

水環境を汚染する医薬品の水生生物への影響

井原 賢

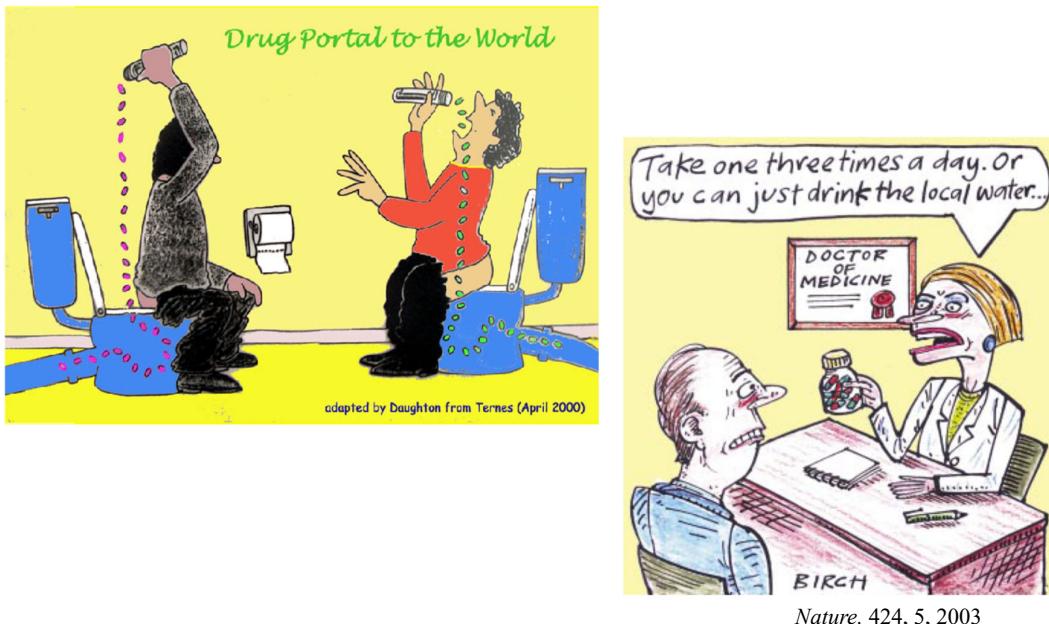
高知大学 農林海洋科学部



- ①なぜ医薬品が問題か
- ②海外での検出事例
- ③医薬品の薬理活性
- ④水生生物に対して薬理活性の強い医薬品
- ⑤魚の医薬品曝露試験と行動・繁殖異常

日常的に使われる医薬品、抗生物質 トイレから水環境へ

✓ 2000年頃から、下水や河川水での医薬品の検出報告増加

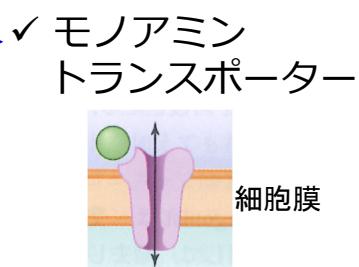
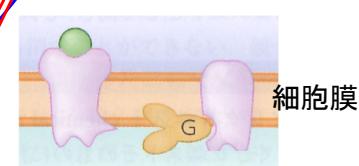


Nature, 424, 5, 2003

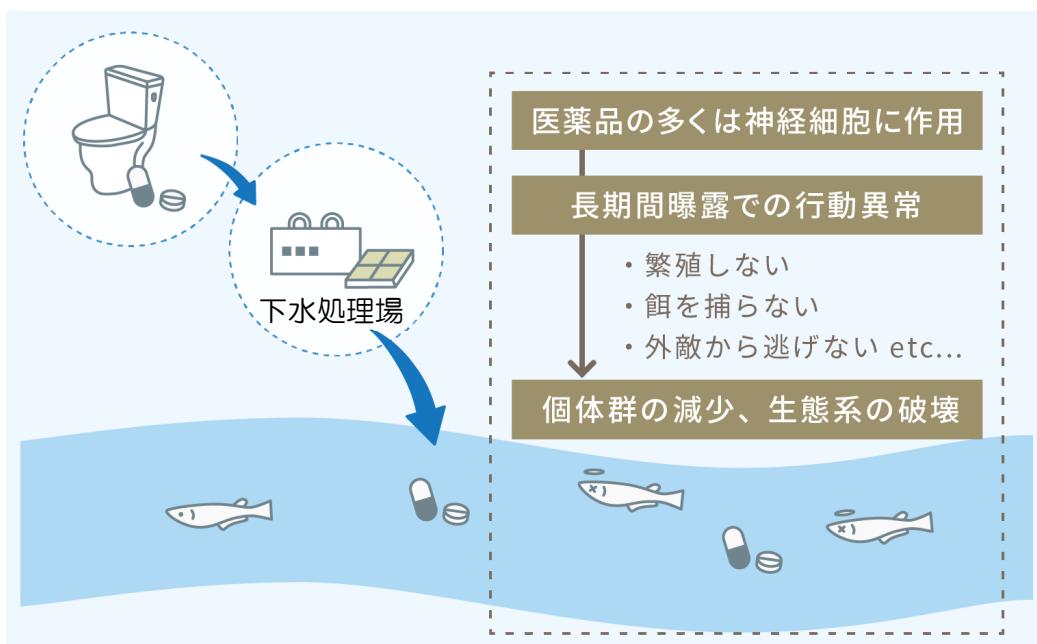
医薬品の約半数はGPCR阻害薬/抗うつ薬

日本における病院の医薬品処方 (厚生労働省DBより、H28)

ランク	医薬品タイプ	錠剤数(億/年)	細胞内の標的分子
1	消化性潰瘍用剤	54	✓ Gタンパク質連結型受容体
2	糖尿病用剤	47	
3	血圧降下剤	46	
4	血管拡張剤	41	
5	高脂血症用剤	38	
9	その他アレルギー用薬	31	
10	抗うつ薬	29	✓ モノアミン トランスポーター
13	その他中枢神経系用薬	14	
17	気管支拡張剤	3	
18	抗ヒスタミン剤	2	
19, 21	合成抗菌剤/抗ウイルス剤	2/1	



