

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

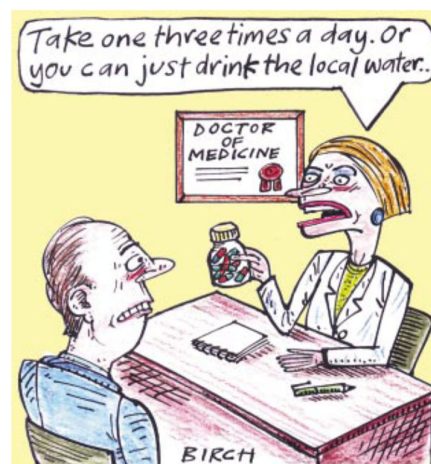
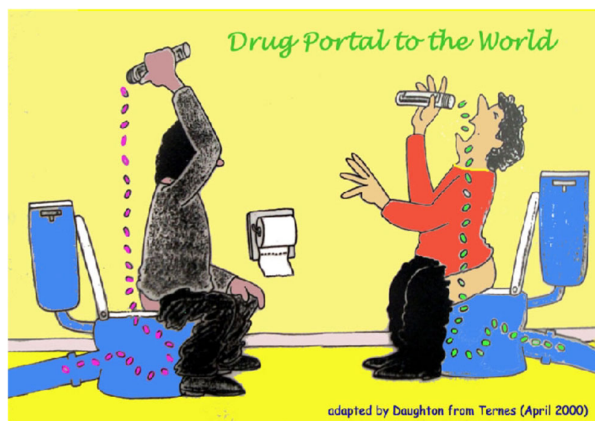


2

- 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

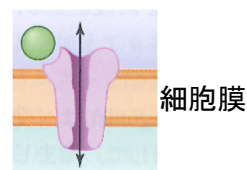
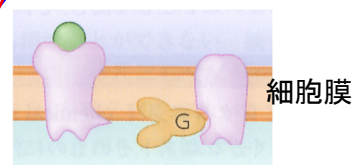


Nature, 424, 5, 2003

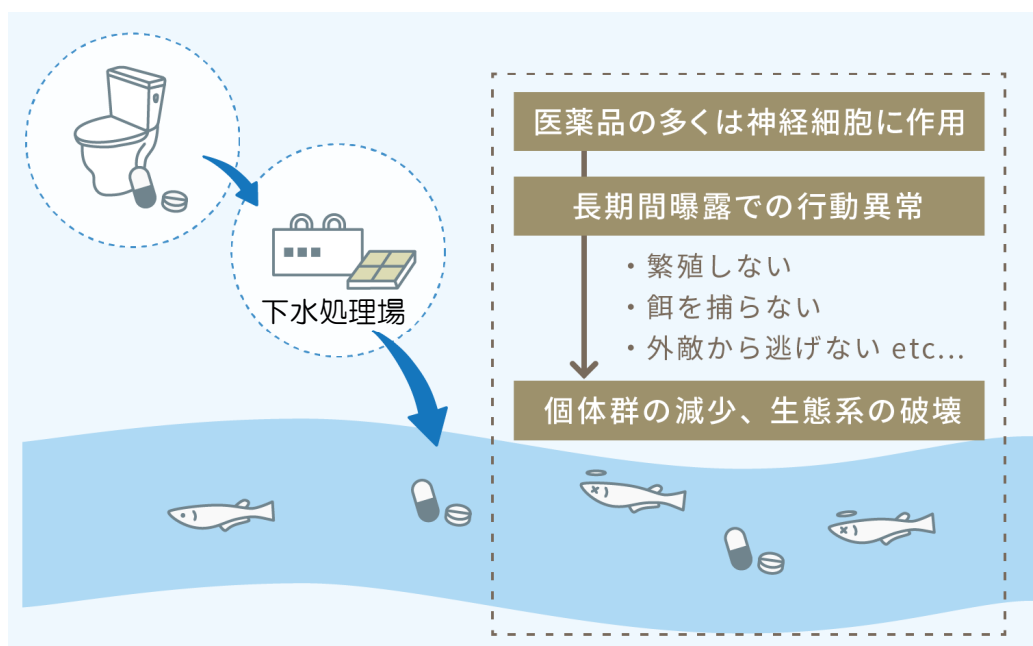
医薬品の約半数はGPCR阻害薬/抗うつ薬

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	✓ モノアミン トランスポーター
10	抗うつ薬	29	
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

- 用量 \updownarrow dose \updownarrow 高 低
- ✓ **Lethality 致死性**
 - ✓ **Sub-lethal toxicity** "not lethal, but unhealthy" (死なないけど、健康ではない)
 - ✓ 発癌性 carcinogenicity
 - ✓ 催奇形性 teratogenicity
 - ✓ 生殖異常 reproduction disorder
 - ✓ 免疫系異常 immune system malfunction
 - ✓ 行動異常 behavior abnormality

個体の異常 \Rightarrow populationの減少 $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow$ 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

