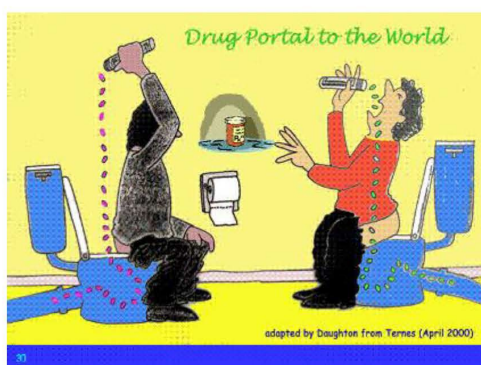


環境医薬品のメダカ 行動および繁殖に及ぼす影響



環境医薬品：環境中に放出された医薬品類

長江真樹（長崎大学・環境科学部）
（長崎大学・総合生産科学研究科）

御丁寧に御紹介いただきまして、ありがとうございました。ただいま御紹介いただきました、長崎大学環境科学部の長江でございます。本日は、このタイトル「環境医薬品のメダカ行動および繁殖に及ぼす影響」と題してお話しさせていただきます。まず初めに、このような発表の機会を与えていただきました環境省及びJANUSをはじめ関係者の皆様方にお礼申し上げます。

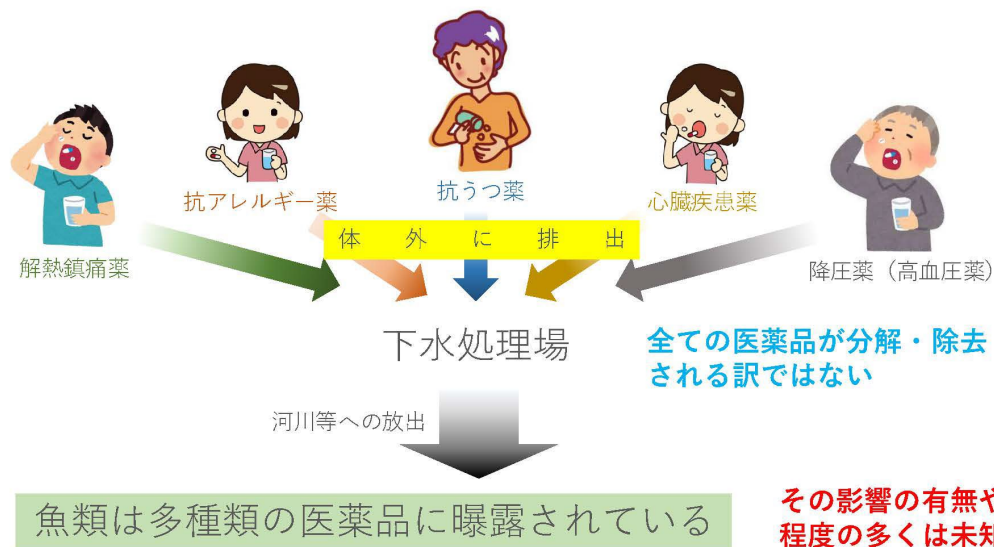
本日は、化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナーということで、「内分泌かく乱作用」がキーワードになってございます。私のタイトルにあります「環境医薬品」というのは、ここに説明がありますように、ヒトが使用して環境中に放出された医薬品類全てを指す言葉として我々は使用しておりますが、皆さん御存じのように例えばホルモン製剤も医薬品に含まれますが、これはまさにホルモンそのものでございます。

あるいは、医薬品の中にはヒトのホルモン、内分泌を調節するような薬も含まれておりますので、この医薬品の生物影響の問題というのは、内分泌かく乱作用も含んだ形で、かつ医薬品は本来生理活性が高い物質ですので、そういった生理活性も含有する生物に対する大きなインパクトを及ぼす物質という位置づけで考えておりまして、本日の「内分泌かく乱作用」というキーワードにも合致するものと考えております。

こちらの風刺画はイギリスの科学雑誌に掲載されたものですが、我々ヒトが化学物質あるいは医療の発展に伴って、その疾患の増大にも伴いまして多量の医薬品を環境中に放出しているという風刺画です。実際、これらヒトの医薬品が野生生物をはじめ生態系にどのような影響を及ぼすかというのはまだ研究がその端を発したばかりでして、不明な点が数多くございます。その観点から、我々はこの環境医薬品について、メダカを用いてこのタイトルにあります行動あるいは繁殖に医薬品がどのような影響を及ぼすかということを研究し始めて、その結果を一部得ましたので、ここに発表させていただきます。

研究背景

ヒトは極めて多種類の医薬品を服用している²

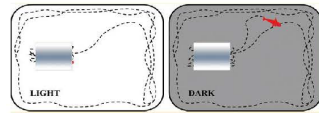


まず、何枚かのスライドを使って研究背景をお伝えしますが、ヒトは極めて多種類の医薬品を服用しています。

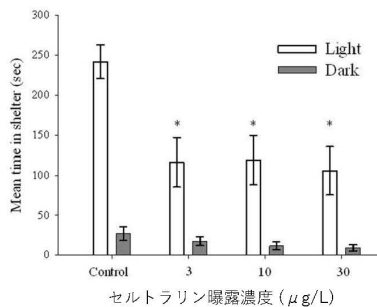
ここにあるように風邪を引いたら風邪薬ですね。今まさにメインの時期ですが、花粉症などアレルギーが発生しましたら抗アレルギー薬あるいは精神疾患の場合には抗うつ薬など様々な薬を服用します。当然代謝により減るのですが、体外に放出されますし、あるいは下水処理場を経由しない排出源もございます。下水処理場に集積した医薬品全てが下水処理場で分解・除去されるわけではなく、実際に河川や水系から数多くの医薬品が、ある一定の濃度で検出されております。

問題は、当然魚類をはじめ生態系の生き物というのは、これらヒトが使用した医薬品に常時複合曝露されるということが大きな問題と捉えています。ヒトの場合、それぞれの患者はその症状に適した薬を一定量飲むという特異的な投薬によって治療等を達成できますが、野生生物の場合は様々な薬に複合曝露されるということが問題になっている点ではございますが、その影響はほとんど明らかになっていないというのが現状でございます。

ファットヘッドミノー



明期には捕食者を避けるため、物陰（シェルター）に身を隠す。



セルトラリン（抗うつ薬）曝露により、明期のシェルター滞在時間が有意に短縮した。

✓ 幾つかの魚種の行動が、抗うつ薬／抗精神病薬の影響を受けることが報告されている。
(例：避難行動、摂餌行動、巣防衛行動など)