下水処理場から水環境への医薬品の排出、懸念される生物影響



毒性の種類



個体の異常 ⇒ populationの減少 ⇒ 生態系の崩壊

- ①なぜ医薬品が問題か
- ②海外での検出事例
- ③医薬品の薬理活性
- ④水生生物に対して薬理活性の強い医薬品
- ⑤魚の医薬品曝露試験と行動・繁殖異常

ヨーロッパ、アメリカでの下水中の抗うつ薬濃度

8

下水処理場の流入下水

濃度範囲

10~1,000ng/L

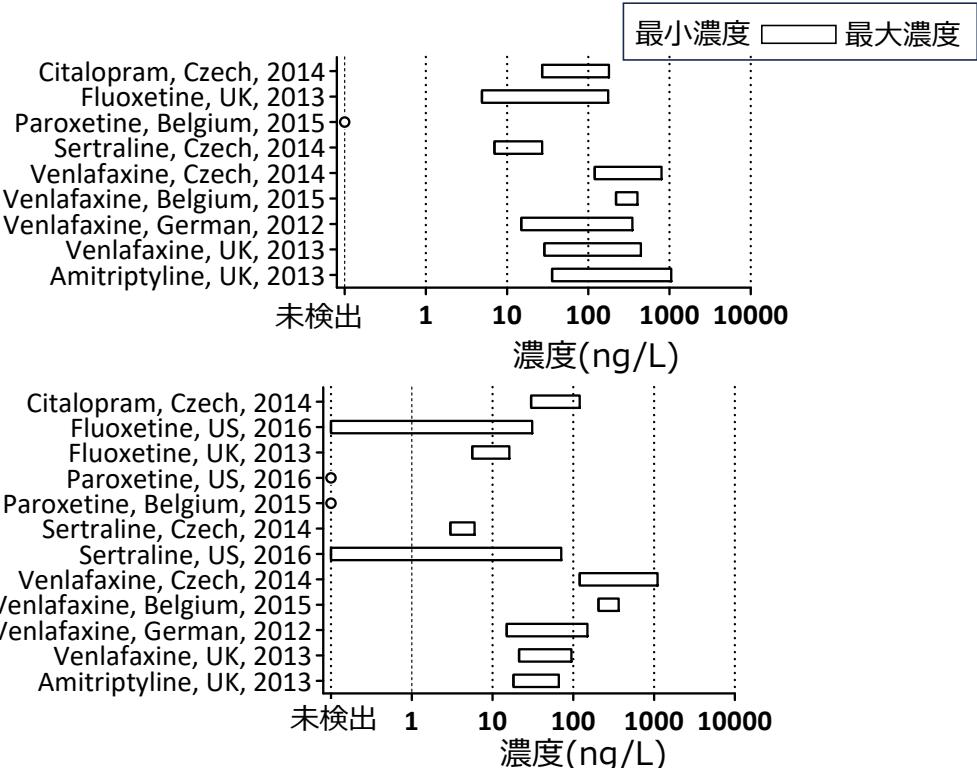
国によって、下水処理場
によって、濃度異なる。

下水処理場の放流水

濃度範囲

1~1,000ng/L

国によって、下水処理場
によって濃度異なる。



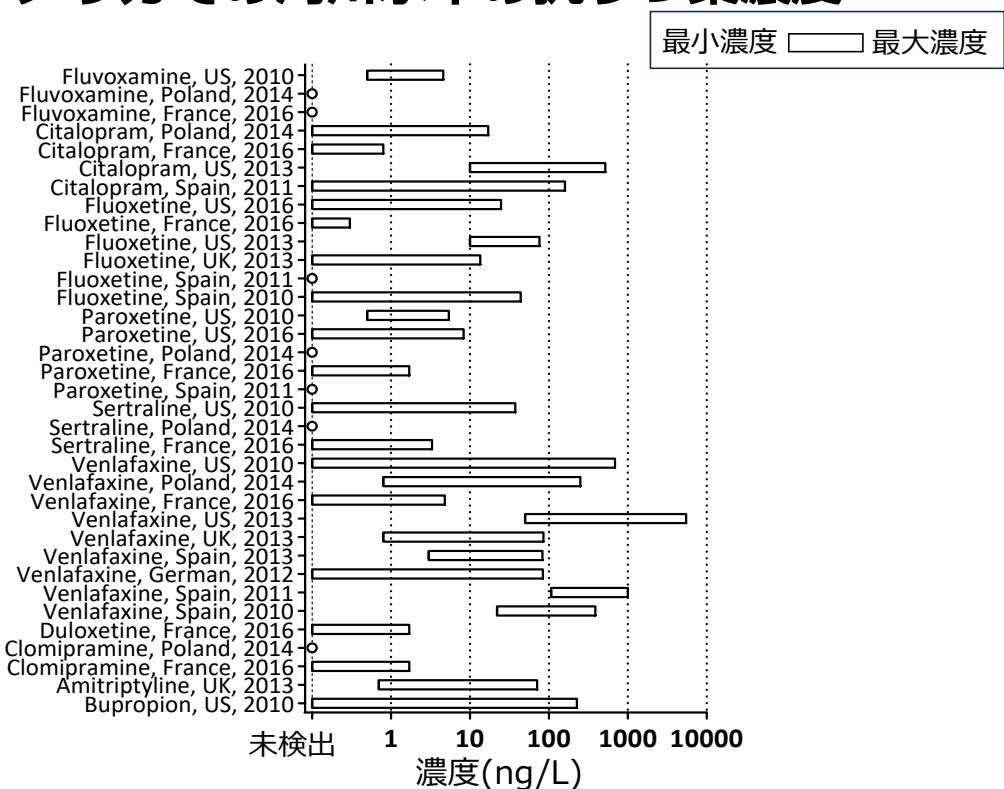
ヨーロッパ、アメリカでの河川水中の抗うつ薬濃度

9

濃度範囲

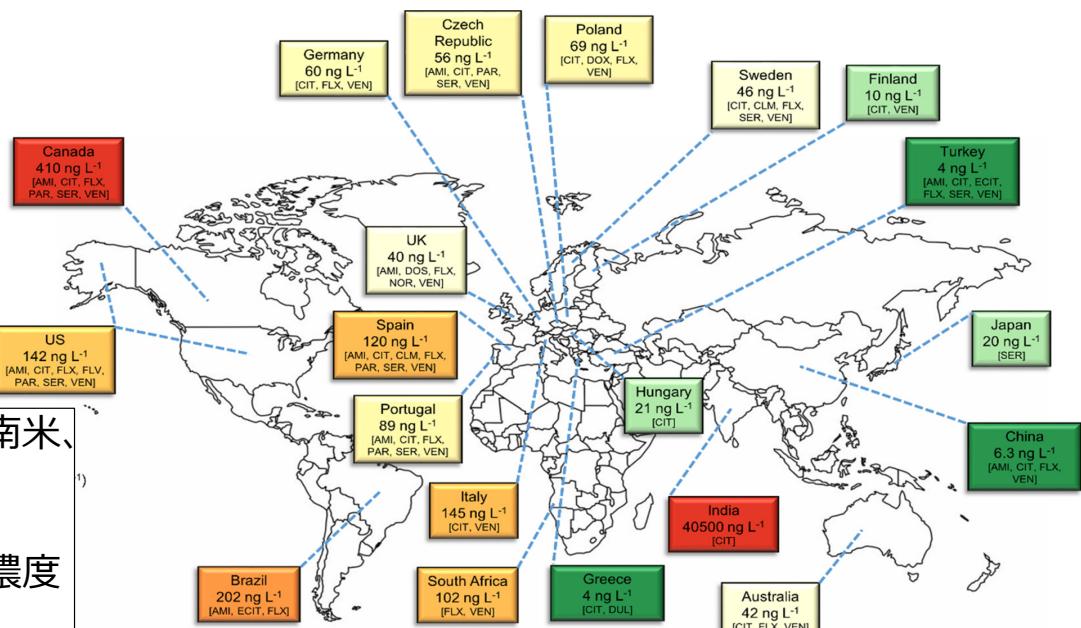
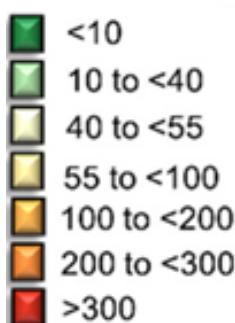
0.1~1,000ng/L

