒメダカ(6~7カ月齢)
曝露匹数	10匹/曝露区
曝露時間	96時間
曝露水量	5L
曝露方式	半止水式(1日1回全換水)
設定水温	24°C
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	同曝露区の3匹分を1つに混合(3検体)
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)
基準化法	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、3検体を平均

メダカの網羅的遺伝子発現解析は、Agilent製8×60Kのカスタムアレイとし、マイクロアレイ搭載遺伝子は、DFCI(Dana Farber Cancer Institute)のMedaka Gene Index(Release 8.0)のデータベースを基にe-Array(Agilentが提供しているプローブ配列設計ツール)でプローブ配列を設計したものである。マイクロアレイ搭載遺伝子の遺伝子名や機能情報は、相同性検索を用いて取得した。すなわち、プローブ設計の元となった塩基配列とメダカのRefseq mRNA配列を用いてBlastn検索を実施し、相同性が最も高い配列のRefseq ID, GeneSymbol, GeneNameを採用した。同じGeneSymbolを有する複数のプローブが搭載されていたため、データ解析にあたってE-valueが最小かつbit scoreが最大のプローブを選択し、1遺伝子1プローブとなるようにした。

内分泌かく乱作用は、性特異遺伝子群の遺伝子発現強度を指標とし、正常な雌メダカに対する各試験水に曝露したメダカの類似性で評価した。性特異遺伝子は、2回のホルモン物質曝露実験(平成25、26年度)の雄と雌メダカの遺伝子発現強度を用いて、正常雄(対照区雄6アレイの平均)と正常雌(対照区雌6アレイの平均)からの、以下の条件で抽出した。