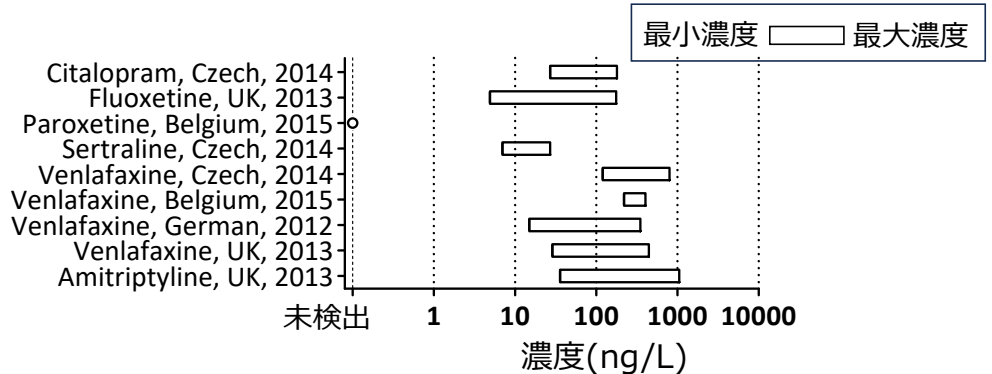
8

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。

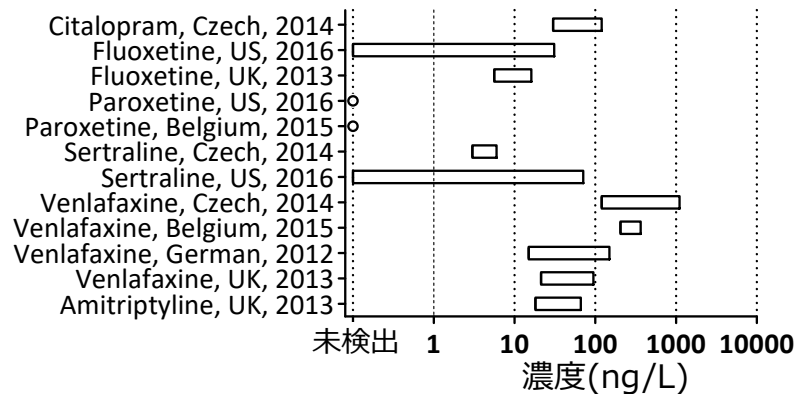


下水処理場の放流水

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。



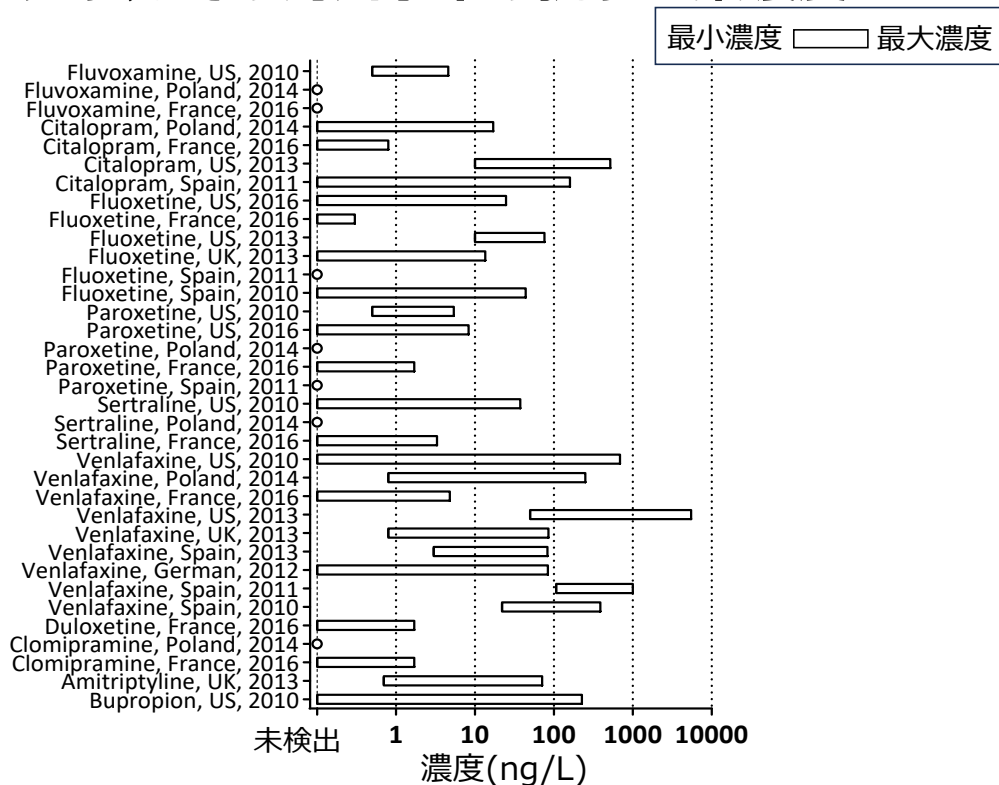
ヨーロッパ、アメリカでの河川水中の抗うつ薬濃度

9

濃度範囲

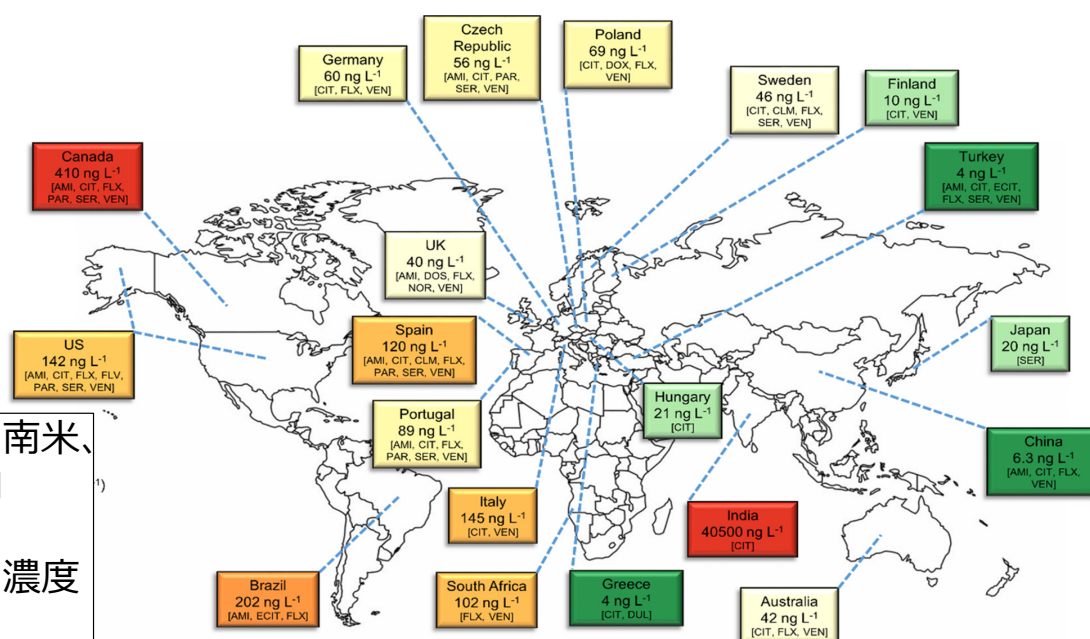
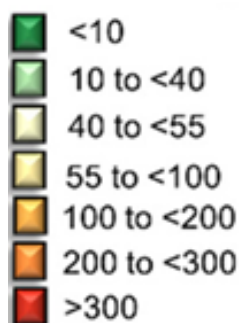
0.1~1,000ng/L