国によって、下水処理場
によって、濃度異なる。
下水処理場の下流で濃度
が高い傾向。



河川水中の抗うつ薬濃度：論文で報告されている最高濃度の平均値¹⁰

濃度範囲(ng/L)

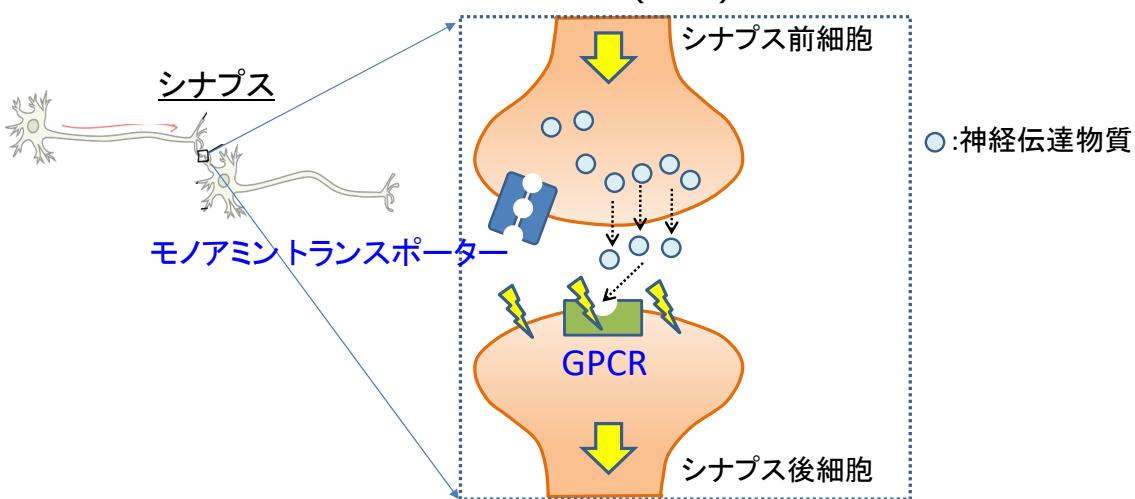


- ✓ ヨーロッパ、北米、南米、アフリカで高い傾向
- ✓ インドも高い。
- ✓ 下水処理場の下流で濃度が高い

- ①なぜ医薬品が問題か
- ②海外での検出事例
- ③医薬品の薬理活性
- ④水生生物に対して薬理活性の強い医薬品
- ⑤魚の医薬品曝露試験と行動・繁殖異常

GPCRとモノアミントransポーターの機能

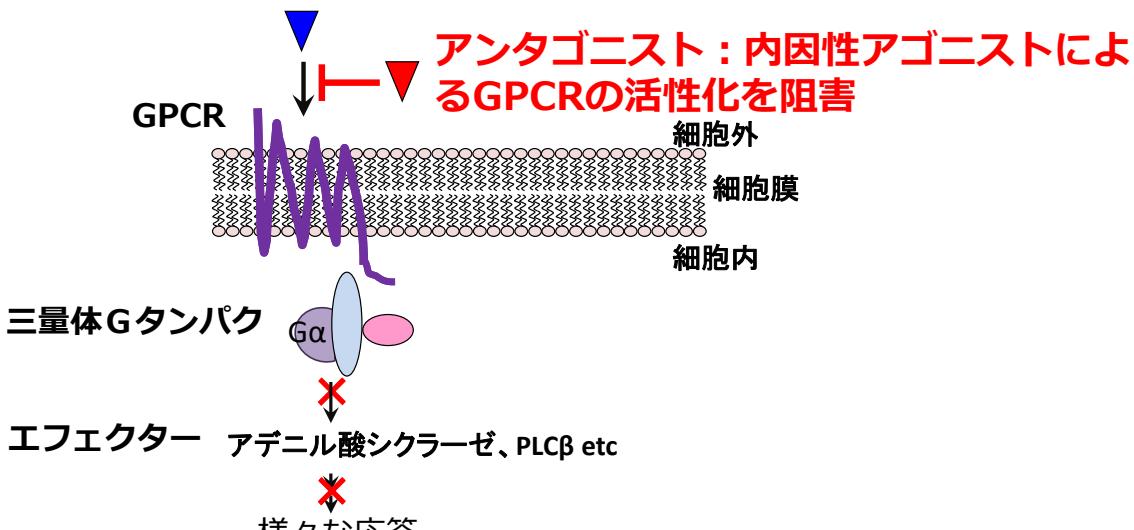
- GPCRは神経伝達物質が結合するとシナップス後細胞にシグナルを伝える
- トランスポーターは神経伝達物質を再取り込(回収)し、シグナルを止める



- ① 神経伝達物質が放出される
- ② 神経伝達物質がGPCRと結合、シグナルが伝わる
- ③ トランスポーターが神経伝達物質を回収する
- ④ シグナルが止まる