✓ しかし、使用する魚種により、行動影響評価の観点がバラバラで統一性がない。

✓ しかも、多くの医薬品について網羅的に行動影響を調査した研究はない。



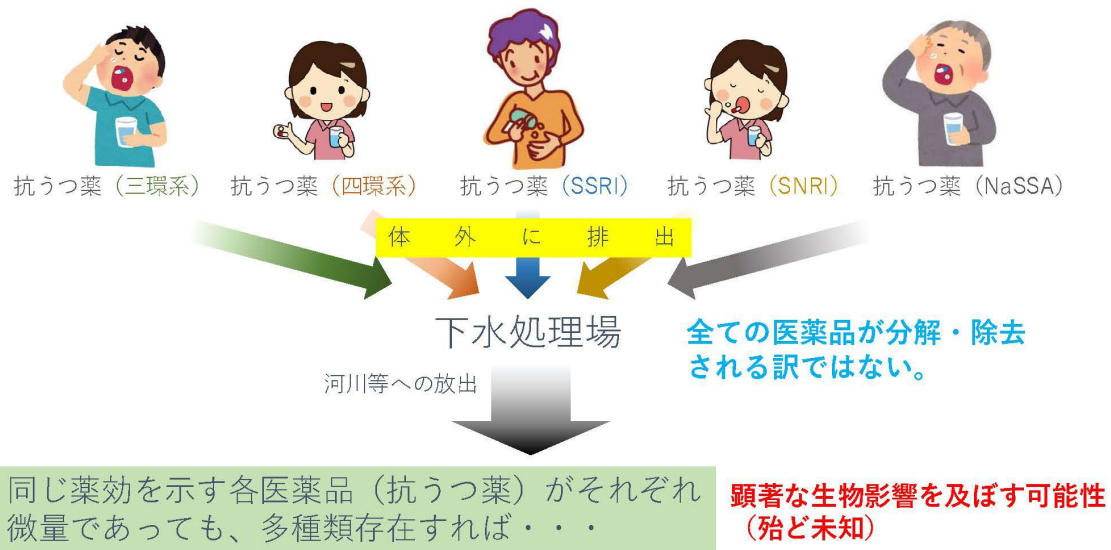
同一試験魚を用いた、統一的な評価観点での医薬品の行動影響評価を行うための試験法開発、それを用いた多く医薬品の行動影響評価が必要。

そういった中でもここ 10 年ぐらい、精力的に環境医薬品の生物影響の研究が進められておりまして、特に魚類をはじめとする野生生物の行動に関する影響はある程度知見が集積され始めています。こちらでは、この論文にありますファットヘッドミノーという淡水魚を使った行動への医薬品の影響を調べた研究を最初に御紹介させていただきます。この魚、昼間はこういったシェルターに潜んであまり明るいところを遊泳しないのですが、夜になると活発にシェルターから抜け出して回遊するという行動パターンを示します。この水槽にセルトラリンという抗うつ薬をこの研究では曝露し、この明暗行動がどのように変化するかというのを見た結果です。

その結果、このセルトラリンという抗うつ薬をファットヘッドミノーに曝露しますと、昼間普通はこのようにほとんどの時間シェルターの中に隠れているのですが、抗うつ薬を曝露されるとおそらく警戒心が薄れるという結果だと思われるのですが、日中でも明るいところをかなり行動するというような行動変化が認められるという報告があります。これをはじめとして幾つかの魚類の行動がヒトの抗うつ薬ですとか抗精神病薬、精神疾患の薬に影響されることが分かっています。ただ、大きな問題として、先ほど山本先生の御発表にもありましたが、世界基準でこういった医薬品の影響を調べる試験法というのが整備されておられません。現状では、各研究者がそれぞれ特異な試験魚を使って、その魚の特異的な行動影響を調べるということが数多くなされておりますが、その結果をどう見るかという点を含めて統一性がないというのが一つの大きな問題になっています。

かつ、多くの医薬品について一つの魚種のある観点の行動を網羅的に調査したという研究もまだほとんどないような状況です。そこで我々が何を考えましたかといいますと、同じ試験魚を用いてある統一的な評価観点で医薬品の行動をはじめとした影響評価を行うということが急務であるというふうに考えたわけです。

研究背景 同じ効果（薬効）を示す多くの医薬品種が存在する 4



まだ研究背景の説明は続きますが、例えば先ほど抗うつ薬が魚類の行動に影響するというお話がございましたが、抗うつ薬の中にも様々な構造、機能を持つものが多数ございます。これらも同時に、先ほどと同様に排出され、下水処理場で十分に処理されるわけではございませんので、やはりそうした 1 種類の薬効、同じ薬効を示す抗うつ薬でも多数複合曝露されるということが常時発生しており、こちらが問題になってきます。

これは何を意味しているかと申しますと、それぞれ単品の抗うつ薬の環境中濃度がたとえ低くても、それが多種類使用されている現状を考えますと、その総和が魚類に影響するわけで、1 種類の医薬品の環境中濃度がまだ低濃度だからといって安心できるわけではないということを我々に示している現実だと思われます。

研究背景

5

現状で、

- 環境医薬品が及ぼす生物影響についての理解は進んでいない
- それを調査する統一的な試験法の整備も遅れている
- （さらに）環境医薬品の複合影響については、殆ど未知



本研究では、精神疾患薬（抗うつ薬／抗精神病薬）に焦点を絞り、主にメダカに対する**行動**および**繁殖**影響を調査した。

今ご説明しましたように、環境医薬品の生物影響についての理解はあまり集約的には進んでおりません。また、先ほど申し述べましたように、それを調査する統一的な試験法の整備というのも世界基準という意味では遅れております。

先ほどの、同一の薬効を示す医薬品が複数影響した場合にどういう結果になるかということもまだほとんど未知の状態です。こういった研究背景から、我々は非常に多種類の医薬品が存在する中、主に精神疾患薬、抗うつ薬あるいは抗精神病薬に焦点を絞って、メダカを使ってメダカの行動あるいは繁殖影響を調査しました。

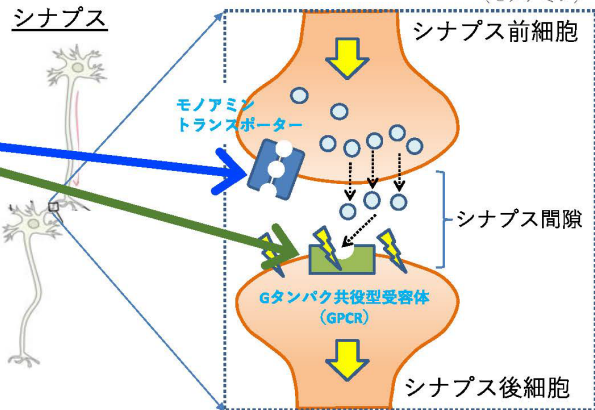
研究背景

抗うつ薬／抗精神病薬のシナプス作用点

6

2019年度医薬品使用金額ランキング
(厚生労働省HPより)

Rank	薬効分類	薬剤料 (+億円)
1	循環器官用薬	827
2	中枢神経系用薬	799
	抗うつ薬／抗精神病薬を含む	
5	消化器官用薬	412
6	血液・体液用薬	353
7	アレルギー用薬	216
8	化学療法剤	190
9	泌尿生殖器官および肛門用薬	126
10	漢方製剤	125
11	ビタミン剤	102
12	ホルモン剤	82
13	抗生物質製剤	56
14	滋養強壮薬	53
15	呼吸器官用薬	40



神経シナプスの仕組み自体は動物種で広く共通していることから、
抗うつ薬／抗精神病薬の野生生物への作用および影響が懸念される。

こちら左に示しております表は、ちょっと古いですが、2019 年の日本の医薬品の使用金額のランキングです。今回研究対象としました抗うつ薬・抗精神病薬は、この中枢神経系用薬に含まれます。薬剤料というレベルでは第 2 位に相当する、非常に使用量の多い医薬品です。この中枢神経系用薬の主な標的器官は、皆さん御存じのように神経系のこのシナプスに関わる部分です。後ほど詳しく説明させていただきますが、我々の神経の活動性です。