表-5 メダカ性特異遺伝子の GeneSymbol の一覧

雄特異遺伝子 194個				雌特異遺伝子 223個			
a1cf	LOC101154824	LOC101168641	pdp1	1-sf	klhdc4	LOC101164843	LOC105358200
aacs	LOC101155010	LOC101169105	pgam2	(L-SF precursor)	kpnb1	LOC101164991	LOC105358402
abhd5	LOC101155377	LOC101169174	plekhg7	adamts1	lamp5	LOC101165016	lpgat1
acsl3	LOC101155834	LOC101169222	pmm1	adcyc6	lgi1	LOC101165161	lsm14a
acss3	LOC101155838	LOC101169597	ppp1r1b	ak1	LOC100049191	LOC101165371	mcm3
acy3	LOC101156099	LOC101169834	regg	arid3b	(choriogenin Hminor)	LOC101165454	mgat4d
adgrg4	LOC101156321	LOC101169984	ribp1	aspg	LOC100049343	LOC101165495	myc
agmo	LOC101156571	LOC101170076	sc5d	atf3	LOC100049432	LOC101166566	myo5c
anxa10	LOC101156812	LOC101170321	scn1b	b4gal1	(choriogenin H)	LOC101166704	naca
aptx	LOC101156814	LOC101170364	sfrp1	c-fos	LOC101154956	LOC101166732	nphp4
ar-alpha	LOC101157073	LOC101170495	sgk3	c22h14orf132	LOC101155383	LOC101166945	nr0b2
(androgen receptor)	LOC101157123	LOC101170853	slc16a12	c9h8orf4	LOC101155508	LOC101167064	nrxn
arf3	LOC101157186	LOC101170951	slc29a1	cacong1	LOC101155991	LOC101167235	oaz2
ass1	LOC101157281	LOC101171127	snai2	caskin1	LOC101156021	LOC101167359	ol-vit1(vitellogenin 1)
atg2a	(CYP27C1)	LOC101171385	spint1	ccdc51	LOC101156352	LOC101167367	pax6
bcar1	LOC101157407	LOC101171575	st6galnac2	ccna2	LOC101156858	LOC101167980	pchp3
c1r	LOC101157460	LOC101171753	synm	celsr2	LOC101156872	LOC101168136	pgap1
c22h14orf1	LOC101157497	LOC101171858	tcp11i2	cfap97	LOC101157031	LOC101168744	phe1
c5h1orf50	LOC101157715	LOC101172071	thrsp	chka	LOC101157175	LOC101168823	phldb3
ca7	LOC101158236	LOC101172107	tnr	chkb	LOC101157455	LOC101168919	ppp2r3b
camk2n2	LOC101158556	LOC101172412	tpi1	clstn1	LOC101157499	LOC101169478	prickle2
cf1	LOC101158874	LOC101172514	tyrp1	cpd	LOC101157638	LOC101169951	rad52
dax1	LOC101159064	LOC101172854	zbtb16	creld2	LOC101157792	LOC101170423	rad54b
ddah1	LOC101159074	LOC101172895	znf423	cygb1	LOC101157829	LOC101170539	rasl11a
dec1a	LOC101159663	LOC101172948	znf521	dap	LOC101157938	LOC101170597	rcn3
dio1	LOC101159757	LOC101174070		dnhd1	LOC101158054	LOC101171080	rdh13
dio2	LOC101160435	LOC101174102		drp2	LOC101158170	LOC101171578	rgs3
dlc1	LOC101160448	LOC101174137		dusp4	LOC101159061	LOC101171723	rps14
dmpk	LOC101160551	LOC101174367		edaradd	LOC101159180	LOC101171732	rtn1
dmy	LOC101160745	LOC101174392		esr1	LOC101159258	LOC101171797	s100b
eef2k	LOC101160785	LOC101175040		(estrogen receptor 1)	LOC101159847	LOC101171757	sec24d
elf4	LOC101160902	LOC105353580		f13b	LOC101160387	LOC101171806	shc4
emb	LOC101160922	LOC105354483		fabp7	LOC101160475	LOC101171895	slc12a4
fabp2	LOC101160952	LOC105355224		fam134b	LOC101160562	LOC101172427	slc13a1
fam167a	LOC101161278	LOC105355355		fam20a	LOC101160711	LOC101172685	slc22a17
fam184b	LOC101161531	LOC105355471		fat3	LOC101161140	LOC101172718	slc25a25
fasn	LOC101161554	LOC105355953		fign1	(vitellogenin-like)	LOC101172952	slc35g2
fbxo25	LOC101161624	LOC105356059		fmnl3	LOC101161342	LOC101172959	slc41a1
fdps	LOC101162630	LOC105356225		fnkc3b	LOC101161348	LOC101173001	slc41a2
foxn3	LOC101163042	LOC105356509		fosl1	LOC101161642	LOC101173070	slc6a2
gad1	LOC101163376	LOC105357121		fzd3	LOC101161734	LOC101173135	soat1
glrx	LOC101163746	LOC105358658		fzd9	LOC101161853	LOC101173201	socs3
golt1a	LOC101163973			gem	LOC101162182	LOC101173923	sox13
grk7	LOC101164058	lrk1		ggt1a	LOC101162344	LOC101174219	stra6
haus1	LOC101164719	map1lc3c		gldc	LOC101162592	LOC101174266	tbrg4
hes1	LOC101165163	mcf2		gna12	LOC101162606	LOC101174464	tenm2
hmger	LOC101165174	mcpb1		gnrh-r3	LOC101162837	LOC101174826	tle4
hmgcs1	LOC101165488	me1		gpr135	LOC101162842	LOC101174949	tmem136
hs3st1	LOC101165663	mid1ip1		hnf4g	LOC101163350	LOC101175275	tmem235
idi1	LOC101165729	mob3c		hoxc8	LOC101163485	LOC101175514	tmem255a
isyna1	LOC101166601	msmo1		id4	LOC101163524	LOC101175687	tnpo3
kalrn	LOC101167349	nog		ier2	LOC101164062	LOC105355368	tph2
kcna1	LOC101167732	nptx1		jarid2	LOC101164390	LOC105355535	txndc12
kctd14	LOC101167930	nsdhl		kazn	LOC101164404	LOC105355548	vit-6(vitellogenin II)
kif10	LOC101167981	olkklip		kfharr-2	LOC101164721	LOC105357295	vwc2
klhl24	LOC101168329	papln		kiaa1644	LOC101164744	LOC105357989	xbp1
lamb3	LOC101168495	pdlim2		kiaa1715	LOC101164756	LOC105358028	zmiz1

- ① 遺伝子発現強度が正常雄と比較して正常雌で2倍以上または1/2以下
- ② ウェルチのt検定から、正常雄と正常雌の対数変換した遺伝子発現強度の差が $p < 0.05$ で有意

表-5 は抽出されたメダカ性特異遺伝子の一覧である。雄で高発現の遺伝子は 194 個、雌で高発現の遺伝子は 223 個であった。図-9 は正常雄と正常雌の遺伝子発現強度の平均値のスクアッタープロットである。黒色プロットは雌、白色プロットは雄メダカ性特異遺伝子、灰色は雄雌共通の遺伝子を示す。