- ✓ GPCRは、細胞外から運ばれてくるホルモンや成長因子、神経伝達物質と結合、細胞内へシグナルを伝達

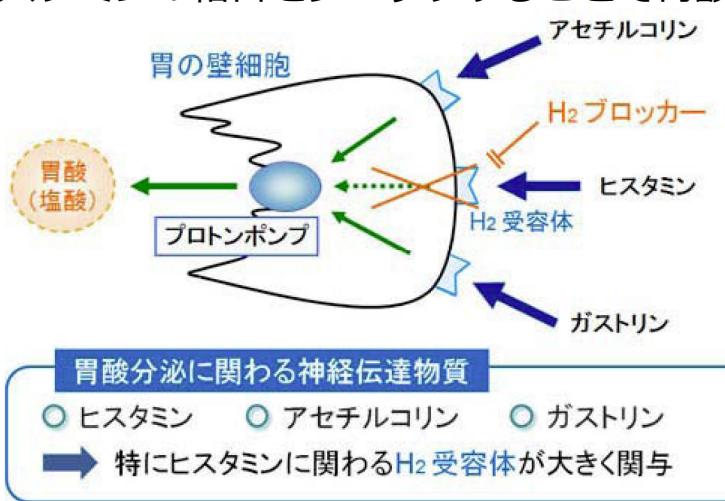
アゴニスト：GPCRを活性化



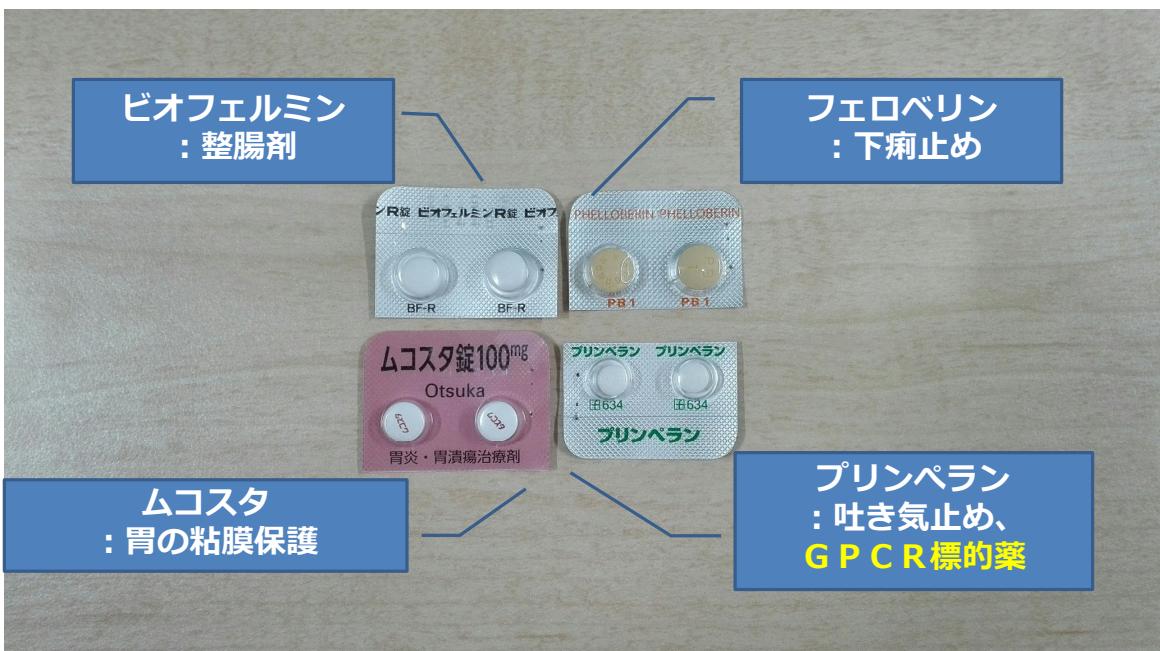
✓ 生理活性は GPCR の活性化/阻害によってもたらされる

GPCRを標的とした医薬品の例：ガスター

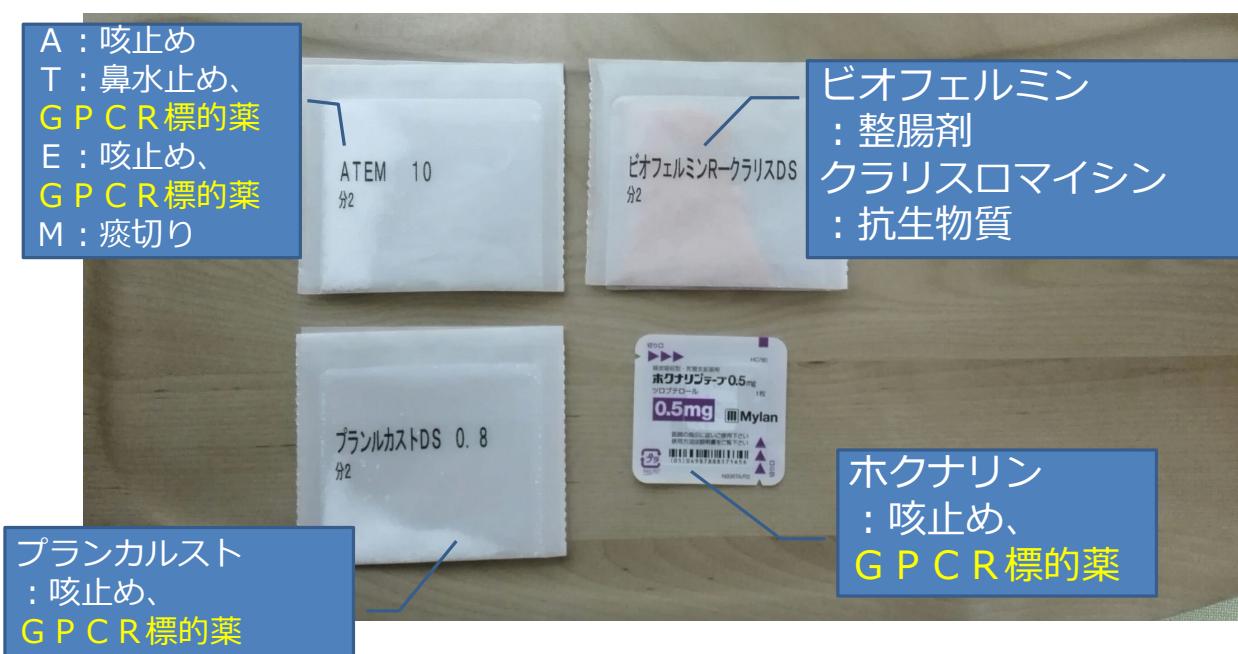
- ✓ ガスター(ファモチジン)：H₂受容体のアンタゴニスト
- ✓ ヒスタミンがH₂受容体に作用すると大量の胃酸が分泌されるが、ガスターはヒスタミンの結合をブロックすることで胃酸分泌を抑制する



昔、胃腸風邪に罹った時に、、、



娘(1歳7ヶ月、当時)も胃腸風邪に罹りました、、、、

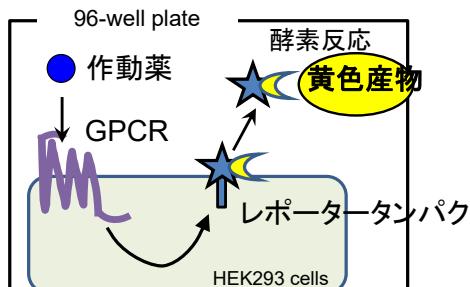


GPCR阻害薬の活性測定試験: TGF α shedding assay

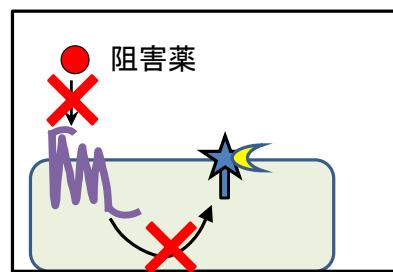
1. HEK293細胞にヒトGPCR発現プラスミドを導入
2. 試料曝露
3. プレートリーダーで405 nm吸光度測定

* Inoue et al., *Nature methods*, 2012

GPCR作動薬・アゴニストの場合



GPCR阻害薬の場合



- ✓ 培地が黄色に発色 \Rightarrow GPCRの作動薬・アゴニストを定量可能
- ✓ 培地が黄色に発色しない \Rightarrow GPCR阻害薬を定量可能

\Rightarrow TGF α shedding assayを下水からのGPCR阻害活性の検出に適用した

GPCR標的医薬品の例、下水からの活性の検出

受容体	受容体クラス	主要医薬品	受容体	受容体クラス	主要医薬品
AT1	アンジオテンシン	・抗高血圧薬 ・平滑筋作用薬	V1A	バソプレッシン	・平滑筋作用薬 ・利尿薬
D2	ドーパミン	・抗精神病薬	V2		
D4			H1		・鼻アレルギー治療薬 ・消化性潰瘍治療薬
α 1B	アドレナリン	・抗高血圧薬 ・気管支拡張薬	H2	ヒスタミン	
α 2A			H3		
β 1			5-HT1A	セロトニン	・平滑筋作用薬 ・鎮静睡眠薬
β 3			5-HT2C		
M1	アセチルコリン	・気管支拡張薬	CB1	カンナビノイド	・薬物依存治療
M3			EP3	プロスタノイド	・平滑筋作用薬
			BLT1	ロイコトリエン	・平滑筋作用薬