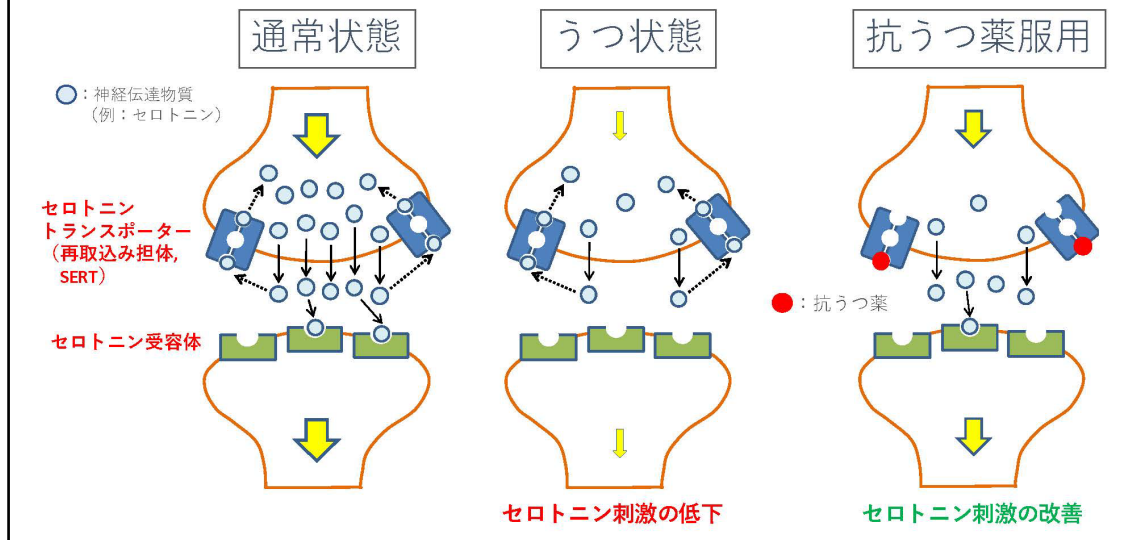
シナプスはこのように連続してネットワークが張り巡らされておりますが、1 個前のシナプスから隣のシナプスの伝達の活性を支える要素としてモノアミンという、いわゆる神経ホルモンの伝達がございます。前のシナプス、シナプス前細胞からあるモノアミン、神経ホルモンが分泌されシナプス間隙に放出され、それをすぐ隣接したシナプス後細胞と言われる後ろの細胞にあります特異的な受容体に結合することで神経ホルモンの伝達が行われます。

抗うつ薬と抗精神病薬はそれぞれ、抗うつ薬の場合は主にモノアミンを再取り込みするモノアミントランスポーターの活性を阻害する、あるいは抗精神病薬の多くはこのモノアミンの受容体の穴を塞いでモノアミンの刺激の伝達を弱めるというような薬効を持っている薬です。こういった神経系の構造自体は、ヒトに限らず広く動物種で共通しておりますことから、ヒトの抗うつ薬・抗精神病薬が野生生物の神経系に作用するというのは、もちろん影響濃度の程度の差はあると考えますが、当然懸念されるということから、まず抗うつ薬と抗精神病薬に関する研究を始めたという経緯があります。

研究背景

うつ症状と抗うつ薬の作用

7



ここでもう少し神経伝達について一般の方も御視聴いただいているということで少し説明を加えたいと思いますが、先ほど紹介したような形で、通常状態はある一定量の神経ホルモン、モノアミンがこのようにシナプス間隙に放出され、その濃度に従って後ろの受容体で受容されて神経機能が維持されています。

このシナプス間隙中の濃度が問題になるわけですが、このスライドではセロトニンを例に説明しておりますが、セロトニントランスポーターという、一旦細胞外に放出したセロトニンを再び放出元の細胞に回収するというトランスポーターが働いていて、ここのセロトニン濃度を一定に保って神経活動の安定化というのが図られているのですが、うつ病症状を呈しますと、このセロトニン自体の分泌量の低下が原因の1つとしてあって、このシナプス間隙のセロトニン量が落ちているにもかかわらず、この再取り込み自体はしっかり行われるために、この受容体に結合するセロトニンの量が少なくなることで神経の活性化というのが起こらないという状態に陥ります。

抗うつ薬を服用した場合、抗うつ薬自体はこのトランスポーターの結合部位を塞ぎ、再取り込みを防止することで、セロトニンの分泌量が低くても再取り込みを阻害することで細胞間隙のセロトニン濃度をノーマルに近い形に改善させて、セロトニン刺激の改善を図って神経活動を高めるといような薬の働き方になっています。

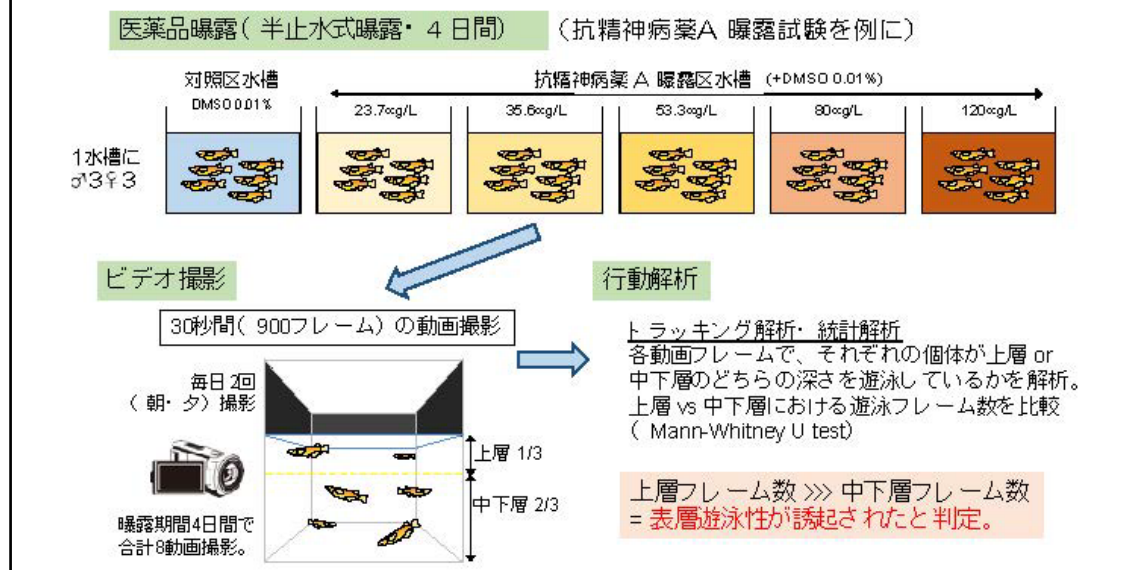
要するに、野生生物の場合は、魚にもうつ病とかはあるかもしれないですが、多くは通常状態だとしますと、この通常状態の個体のトランスポーターに抗うつ薬が効いた場合、当然、シナプス間隙のセロトニン濃度が通常よりも一過的に高まるというふうに考えられるのですが、そうなったときに行動あるいは繁殖のレベルでどういう影響が及ぶかというのを見るという形のメカニズムを想定しています。