雌に対する類似性評価のための指標は、0(雄)から 1(雌)までの値で表現することが可能な Kishi ら²⁾のユークリッド距離 (d) とピアソン

● 雌特異遺伝子 ○ 雄特異遺伝子 ◐ 共通

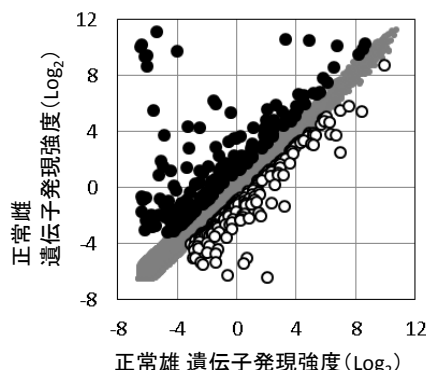


図-9 雄と雌メダカの性特異遺伝子の発現強度のスクアッタープロット

相関係数 (cos θ) を用いる feminization factor (以降、f factor) を用いた。図-10 は f factor の算出方法を、E2 曝露試験結果を例として示したものである。矢印の長さは遺伝子発現強度、角度は正常雌と曝露区の類似性を反映している。f factor は、雄メダカの場合は 1 に近づくほど、雌メダカの場合は 1 から離れるほど内分泌かく乱作用を強く受けていると判断される。

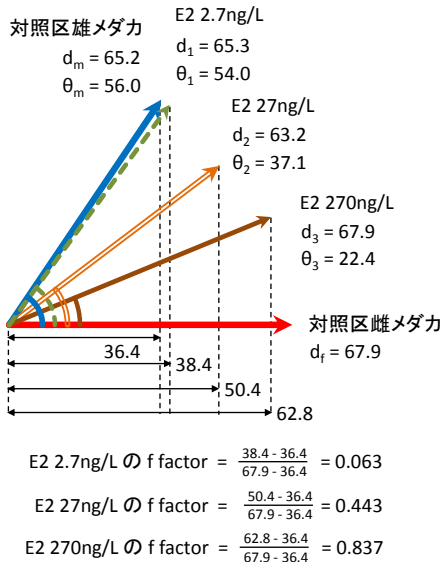


図-10 f factor の算出例

4.2 遺伝子発現解析の結果

図-11 は E2 および 4OHT 曝露区の f factor である。E2 曝露区の雄メダカの f factor は、曝露濃度が高くなるに従い、0.06 から 0.84 に上昇した。4OHT 曝露区の雌メダカの f factor は、曝露濃度によらずほぼ 1 であり、抗エストロゲン作用による影響はみられなかった。図-12 は flutamide および 11KT 曝露区の f factor である。flutamide 曝露区の雄メダカの f factor はほぼ 0 であり、抗アンドロゲン作用による影響はみられなかった。11KT 曝露区では、150ng/L で雌メダカの f factor が 0.82 まで少し低下した。抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲンのリファレンス物質が *in vivo* でのメダカ遺伝子発現に及ぼす影響は、レポーター遺伝子アッセイと比較すると小さくなることがわかった。

図-13 は、雄メダカの f factor について、下水処理過程での変化を示したものである。f factor は流入下水で最も高く、活性汚泥処理で低減し、担体処理水ではほぼ 0 となった。図-14 は、*in vivo* 雄メダカ下水曝露実験での遺伝子発現レベルと