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

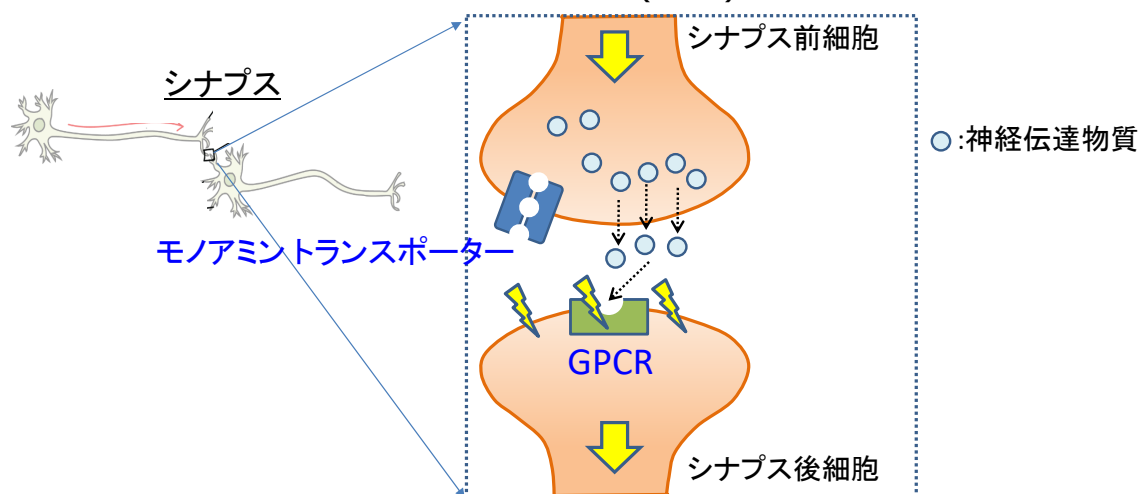
③**医薬品の薬理活性**

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とモノアミントランスポーターの機能

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

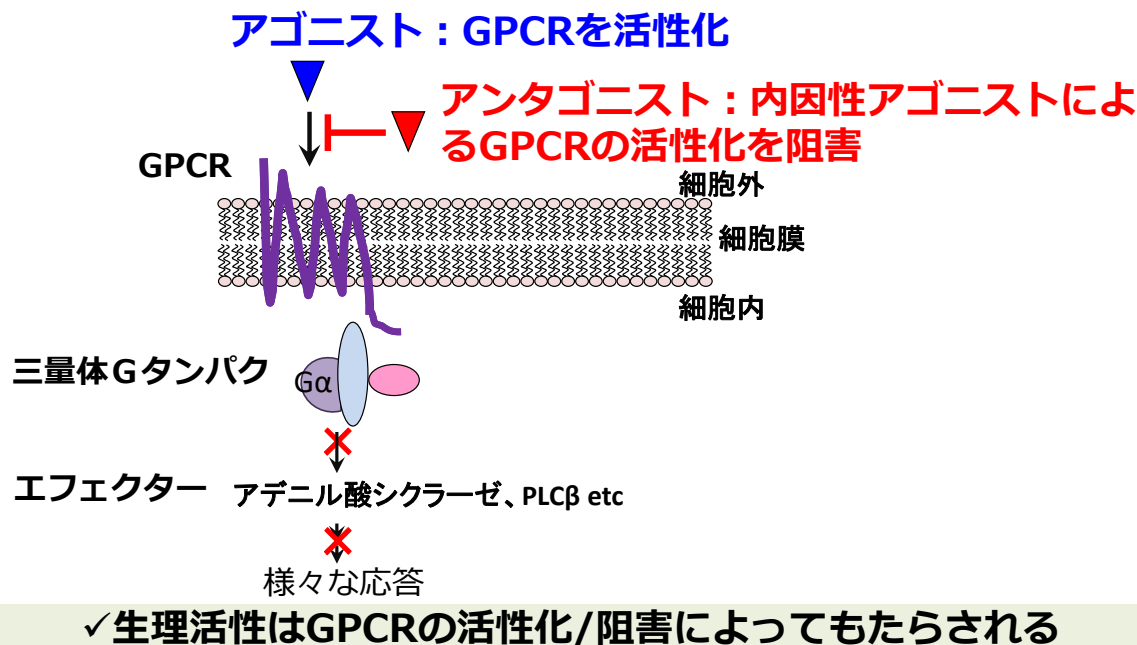


- ① 神経伝達物質が放出される
- ② 神経伝達物質がGPCRと結合、シグナルが伝わる