抗うつ薬／抗精神病薬のメダカ**行動影響**

背景が長くなりましたが、まず抗うつ薬と抗精神病薬をメダカに曝露した場合の行動影響についてお話しいたします。

行動試験方法

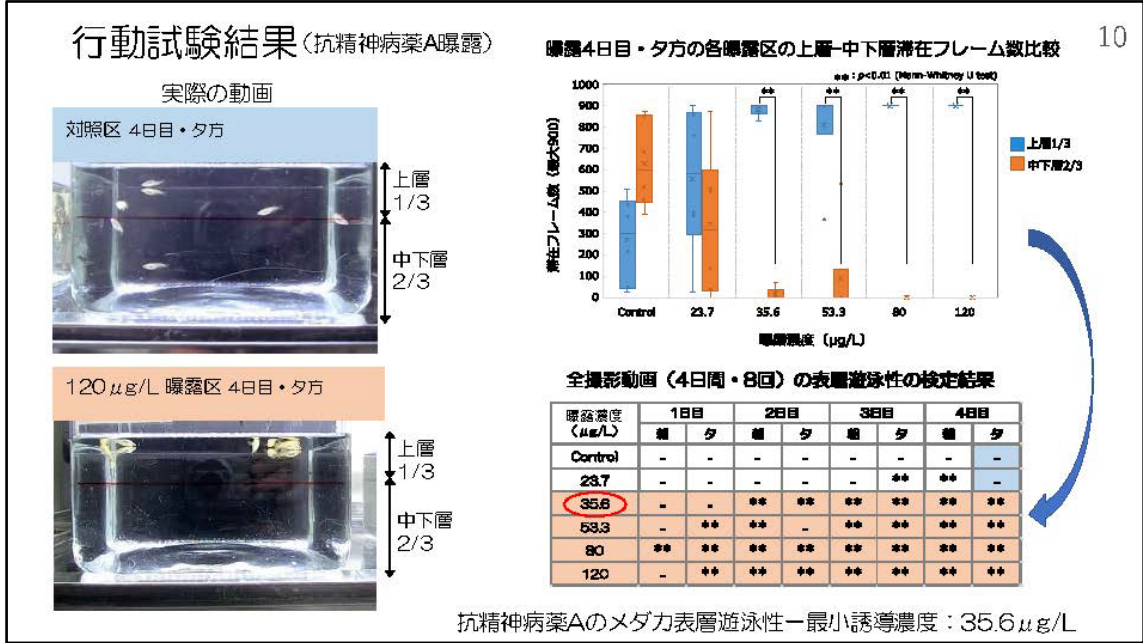
9



大変申し訳ないのですが、まだ未発表のデータを多く含みますので、使用した医薬品名に関しては、このように「抗精神病薬 A」という形でマスクさせて発表させていただいております。

この行動試験ですが、基本的には先ほど山本先生も多くお話しただいておりました OECD の試験法 TG203 に魚類の急性毒性試験という試験法が設定されており、これをベースとしております。この試験は、基本的に 4 日間で行う曝露でして、曝露方法自体はその OECD の TG203 を基準にして行いました。医薬品を曝露しない対照区の水槽に加えて、このような濃度で抗精神病薬 A を曝露して 4 日間、1 つの水槽に 6 匹、雄 3 尾、雌 3 尾、メダカの成魚を使用して曝露しました。その間、朝と夕方に毎日 2 回、このように水槽の側面からメダカの行動をビデオ撮影します。

そのときに、後にビデオ解析で明瞭に分かるように、ここが水深になりますが、上層の 3 分の 1 とその下 3 分の 2、このどちらの水深領域を魚が泳いでいるかというのを行動の定量化の指標にして、この撮影した動画を専用のソフトで解析して 30 秒間、1 秒間に 30 フレーム撮影できるビデオで撮影しましたので、30 秒間 900 フレームのうちに上の 3 分の 1 と下の 3 分の 2 のどちらに多く遊泳しているか、これを統計検定して、上層に偏っているか中下層に偏っているかということを行行動影響の指標としました。上層に偏っている場合、それを医薬品の影響による表層遊泳という形で表現しました。



まず、実際の撮影動画を見ていただきたいのですが— (動画により説明)

上の水色が医薬品を曝露していないメダカの水槽です。この赤いラインが水深 3 分の 1 を区切るラインですが、医薬品を曝露していない場合、このようにメダカはいろいろな深さを上下移動しながら自由に遊泳しているのですが、抗精神病薬 A をこの濃度で曝露した場合、ほとんどすべての魚がこのように上層 3 分の 1 に偏って遊泳するという特徴的な遊泳深度をとることが分かりました。

これを先ほど説明しました 900 フレームのうち各個体がどちらを遊泳するかというのを箱ひげ図のグラフとして表したのがこちらですね。コントロールではそういった偏りはほとんど見られませんが、最低濃度区の 23.7 $\mu\text{g/L}$ でもそういった特徴的な行動は見られませんが、この濃度 (35.6 $\mu\text{g/L}$) 以上になりますと、ほぼ全ての魚が 30 秒間表層遊泳するという結果が得られました。これは、4 日間の曝露の夕方、一番最後の 8 回目の撮影ビデオを解析した結果です。この 4 日目の夕方、この濃度区で表層遊泳したというこの「*」がこの表層遊泳のマークなのですが、これを 4 日間朝夕全ての動画について解析しましたところ、このような結果になりました。やはりコントロールとか最低濃度区では行動の影響は見られませんが、この濃度 (35.6 $\mu\text{g/L}$) では最初は行動影響は出ていないのですが、おそらく 1 日たって生物濃縮等によって体内濃度が高まった後に 2 日目以降ずっと表層遊泳するという結果になりました。

この行動影響試験の結果から、メダカの行動影響を表層遊泳という観点で異常・特徴的な行動影響ということで捉えると、この抗精神病薬 A のメダカ表層遊泳性を誘導する最小誘導濃度 LOEC 値はこの 35.6 $\mu\text{g/L}$ であると判断いたしました。

全15種医薬品の行動影響（表層遊泳性） ～抗うつ薬・抗精神病薬のみが表層遊泳性を誘起した～

医薬品名	略語	主な薬効	表層遊泳性の誘起	最小誘導濃度 (μg/L)
抗うつ薬 A		抗うつ薬	○	356
抗うつ薬 B			○	53
抗うつ薬 C			○	630
抗うつ薬 D			○	37
抗うつ薬 E			○	37
抗精神病薬 A		抗精神病薬	○	36
抗精神病薬 B			○	390
抗精神病薬 C			○	593
抗アレルギー薬 A		抗アレルギー薬	×	-
抗アレルギー薬 B			×	-
抗アレルギー薬 C			×	-
抗アレルギー薬 D			×	-
消化管機能改善薬		消化管機能改善・治療薬	×	-
消化管機能治療薬			×	-
心臓疾患治療薬		心臓疾患治療薬	×	-