✓ヒトの7種類のGPCRに対して下水処理水中から活性を世界で初めて検出* (○)

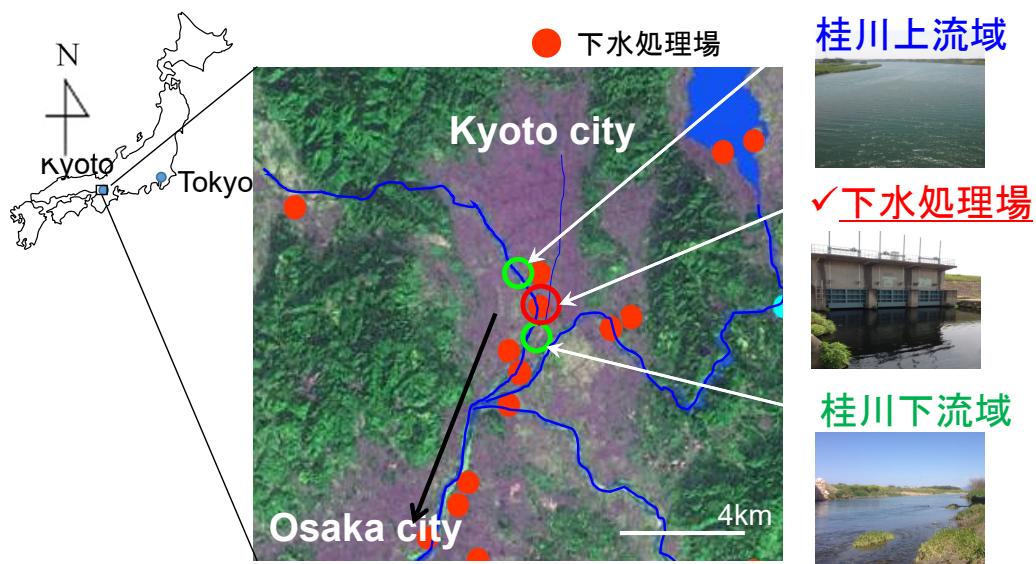
* Ihara et al., *ES&T*, 2015, 49, 1903-1911

下水処理場、河川調査

19

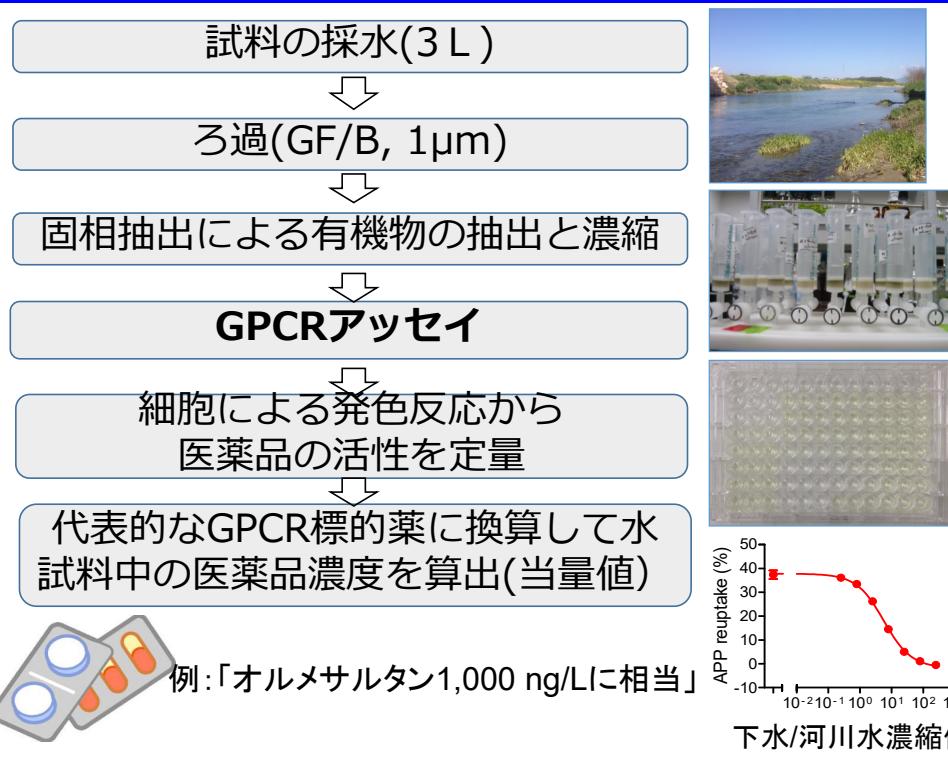
✓桂川流域: 上流域、下水処理場放流水、下流域

・採水日: 2014年1月, 7月, 10月, 12月,
2015年2月, 3月, 4月, 7月, 10月,
2016年1月



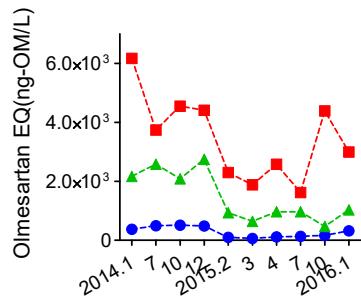
水試料の前処理、GPCRアッセイ

20

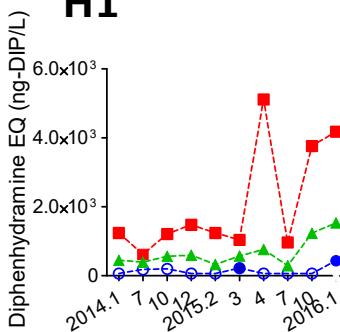


下水、河川水での医薬品濃度(当量値EQ)