- ③ トランスポーターが神経伝達物質を回収する
- ④ シグナルが止まる

G-protein-coupled receptors (GPCRs)

13

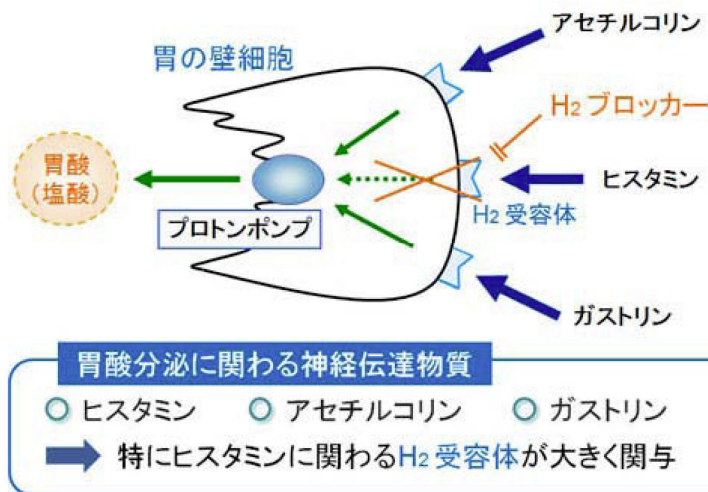
- ✓ GPCRは、細胞外から運ばれてくるホルモンや成長因子、神経伝達物質と結合、細胞内へシグナルを伝達



GPCRを標的とした医薬品の例：ガスター

14

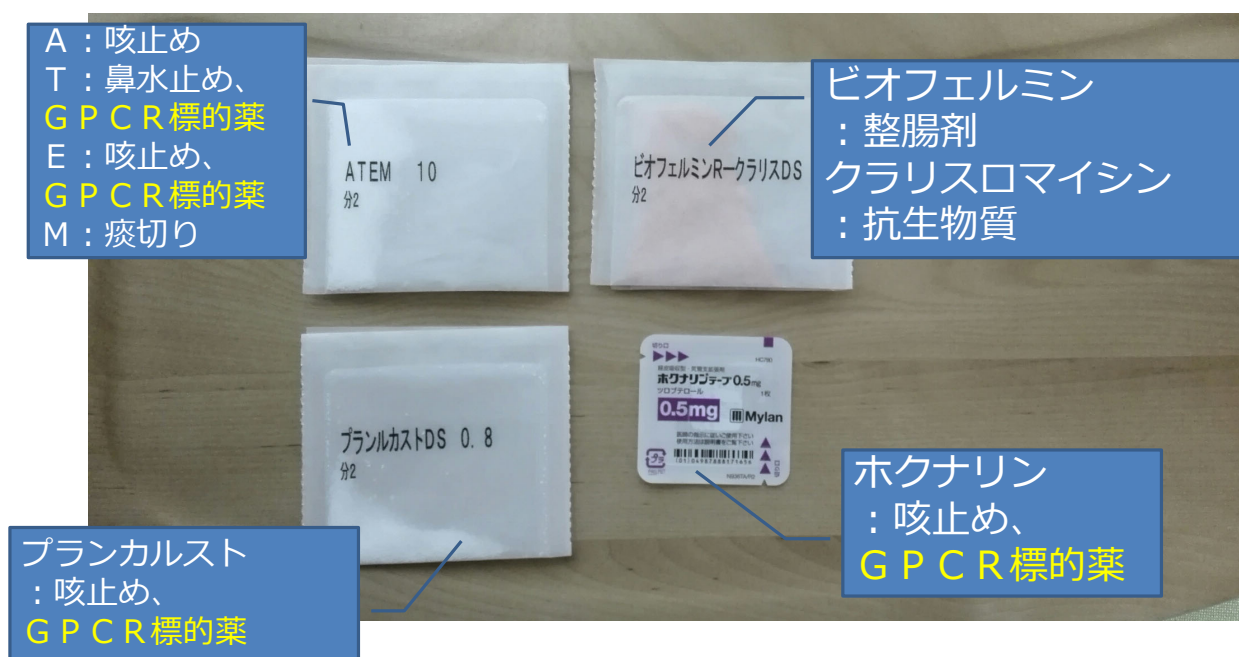
- ✓ガスター(ファモチジン)：H₂受容体のアンタゴニスト
- ✓ヒスタミンがH₂受容体に作用すると大量の胃酸が分泌されるが、ガスターはヒスタミンの結合をブロックすることで胃酸分泌を抑制する