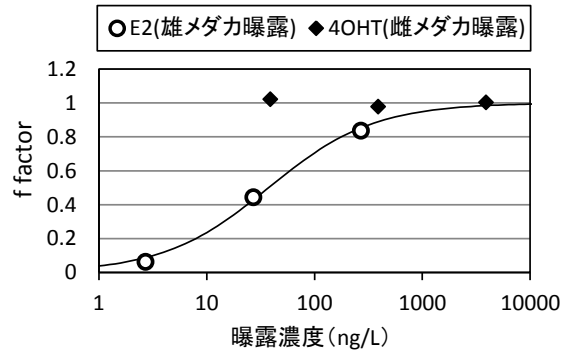


図-11 E2 および 4OHT 曝露区の f factor

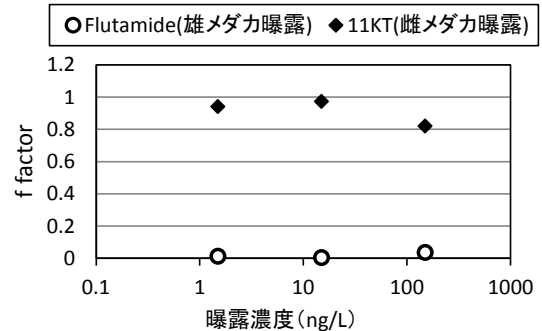


図-12 Flutamide および 11KT 曝露区の f factor

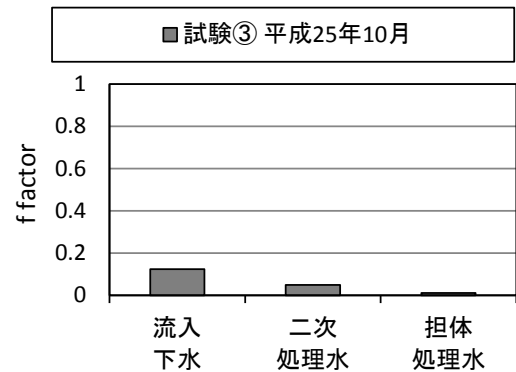


図-13 下水処理工程での雄メダカの f factor の変化

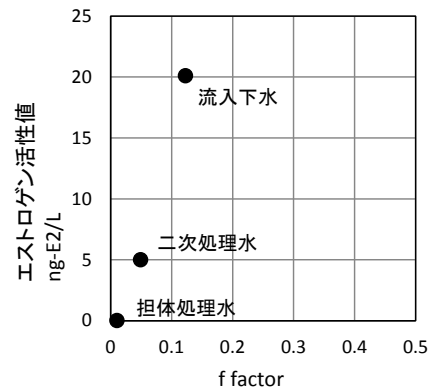


図-14 下水試料に曝露した雄メダカの f factor と、下水試料のエストロゲン活性値の関係

レポーター遺伝子アッセイの反応の関係で、x 軸は f factor、y 軸は ERf レポーター遺伝子アッセイでの転写活性の E2 換算値を表している。プロットは少ないものの、両者の関係は右肩上がりの関係がみられることから、メダカ曝露試験による下水処理水のエストロゲン作用の評価は、レポーター遺伝子アッセイで代替できる可能性があった。ただし、今後、データを積み重ねて、検証していく必要がある。

5. おわりに

下水処理過程でのエストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン、抗エストロゲン、抗アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性の流入実態と低減効果を明らかにするため、流入下水、活性汚泥二次処理水、微生物保持担体処理水中のこれらのホルモン様活性値を測定した。

その結果、流入下水では、エストロゲン、アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性が検出された。二次処理水では、エストロゲン様活性のみが微量であるが検出された。活性汚泥処理でエストロゲ

ン、アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性は低減されることがわかったが、エストロゲン様活性は、活性汚泥処理後も残存する可能性があった。担体処理水は、エストロゲン様活性は検出されなかった。

各ホルモン物質、下水試料を用いたメダカ曝露試験による遺伝子発現解析を行った結果、雄メダカへのエストロゲン作用の評価は、レポーター遺伝子アッセイで代替できる可能性があった。

参考文献

- 1) M. Ihara et. al. (2014), Environ. Sci. Technol., 48(11), 6366-6373.
- 2) Katsuyuki Kishi et. al., Expression analysis of sex-specific and 17-estradiol-responsive genes in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*, using oligonucleotide microarrays, Genomics, 88, pp.241-251, 2006.

Safety evaluation of reclaimed water using reporter gene assay

Budgeted : Grants for operating expenses (General account)

Research Period : FY2013-2015

Research Team : Water Environment Research Group
(Water Quality)

Author : OKAMOTO Seiichiro, KITAMURA tomokazu

Abstract

Estrogen, androgen, thyroid, anti-estrogen, anti-androgen and anti-thyroid hormone activity of raw sewage, activated sludge treated water and microbial carrier treated water were measured in order to clarify effect of decreasing of these hormone activity by sewage treatment process.

As the result, The estrogen, androgen and anti-thyroid hormone activity were detected from raw sewage. Only the estrogen hormone activity was detected a little from activated sludge treated water. The estrogen hormone activity was not detected from microbial carrier treated water.

Key words : reporter gene assay, medaka, reclaimed wastewater, gene expression