抗うつ薬および抗精神病薬のみが、メダカの表層遊泳性を誘起した。
これらは全て、中枢神経系を主標的とする医薬品。

中枢神経系を主標的としない他の7医薬品は、表層遊泳性を全く誘起しなかった。

ヒト医薬品（抗うつ薬／抗精神病薬）がメダカの中枢神経系にも作用し、行動影響（表層遊泳性）を引き起こすことが示唆された。

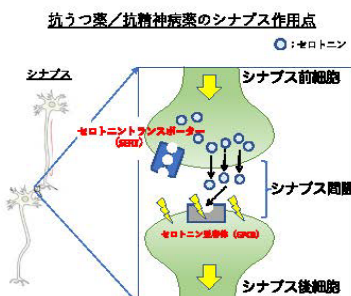
前スライドでご説明させていただいた医薬品はこの抗精神病薬 A ですね、さっきの 35.6μg/L を丸めた数字で書いておりますが、同様の試験をこの 15 種類の様々な薬効を持つ医薬品に対して全て行いました。

結果から申しますと、抗アレルギー薬とか消化管薬とか心臓疾患薬を幾らかなり高濃度で曝露しましても、先程お示しした表層遊泳性というメダカの行動影響は全く起きませんでした。しかし、抗うつ薬あるいは抗精神病薬など、精神疾患薬を曝露した場合には、影響濃度の違いはありましても全ての薬で先ほどの行動影響が認められました。

これら薬が、先ほど研究背景で説明しました中枢神経のシナプスに作用する薬であるということから考えますと、もちろん本来はヒトの抗うつ薬、抗精神病薬ですが、おそらくメダカのシナプス構造に何らかの形で作用してシナプス間隙のモノアミンの濃度を変化させて、それが引き金となってメダカの行動影響が引き起こされたと解釈しています。

メダカ行動影響（表層遊泳性）を誘起した医薬品の メダカSERT阻害活性およびオクタノール/水分配係数

医薬品名	メダカSERT IC50値 (mol/L)	logKow または logP	表層遊泳 最小誘導濃度 (μ g/L)
抗精神病薬 A	1.2×10^{-8}	5.19	36
抗うつ薬 B	3.0×10^{-9}	4.81	53
抗うつ薬 A	2.7×10^{-8}	2.90	356
抗精神病薬 C	N.D.	3.17	593
抗精神病薬 C'	8.5×10^{-8}	2.94	40
抗精神病薬 B	7.5×10^{-7}	3.00	390
抗うつ薬 D	1.9×10^{-8}	4.17	37
抗うつ薬 C	3.7×10^{-9}	0.43	630
抗うつ薬 E	1.6×10^{-9}	4.72	37



- ◆ これら8種医薬品のメダカ表層遊泳性最小誘導濃度には、ばらつきが認められたが、その大小は、各医薬品のメダカSERT阻害活性とオクタノール/水分配係数により説明可能。
- ◆ ある程度のSERT阻害活性を持つ他の医薬品のメダカ行動影響も予測可能かもしれない。

少しここは複雑になるのですが、丁寧に説明して御理解いただければと思って載せましたが、この9種類の医薬品を先ほど前のスライドで説明しましたメダカの表層遊泳を誘導する医薬品として抜き出したものです。

真ん中のlogKowといいますのは、それぞれの医薬品が水に溶けやすいか、あるいは油ミのような脂溶性物質なのかということの指標を示す数値ですが、この数字が大きくなるほど水には溶けにくくなる、脂溶性の医薬品であるということを示しています。つまり一般的にはこの数字が高くなるほど生物濃縮しやすいという指標として捉えてください。

このメダカ SERT IC50 値という値ですが、マイナスの指数になっていますが、この値が小さくなればなるほど、これらの薬のある観点での効果が高いと思ってください。この図、褐色の色が濃くなればなるほどそれぞれの項目の程度が高い。黄色とか寒色系の青色なれば、その中間あるいはその程度が低いと捉えてください。

この SERT というのは、先ほども示しましたシナプス前細胞にあるセロトニンを再取り込みする担体のことでして、抗精神病薬 A というのはこのようになかなり低い濃度で、SERT によるセロトニン再取り込み能力を 50%阻害できるという値になっています。

改めてこの表を見てみますと、一番右の表層遊泳最少影響濃度で 36、53 μ g/L など、2桁のかなりこの中では低い数値でメダカの行動影響を示した医薬品は、ほぼ総じて SERT 阻害活性が高いという関係が見てとれました。つまり、この SERT 阻害活性が高い医薬品ほど低濃度でメダカの行動影響を達成するということが分かりました。

あと、真ん中の指標ですけれども、これは各医薬品の脂溶性度合い（生物濃縮性）を示しています。この青で示したところに着目していただきたいのですが、抗うつ薬 C です。SERT 阻害活性は 3.7×10^{-9} 。かなり低濃度で SERT を 50%阻害する薬ですが、logKow が低いために、つまり水溶性が高いために、メダカに取り込まれたとしてもほかの医薬品よりも

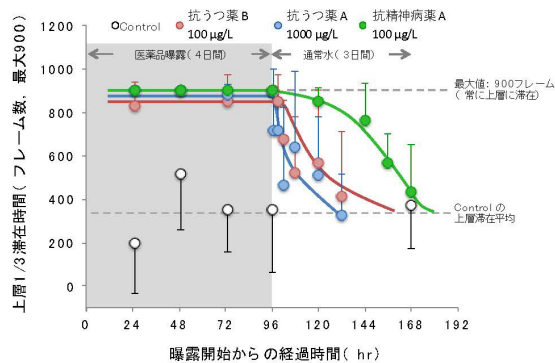
体内の残留性・蓄積性が低くて、比較的速やかに体内から排出されることも手伝って、薬としての SERT 阻害活性は強いにもかかわらず、体内残留性がおそらく低いことでメダカの行動影響を誘起する濃度がこのように 630 μ g/L と高くなるというふうに見てとれました。

すなわち、これら結果からさらに例数を増やしていきますと、医薬品の SERT 阻害活性、これは共同研究者である高知大学の井原先生に *in vitro* の細胞培養系を使って調べていただいた定量値ですが、この SERT 阻害活性とその医薬品の脂溶性度合いがある程度分かると、ある医薬品がどのぐらいの濃度でメダカの表層遊泳という行動影響を誘起できるかということがおそらく予見できるのではないかと今のところ考えています。

通常水に戻すと、元の遊泳行動に戻るのか？（回復試験）

13

4日間の医薬品曝露によりメダカの表層遊泳性を誘起。
その後、通常水に換水し、1日1回全交換



医薬品名	LogKow
抗うつ薬A	2.90
抗うつ薬B	4.81
抗精神病薬A	5.19

- ✓ これら医薬品による表層遊泳性は、分解・排出により可逆的に回復した。
- ✓ 抗うつ薬AおよびBの曝露個体で認められた表層遊泳性は、通常水に置換後数時間で低下し始め、1日程度でControlと同等レベルに回復した
- ✓ 抗精神病薬Aでは、より効果が持続し、通常水置換後約3日でControlレベルに回復した

この医薬品によるメダカの行動影響が可逆的であるかどうか、すなわち曝露をやめた後元の行動に戻るのか、それとも元に戻らないのかというところに興味がありましたので、このような回復試験を行いました。