昔、胃腸風邪に罹った時に、



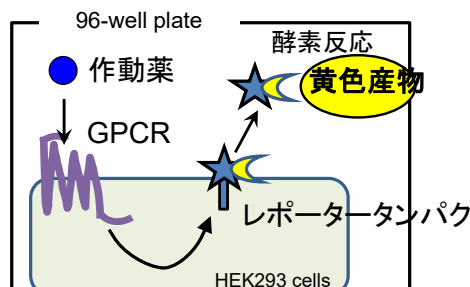
娘(1歳7ヶ月、当時)も胃腸風邪に罹りまして、、、



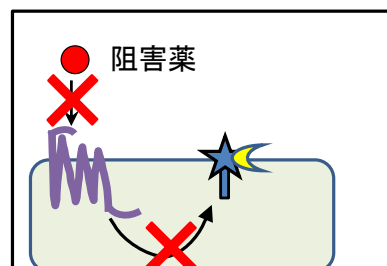
GPCR阻害薬の活性測定試験: TGF α shedding assay

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 ⇒ 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 ⇒ GPCR阻害薬を定量可能

⇒ 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

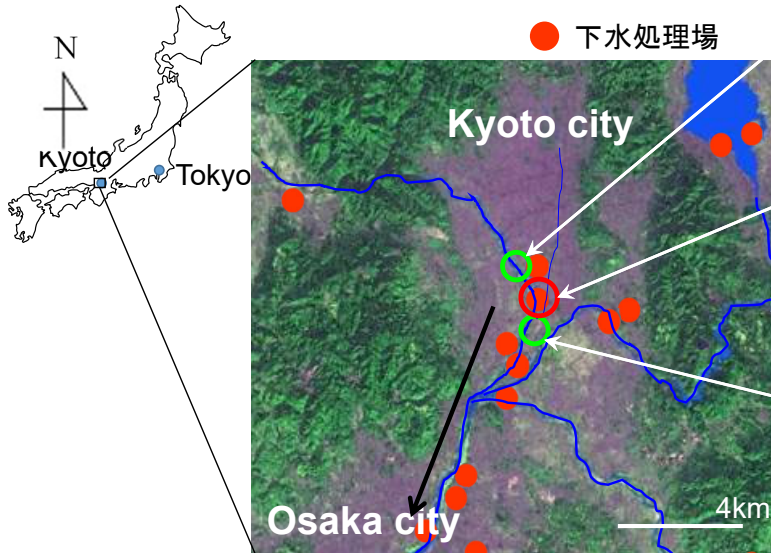
受容体	受容体クラス	主要医薬品	受容体	受容体クラス	主要医薬品
AT1	アンジオテンシン	・抗高血圧薬 ・平滑筋作用薬	V1A	バソプレッシン	・平滑筋作用薬 ・利尿薬
D2	ドーパミン	・抗精神病薬	V2	ヒスタミン	・鼻アレルギー治療薬 ・消化性潰瘍治療薬
D4			H1		
$\alpha 1B$	アドレナリン	・抗高血圧薬 ・気管支拡張薬	H2		
$\alpha 2A$			H3		
$\beta 1$			5-HT1A	セロトニン	・平滑筋作用薬 ・鎮静睡眠薬
$\beta 3$			5-HT2C		
M1	アセチルコリン	・気管支拡張薬	CB1	カンナビノイド	・薬物依存治療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

✓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



桂川上流域



✓下水処理場



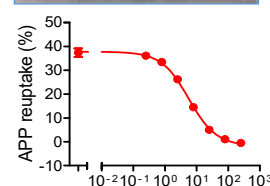
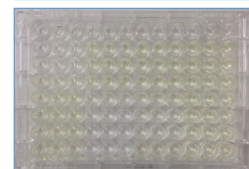
桂川下流域