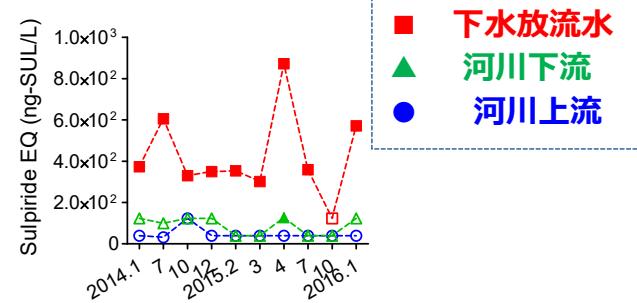
ヒト アンジオテンシン受容体 AT1



ヒト ヒスタミン受容体 H1



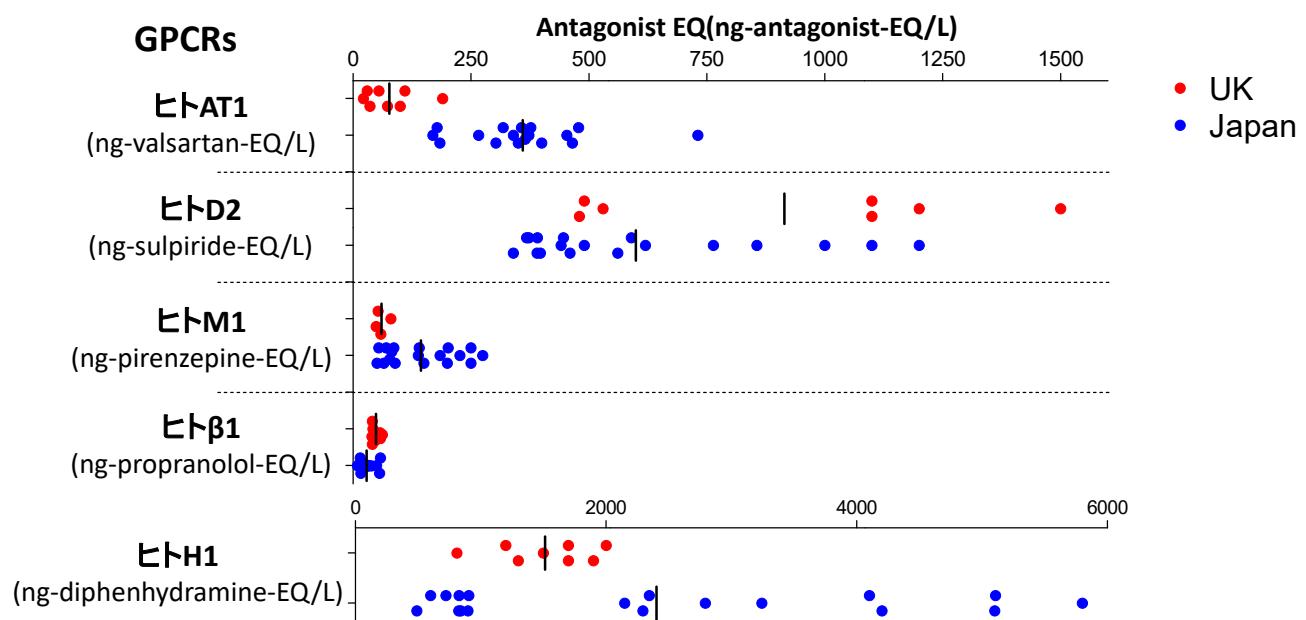
ヒト ドーパミン受容体 D2



Ihara, et al., *J. Appl Toxicol.*, 2020.

- ✓ 医薬品濃度: 下水放流水 > 下流 > 上流
- ✓ 下流での濃度、下水放流水の変動に一致 ⇒ 下水放流水が汚染源

下水処理場放流水での医薬品活性: イギリスと日本の比較

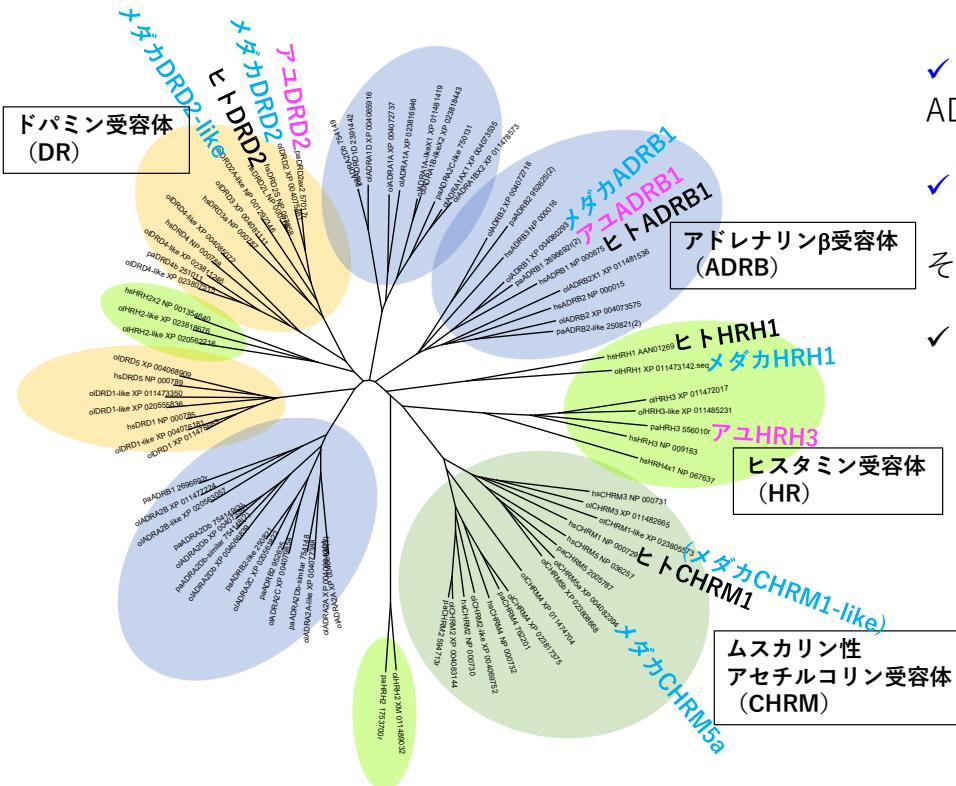


Ihara et al., *Environmental Science & Technology*, 2015. Zhang et al., *Environmental Science & Technology*, 2018. Ihara, et al., *J. Appl Toxicol.*, 2020.