この結果をこちらのグラフにお示ししておりますが、グレーの部分が4日間の先ほどお示した医薬品曝露期間でございます。4日間曝露した後、医薬品を含まない通常飼育水に換えた後、行動がどのように変化するかというのを見たのがこのグラフです。3種類の医薬品で試験しましたが、4日間曝露している最中は、30秒間900フレームのほぼ全てのフレームでメダカが表層遊泳していましたが、医薬品の曝露を止めて通常飼育水に置換しますと元の行動パターンに回復します。ただ、回復にかかる時間が医薬品によってまちまちということも分かりました。この抗うつ薬Bと抗うつ薬Aでは、通常飼育水に換えて6時間から半日ぐらいで、もう表層遊泳性という行動影響はかなり解かれて、約24時間後には元の、この白丸が医薬品を曝露していないコントロールの上層を遊泳しているフレーム数ですが、そこまで回復することが分かりました。

ただ、先ほどの抗精神病薬Aの場合、logKowが高いため、脂溶性が比較的高く、おそらく体内からの抜けが悪い、すなわち生体内の生物濃縮、残留性が高いため、あるいはこの医薬品が代謝された形の医薬品もまだメダカの行動影響を引き起こす活性を保持する可能性もあり、元の行動パターンに回復するまでの時間がほかの2種類の医薬品よりも長くなって、3日ぐらいかかってようやく元のレベルに戻るとということが分かりました。先ほど、ある医薬品がメダカの表層遊泳という行動影響を引き起こす場合にlogKow、水に溶けやすいか油に溶けやすいかの程度が問題になるという話をしましたが、その点は今回の回復試験で元の行動パターンに戻るまでの時間、体内の残留度合いにも当然効いてきますので、医薬品の脂溶性度合いは、こういった影響からの回復というところにも大きく作用すると

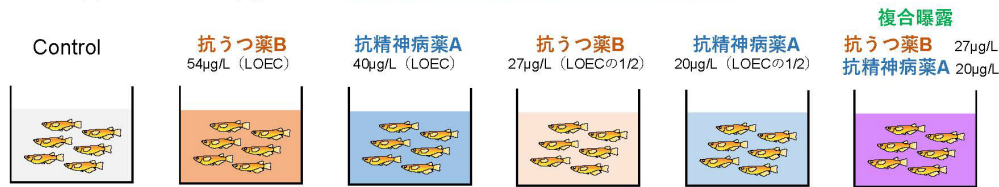
ということが分かってきました。

メダカの行動に及ぼす医薬品の複合曝露影響

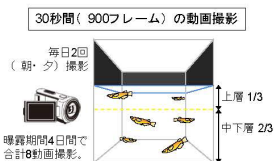
14

医薬品複合曝露
(半止水式・4日間)

抗うつ薬B : 表層遊泳 LOEC ≒ 54 $\mu\text{g/L}$
抗精神病薬A : 表層遊泳 LOEC ≒ 40 $\mu\text{g/L}$



ビデオ撮影 + 行動解析



上層フレーム数 >>> 中下層フレーム数
= 表層遊泳性が誘起されたと判定。

全撮影動画の表層遊泳性の検定結果

* : $p < 0.05$

** : $p < 0.01$

曝露区 $\mu\text{g/L}$	1日目		2日目		3日目		4日目	
	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕
Control	-	-	-	-	-	-	-	-
抗うつ薬B 54	-	-	-	**	*	**	-	-
抗精神病薬 40	*	**	**	**	**	**	**	**
抗うつ薬B 27	-	-	-	-	-	-	-	-
抗精神病薬 20	-	-	-	-	-	-	-	-
複合曝露	*	**	**	**	**	**	-	**

抗うつ薬+抗精神病薬の複合曝露は、メダカの行動影響 (表層遊泳性) に対して相加効果を示した。

このようなメダカの行動影響が、幾つかの抗精神病薬や抗うつ薬に対して分かりましたので、次に複合曝露を実施しました。

スライド中の左から 2 番目および 3 番目の水槽では、メダカの行動影響、表層遊泳性を誘導する抗うつ薬 B と抗精神病薬 A をそれぞれ単独で、表層遊泳 LOEC 値で曝露して表層遊泳が起こるか確認するとともに、左から 4 番目および 5 番目の水槽では、これはちょっと粗っぽい濃度設定ですが、それぞれの医薬品の表層遊泳 LOEC 値の 1/2 濃度で曝露を行い、行動影響が認められるのかどうかを確認するとともに、一番右の水槽では、それら 1/2 濃度の複合曝露区を設定し、同様の行動試験を行いました。

表にその結果を示していますが、抗うつ薬 B を 54 $\mu\text{g/L}$ 、抗精神病薬を 40 $\mu\text{g/L}$ で曝露した場合は、おおむねメダカの表層遊泳、行動影響が誘起されましたが、それを 1/2 濃度に下げますと全くその表層遊泳性というのが認められなくなりました。ただし、それらを複合曝露した場合、おそらく相加的な作用によって中枢神経に 2 種類の医薬品が作用した結果、行動影響を示すということが示唆されました。

これは、最初の研究背景でもお伝えしましたが、たとえ 1 種類ずつの抗精神病薬や抗うつ薬の環境中濃度が低くても、同じような薬効を示す、同じところに効く薬が多数存在すると、それらが少なくとも足し算のような相加効果を示した結果、ある魚に取り込まれた複数の医薬品の影響で行動影響などがもたらされるということが分かりました。多数の医薬品を我々人間が使っているということから考えますと、現時点での河川水中ですとか水系の医薬品のおおのこの濃度はそんなに高くない濃度であっても、今後少し上昇したりすると顕著に影響が出る可能性があるということが分かりました。

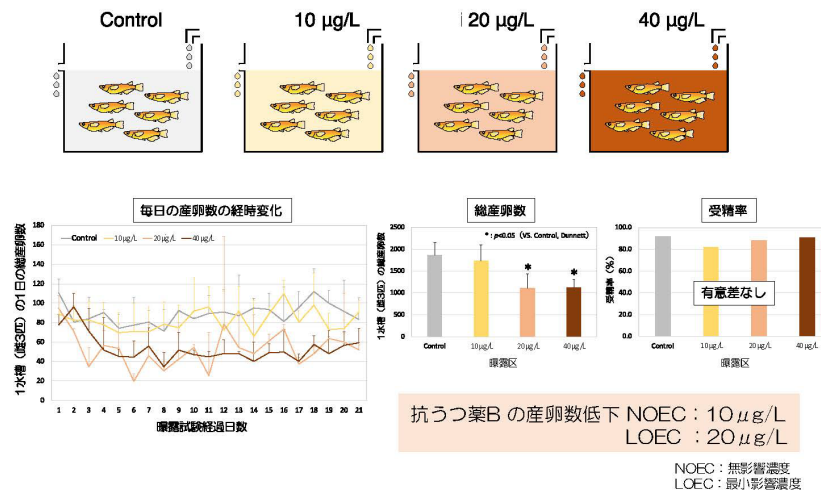
抗うつ薬／抗精神病薬のメダカ繁殖影響

それでは後半の、こういった医薬品をメダカに曝露した場合に繁殖にどういう影響を及ぼすかということについてお話しします。

抗うつ薬／抗精神病薬のメダカ繁殖影響試験

16

抗うつ薬 B のメダカ繁殖影響曝露試験（流水式、21日間）



この繁殖試験では、山本先生の御発表にも出てきました魚類の短期繁殖試験、OECD TG229 をベースとして用いています。この試験、21 日間の曝露で、エンドポイントは総産卵数が下がるか、あるいは受精率が下がるかですので、それらを調べました。このように流水式の曝露水槽に、この場合抗うつ薬 B をこれら濃度でかけ流し曝露しまして、ここに 3 ペア、雄 3 匹・雌 3 匹を収容して、毎日採卵して産卵数と受精卵をカウントして受精率も算出するという作業を行いました。