水試料の前処理、GPCRアッセイ



例:「オルメサルタン1,000 ng/Lに相当」

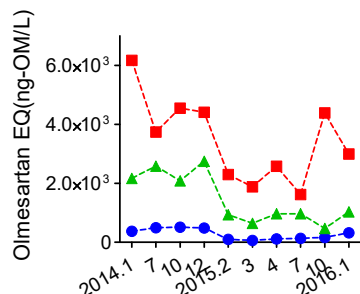


下水/河川水濃縮倍率

下水、河川水での医薬品濃度(当量値EQ)

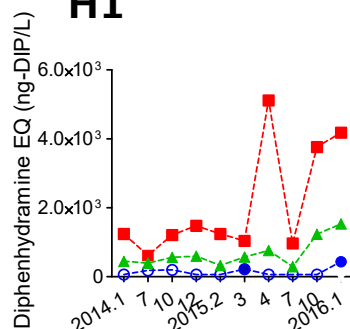
ヒト

アンジオテンシン受容体
AT1



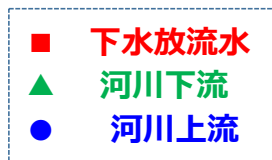
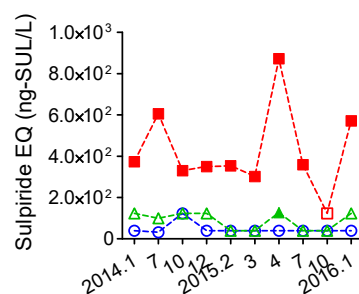
ヒト