魚類のGPCR遺伝子クローニング

東京理科大 宮川先生より

23



✓ メダカ : HRH1, DRD2, DRD2-like, ADRB1, CHRM5a

✓ アユ : HRH3, DRD2, ADRB1

それぞれクローニングした。

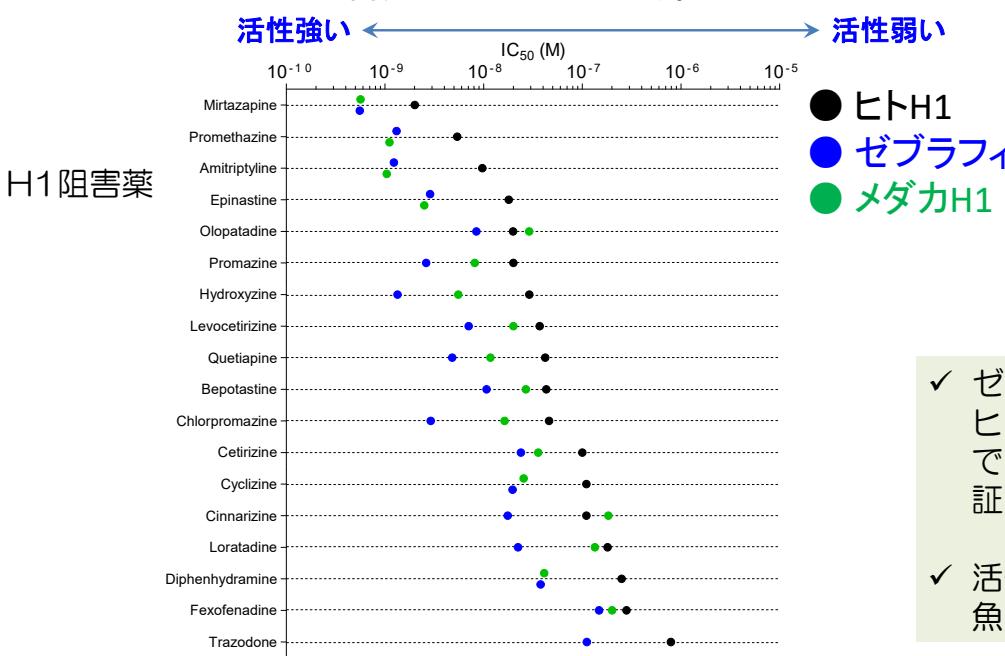
✓ メダカの脳で発現していることを確認済

⇒ 実際に医薬品が魚受容体を阻害するのかどうか、これまで調べられていないかった

24

ヒスタミン受容体に対するGPCR阻害薬の50%阻害値

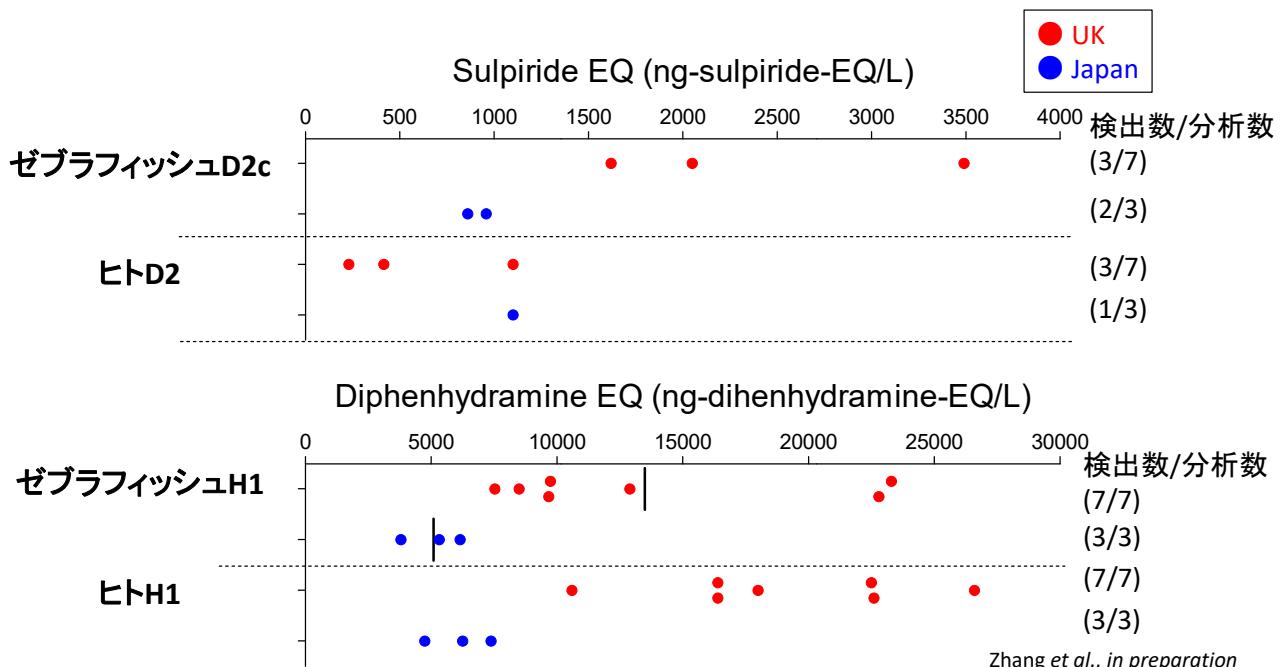
- ✓ 宮川先生によるメダカ受容体の発現ベクターの構築
- ✓ ゼブラフィッシュ需要胚はGenBank登録配列より人工合成



✓ ゼブラフィッシュとメダカのヒスタミン受容体も、阻害薬で阻害されることを初めて実証した。

✓ 活性の強い医薬品は、ヒトも魚も同じ傾向。

下水での医薬品活性値：イギリスと日本の比較



Zhang et al., in preparation

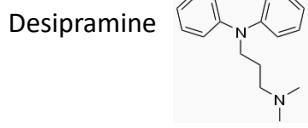
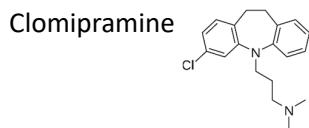
✓ ゼブラフィッシュのGPCRも、下水放流水によって阻害を受ける

- ①なぜ医薬品が問題か
- ②海外での検出事例
- ③医薬品の薬理活性
- ④水生生物に対して薬理活性の強い医薬品
- ⑤魚の医薬品曝露試験と行動・繁殖異常

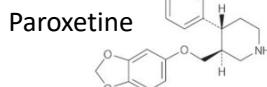
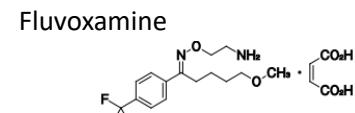
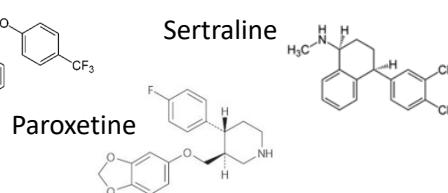
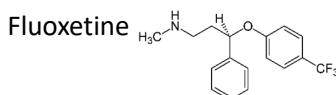
抗うつ薬：モノアミントランスポーター阻害薬

- ✓ 水環境で最も頻繁に検出される人用医薬品の一つ

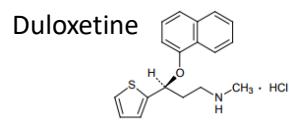
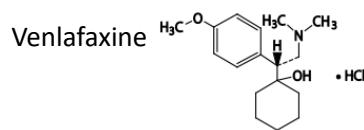
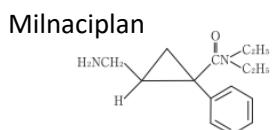
三環系抗うつ薬 Tricyclic antidepressants (TCAs)



選択的セロトニン再吸収阻害剤 Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs)

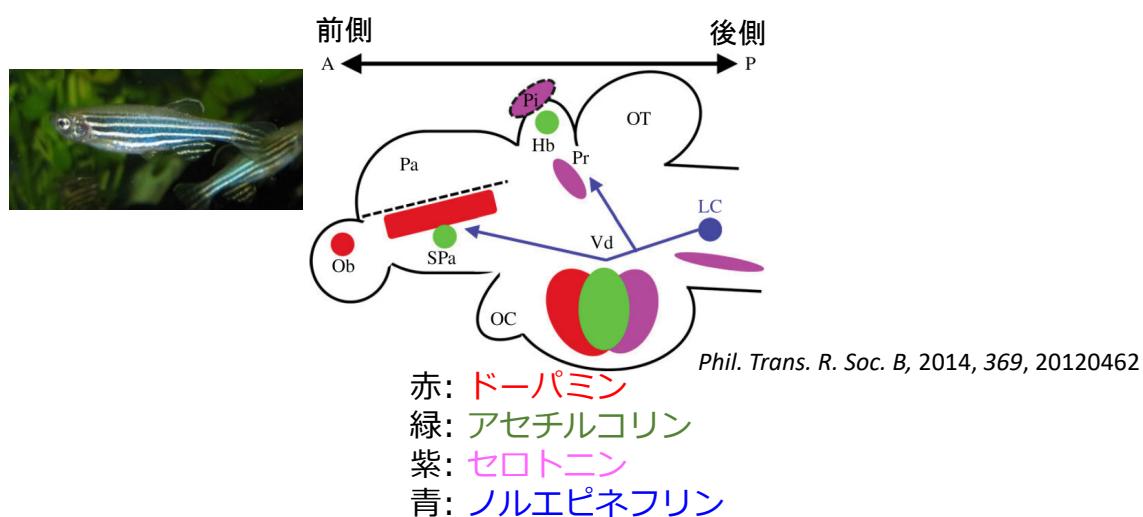


セロトニン-ノルエピネフリン再吸収阻害剤 (SNRIs)