結果から申し述べますと、この抗うつ薬 B を 20µg/L 以上の濃度で曝露しますと、コントロールに対して総産卵数が低下します。ただ、受精率には顕著な影響は及びませんでした。

この抗うつ薬 B、行動影響を示した濃度が先ほど 54µg/L と以前のスライドでお話しましたが、曝露期間が先ほどの行動影響試験の場合は 4 日間、こちらの場合は 21 日間で 5～6 倍長い時間曝露しているというのもありまして、この産卵数が低下する最小影響濃度が、この薬がメダカに行動影響を引き起こした濃度よりも低い 2 分の 1 以下の濃度で誘導されるという結果になりました。

この試験も、幾つかの抗うつ薬とか抗精神病薬に対して行いました。結果的に申し述べますと、全ての抗うつ薬とか抗精神病薬で、影響濃度は異なりますが、このように産卵数がある一定曝露濃度で低下するということが認められました。同時に、抗アレルギー薬とか精神疾患の薬ではない薬に対してもこの繁殖影響試験を行いましたが、相当高濃度で曝露しても、こういった抗アレルギー薬とかでは産卵数の低下は全く認められませんでした。ですので、この時点で分かったことは、抗精神病薬とか抗うつ薬、ヒトに作用する部位とほとんど機能的に相同な形で保持されているような神経系に直接的には作用して、メダカの行動ですとか繁殖に大きな影響を与えるということが分かりました。

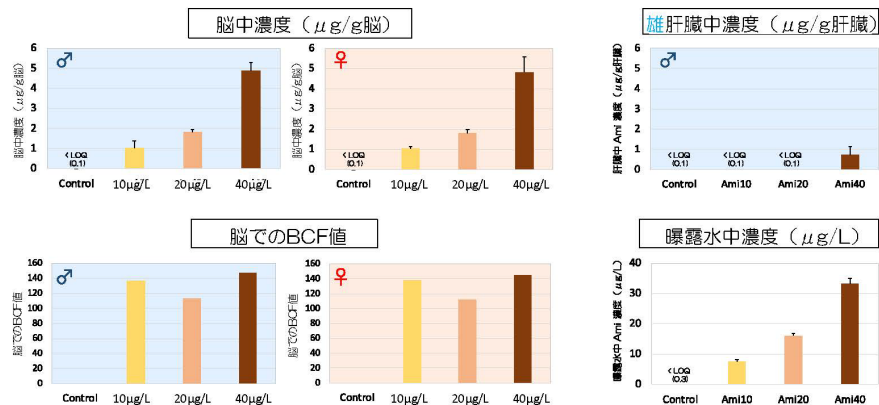
行動影響の場合は、先ほど示したようなシナプスに作用した結果、行動影響が引き起さ

れるということはある程度推測できているのですが、この産卵数の減少については、どのようなメカニズムに依るものなのかは、まだ不明な現状です。

曝露した抗うつ薬Bの脳での蓄積性（生物濃縮）

17

抗うつ薬Bの曝露終了後の個体から脳（雌雄）および肝臓（雄のみ）を採取し、3個体（1水槽分）をプールし、脳中濃度を微量分析した。



- ✓ 脳中濃度は他臓器（肝臓）に比べて約7倍高い
- ✓ 脳内BCF値は、曝露濃度に関わらずほぼ一定

その繁殖試験の際の、脳での蓄積性も我々は調べております。

こちらは、共同研究者である神奈川大学の中田先生に分析していただきました。左上のグラフは雌雄それぞれの脳中濃度で、曝露した抗うつ薬 B がどの程度脳に含まれるかですが、曝露濃度依存的に雄でも雌でも脳中濃度が上がっていきます。

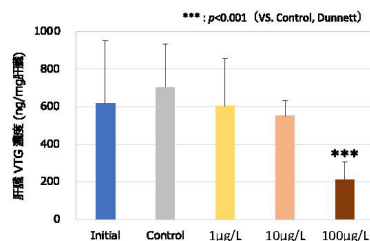
右上のグラフではそれに対して、雌は別の用途で肝臓を使いましたので解析したのは雄のみですが、同じ体内でも脳ではない、肝臓中のこの医薬品の蓄積濃度を調べました。そうしますと、曝露低濃度区、中濃度区では検出限界以下、ほとんど検出されず、最高曝露濃度区で僅かに検出されたというレベルに留まりました。元来、脳での物質の代謝性能が低いというのもあるので、一旦脳に蓄積されるとそこにとどまるということも災いしていますけれども、曝露された医薬品が血液脳関門を通過して脳に移行して、そこで代謝能が低いこともあって脳で高濃度に維持される。脳内で高濃度化した医薬品が先ほどのシナプスに作用して魚類に影響を及ぼしたことが裏づけとして得られました。

左下のグラフは脳での生物濃縮係数を示しています。右下のグラフに示す曝露水中の濃度に比べて脳内の抗うつ薬 B の濃度が 140 倍ぐらいですね。曝露濃度に関わらず、ほぼ一定の濃縮倍率を示すことが分かりました。

卵巣内の卵母細胞発達状況



肝臓 VTG 濃度



- ✓ 曝露 100 µg/L では、卵黄形成期の卵母細胞は殆ど認められなかった。
- ✓ また、卵黄の再吸収過程と思われる像も観察された。
- ✓ 肝臓 VTG 濃度も有意に低下した。

→ 卵成長（卵黄蓄積）の阻害

産卵数低下の要因として、「卵形成自体が抑制される」あるいは「排卵できない」あるいは「産卵行動が抑制されたために、結果的に排卵されて受精した産卵卵が減った」など、いろいろな可能性があったのですが、21 日間の曝露を終えた個体の雌の卵巣の組織切片を作成して観察してみました。

コントロールではこのように卵黄がたくさん蓄積された卵黄形成が進んだ、卵径の大きな卵母細胞が多数見受けられます。総産卵数の低下を引き起こさなかったこの医薬品の 10 µg/L の曝露濃度では、コントロールとそんなに変わらないくらい発達した卵母細胞が多数見受けられたのですが、この濃度、産卵数の低下を十分に引き起こす 100 µg/L で曝露した卵巣を見てみると、このようにすかすかといえますか、卵母蓄積が進んだ卵径が大きく発達した卵母細胞というものがほとんど見受けられませんか、一部このピンク色の像、これはもともとここに卵があったのですが、卵が退行して死んで再吸収されている、分解過程の卵を示しているのです、この結果から、こういった抗精神病薬とか精神疾患薬をある濃度以上で曝露しますと、卵巣内の卵母細胞の発達、特に卵成長が滞るために最終的に発達した卵の数が少なくて排卵される数が少ないために総産卵数が低下することが示唆されました。もちろん、この卵母細胞の成長がどのようにして阻害されるかというメカニズム的なところは現時点では不明です。