ヒスタミン受容体
H1



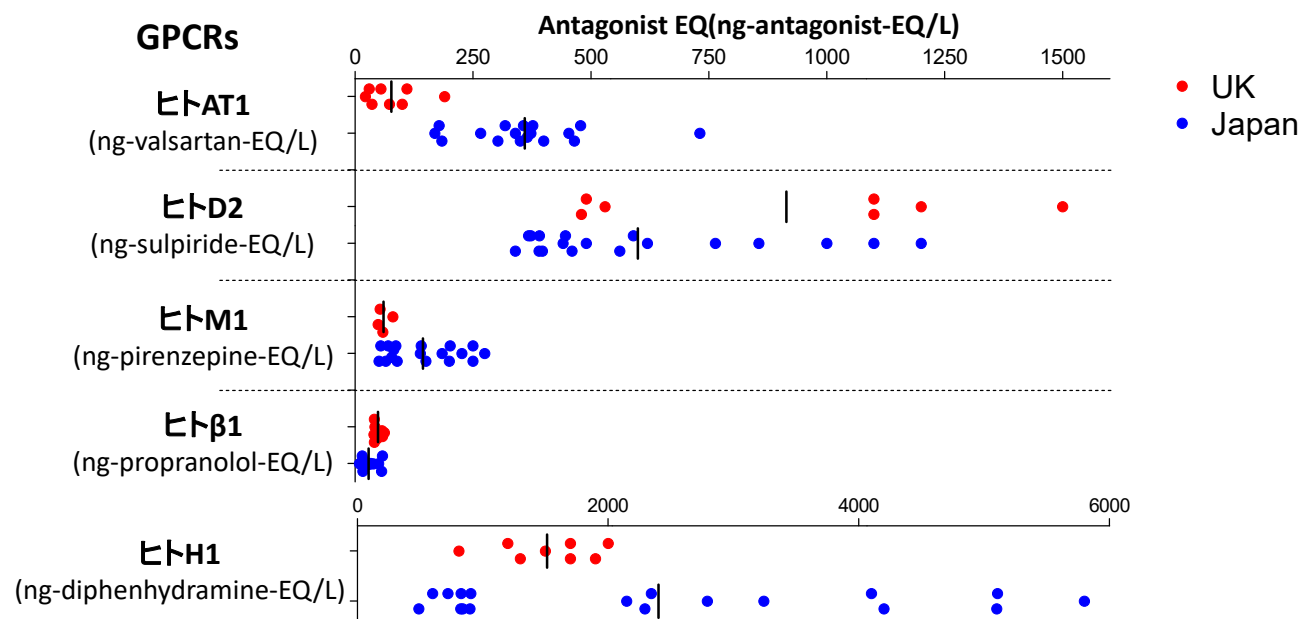
ヒト

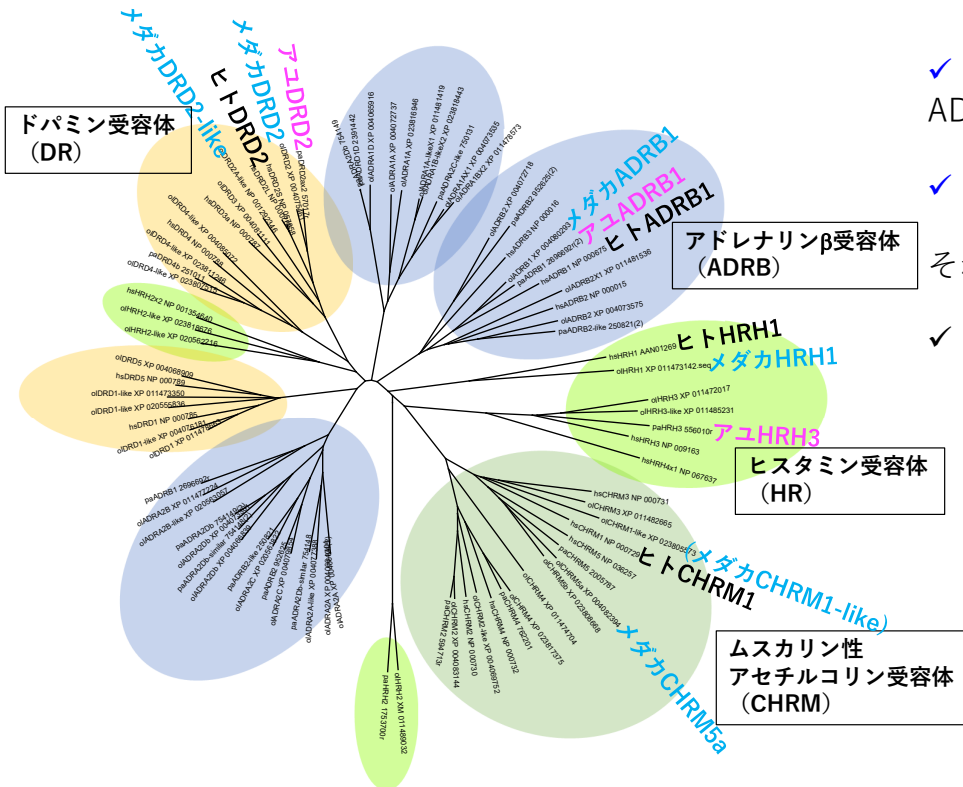
ドーパミン受容体
D2

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.