魚の脳にもGPCRやモノアミントランスポーターが存在する²⁸

- ✓ ゼブラフィッシュ脳でのモノアミンの発現



魚とヒトのGPCR、モノアミントランスポーターの遺伝子は似ている²⁹

セロトニントランスポーター(SERT)のアミノ酸配列の比較



アミノ酸相同性

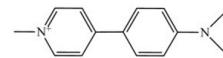
ヒト vs メダカ: 91%

ヒト vs ゼブラフィッシュ: 91%

メダカ vs ゼブラフィッシュ: 93%

抗うつ薬活性測定の培養細胞試験: モノアミントransporter阻害アッセイ¹⁾ 30

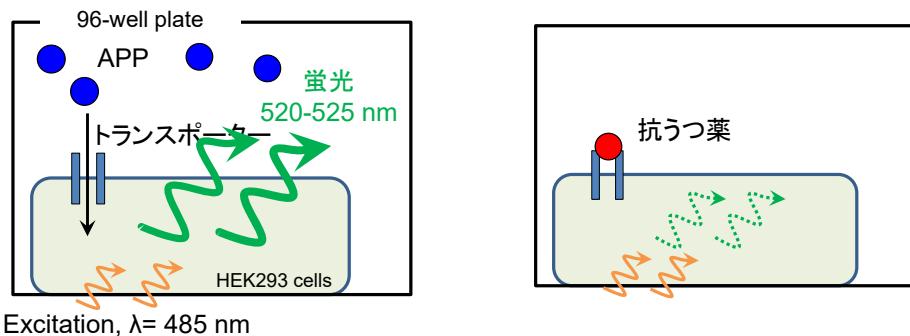
- ✓ APP: fluorescent substrate of transporter
(*J. Biological chemistry*, 2012, 287, 8852-8863)



1. HEK293 細胞へトランスポーター発現プラスミドを導入
 2. 細胞を医薬品とAPPへばく露 (1h)
 3. 細胞を洗浄、細胞外の APPを除去する
 4. 細胞内の APP 蛍光をプレートリーダーで測定

下水中に抗うつ薬が無い場合

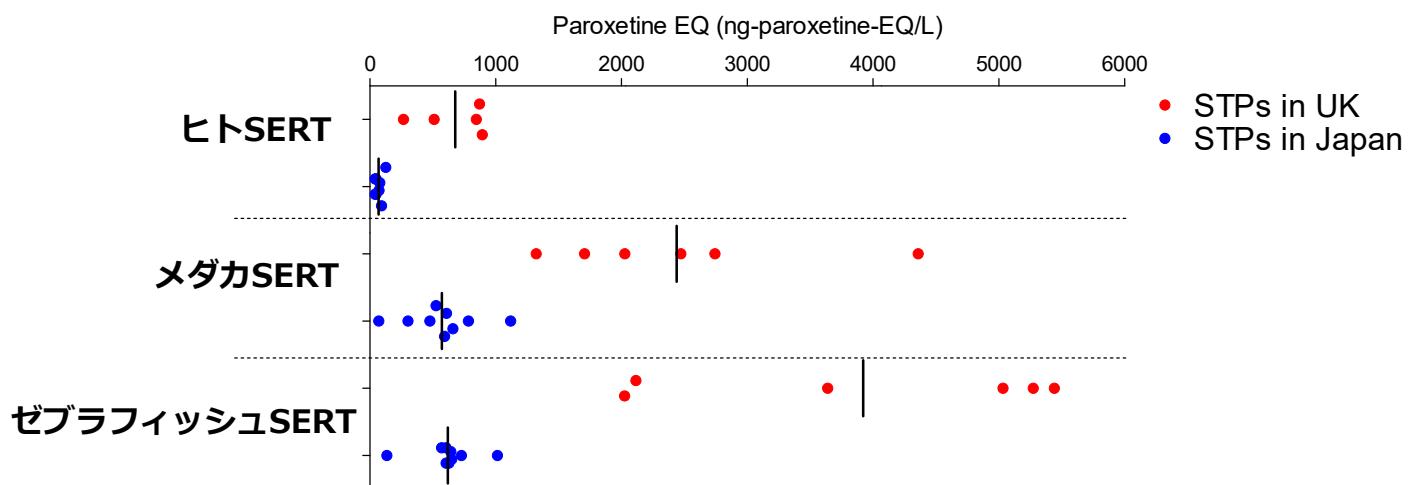
抗うつ薬が有る場合



⇒ APPの蛍光を測定することによって、抗うつ薬の生理活性を定量する

下水での抗うつ薬活性値(当量値EQ)、イギリスと日本の比較

- 4 STPs in Japan, in 2018 August, and 2019 December
- Oxford, Aylesbury, and Benson STPs, in 2019 September



- ✓ UKの下水の方が、日本の下水よりもSERTに対する阻害活性が強い
- ✓ メダカとゼブラフィッシュの方がヒトSERTよりも強く阻害を受ける

1) Ihara et al., STOTEN, 2021; 2) Zhang et al., ES&T, 2023

- ①なぜ医薬品が問題か
- ②海外での検出事例
- ③医薬品の薬理活性
- ④水生生物に対して薬理活性の強い医薬品
- ⑤魚の医薬品曝露試験と行動・繁殖異常

今後の課題

- ✓ 医薬品の類型と構造の関係を把握する
- ✓ ヒトと魚でなぜ医薬品の活性が異なるのか、医薬品と受容体の構造のどこに起因するのかを調べる
- ✓ 医薬品曝露によるメダカの行動異常の精緻な観察、試験法の確立
- ✓ 表層遊泳以外の行動や繁殖の影響の解明
- ✓ 医薬品によって影響を受ける神経系の解明

ご清聴ありがとうございました

ラボメンバー、共同研究者(敬称略)

高知大学
井原満理子

京都大学
Zhang Han(現 大連工科大学)
加藤大典(現 日立)
韓旻光
花本征也(現 金沢大学)
中田典秀(現 神奈川大学)
田中宏明

長崎大学
征矢野清
長江真樹
蓮平裕次(現 高知大学)

東京理科大学
宮川信一

広島大学
豊田賢治

本研究は、琵琶湖淀川研究基金、フソウ財団、科研費基盤B、科研費基盤A、環境再生保全機構環境研究総合推進費(5-1952, 5-2204)の支援を受けて実施しました。