同時に、この卵の中に蓄積される卵黄、鶏の卵で言うと黄身の中の栄養成分、当然卵生生物の魚類にも同じものがありますが、その要素の 1 つに肝臓でつくられるビテロゲニンという卵黄蛋白前駆物質があるのですが、その肝臓中濃度を曝露個体の肝臓で測ってみたところ、やはり産卵数の低下を引き起こすような曝露濃度で、肝臓でつくられている栄養成分ビテロゲニン自体の濃度も低下していました。卵母細胞の発達が卵巣内で遅延しているということに加えて、その卵内に蓄積される栄養分をつくっている肝臓にも影響が及ん

でいるという、肝臓と卵巣の連動した影響というのが認められました。

抗うつ薬／抗精神病薬のメダカ繁殖影響（結果総合）

医薬品名	主な薬効	繁殖影響	最小誘導濃度 ($\mu\text{g/L}$)
抗精神病薬A	抗精神病薬	○	20
抗うつ薬B	抗うつ薬	○	20
抗うつ薬E	抗うつ薬	○	20
抗うつ薬A	抗うつ薬	○	200
抗アレルギー薬C	抗アレルギー薬	×	

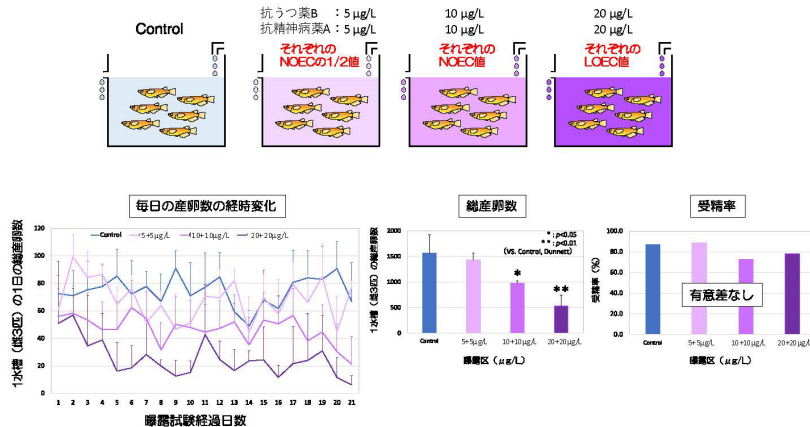
メダカ行動影響と同様に、繁殖影響（産卵数低下）についても、抗うつ薬／抗精神病薬でのみ影響が認められた。

この繁殖試験、山本先生はよく御存じだと思うのですが、産卵数を一定にならしてスタートして前準備して、21 日間曝露するというのをやりますと、大体ひと月ちょっとぐらいかかるので、なかなか大学の人員の少ない研究室だと数多くの医薬品をこなすということができていないのですが、先ほど御紹介した抗精神病薬 A 以外に幾つかの抗うつ薬や、アレルギー薬も試験しました。影響濃度は違いますが、試した全ての抗精神病薬、抗うつ薬でメダカの産卵数の低下が引き起こされました。一方、このスライドに示すように、抗アレルギー薬の曝露では、繁殖影響は全く認められませんでした。

メダカの繁殖に及ぼす医薬品の複合曝露影響

20

流水式、21日間（3週間）



類似の薬効を持つ異なる医薬品の複合影響が認められた。
→1種類の医薬品濃度が低くても、類似の薬効を持つ医薬品が多数存在すると、影響が顕著化する。

幾つかの抗うつ薬・抗精神病薬がメダカの産卵数を低下させるということが分かりましたので、行動影響の場合と同様に複合曝露を行ってみました。

抗うつ薬 B と抗精神病薬 A、先ほどの行動影響の複合曝露と同じ医薬品の組合せで、繁殖試験を実施しました。一番右の水槽は、それぞれ単独でもメダカの産卵数を低下させる濃度（繁殖影響 LOEC）での複合曝露区です。右から 2 番目の水槽は、その LOEC 値の濃度の 2 分の 1 値での複合曝露区です。右から 3 番目の水槽は、さらにその 2 分の 1 値での複合曝露区で、以前と同様に 21 日間曝露して産卵数をチェックしました。

その結果、単独の医薬品のみでも産卵数の低下を引き起こせる濃度での複合曝露、一番右の水槽ですが、当然単独でも産卵数を低下させられるので、これを 2 種類複合曝露しても当然産卵数の低下が引き起こされました。要するに拮抗作用は示さないということだと認識しています。

見ていただきたいのは、右から 2 番目の水槽の複合曝露の結果です。それぞれ単独の医薬品の曝露濃度 10 μg/L では産卵数の低下を引き起こさないのですが、複合曝露しますとこのように産卵数の低下が認められました。こちらも行動影響の場合と同様に、それぞれの医薬品の曝露濃度が低くても、同じ薬効を示す医薬品が複数存在しますと、このように繁殖影響を示す可能性があるということを示しております。

まとめ

- ◆ 調査した多くの薬効を持つヒト医薬品のうち、SERT阻害活性が比較的高い抗うつ薬／抗精神病薬のみがメダカの行動影響（表層遊泳性）を誘起した。
- ◆ 上記の抗うつ薬／抗精神病薬は、行動影響のみならず繁殖影響（産卵数低下、卵形成の抑制）も誘起した。
- ◆ また、それらの複合影響が認められたことから、個別の医薬品の環境中濃度が低くとも、類似の薬効を持つ医薬品が多数存在することで影響が顕著化することが示された。

長くなりましたが、まとめに入りたいと思います。

今発表させていただきましたように、行動影響の場合は、医薬品の SERT 阻害活性、先ほど御説明しましたように、セロトニンを前シナプスに再取り込めるのを阻害する薬の活性が強ければ強いほど、また生体内残留性が高ければ高いほどメダカの行動影響を表層を泳ぐという特化したエンドポイントとして検出できることになりました。

これらの医薬品が行動影響だけではなくて繁殖影響にもつながっているということもお示しすることができました。

あと、ここですね。ここを最も重要視しているのですが、複合影響が見られるという点です。何回も繰り返しになって申し訳ないのですが、類似の薬効を示す医薬品が環境中に多数存在すると、たとえそれぞれの医薬品が低濃度であっても影響が顕著化する可能性が示されました。

謝辞

本研究は環境研究総合推進費【5-2204】（魚類に対する環境医薬品の影響評価法開発に関する研究～環境分析・分子応答・行動／繁殖解析による融合評価基盤の構築～）の助成を受けて実施した。

共同研究者

高知大学 ：井原賢・荻平裕次
神奈川大学 ：中田典秀
東京理科大学：宮川信一
長崎大学 ：征矢野清・村田良介・天谷貴史

最後に謝辞を述べさせていただきます。

本研究は、環境研究総合推進費を頂いて、これら共同研究者の方々とともにこの 3 年間実施してきました成果であります。

以上で発表を終わらせていただきます。御清聴、ありがとうございました。