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

✓ **アユ** : HRH3, DRD2, ADRB1

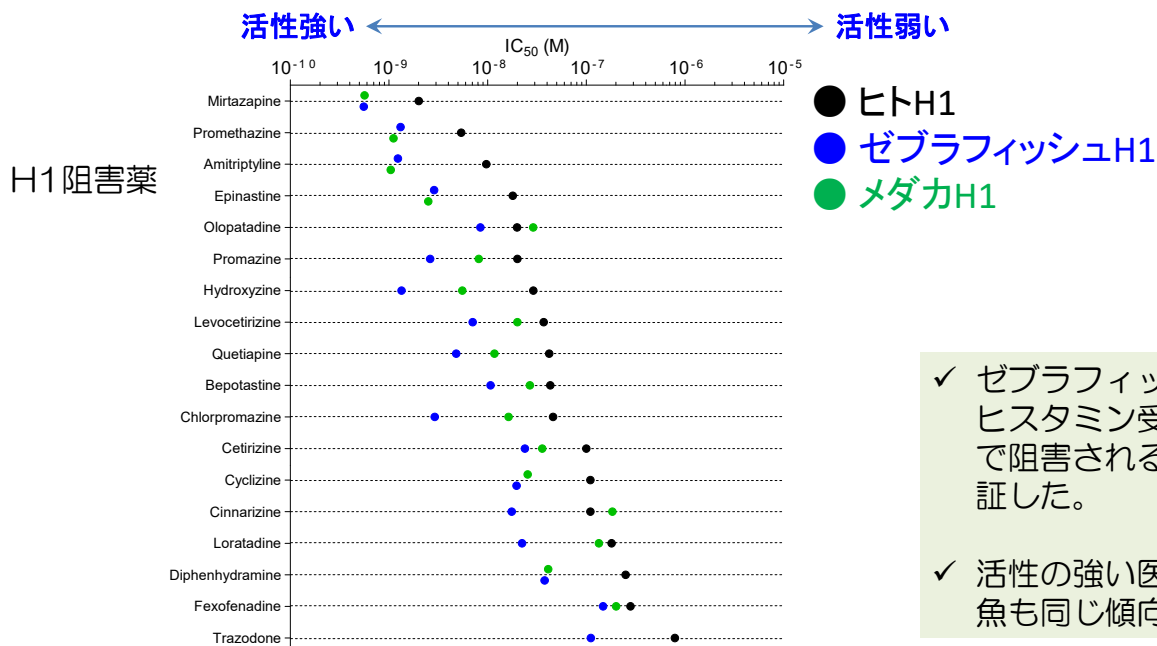
それぞれクローニングした。

✓ 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かった

ヒスタミン受容体に対するGPCR阻害薬の50%阻害値

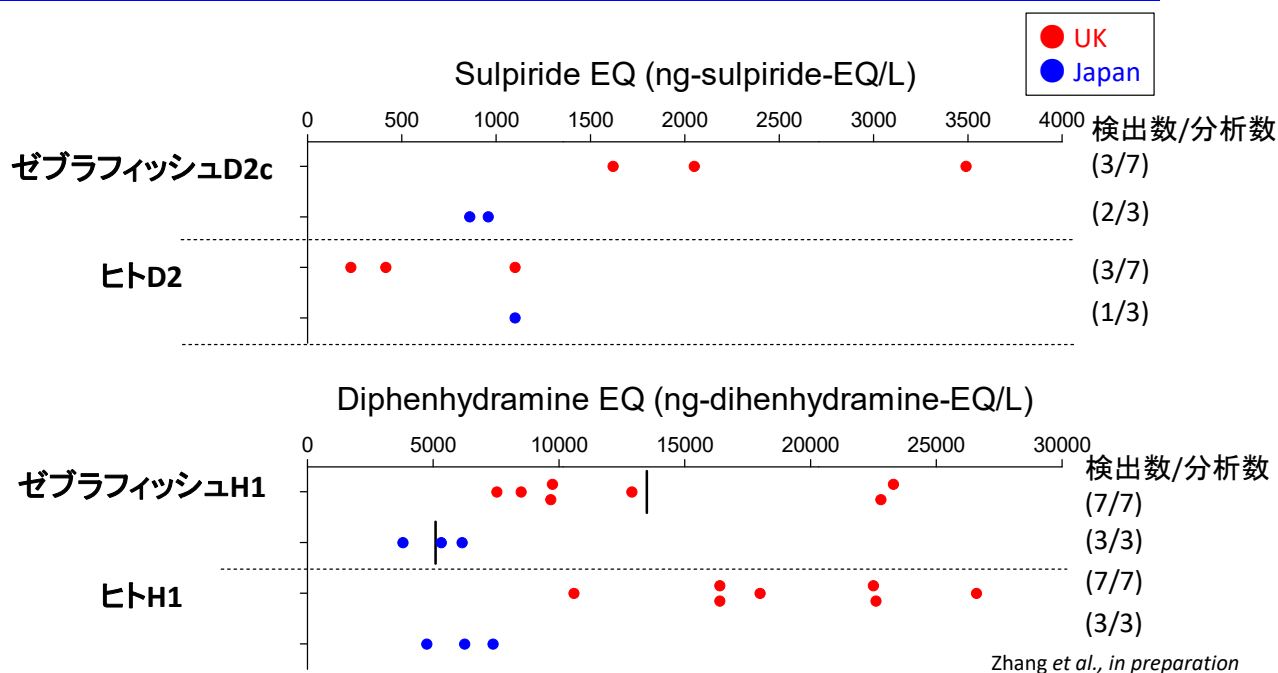
- ✓ 宮川先生によるメダカ受容体の発現ベクターの構築
- ✓ ゼブラフィッシュ需要胚はGenBank登録配列より人工合成



✓ 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



✓ 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

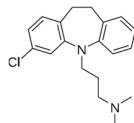
- ①なぜ医薬品が問題か
- ②海外での検出事例
- ③医薬品の薬理活性
- ④水生生物に対して薬理活性の強い医薬品
- ⑤魚の医薬品曝露試験と行動・繁殖異常

抗うつ薬：モノアミントランスポーター阻害薬

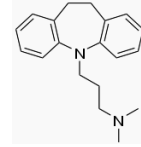
✓ 水環境で最も頻繁に検出される人用医薬品の一つ

三環系抗うつ薬 Tricyclic antidepressants (TCAs)

Clomipramine

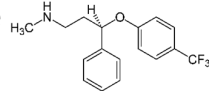


Desipramine

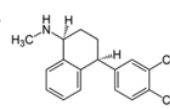


選択的セロトニン再吸収阻害剤 Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs)

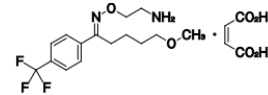
Fluoxetine



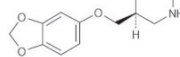
Sertraline



Fluvoxamine

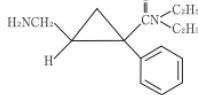


Paroxetine

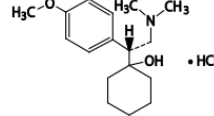


セロトニン-ノルエピネフリン再吸収阻害剤 (SNRIs)

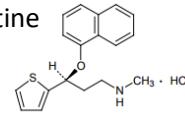
Milnacipran



Venlafaxine

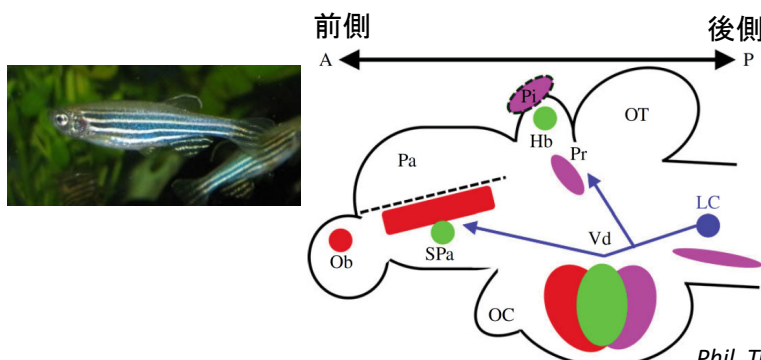


Duloxetine



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



赤: ドーパミン
 緑: アセチルコリン
 紫: セロトニン
 青: ノルエピネフリン

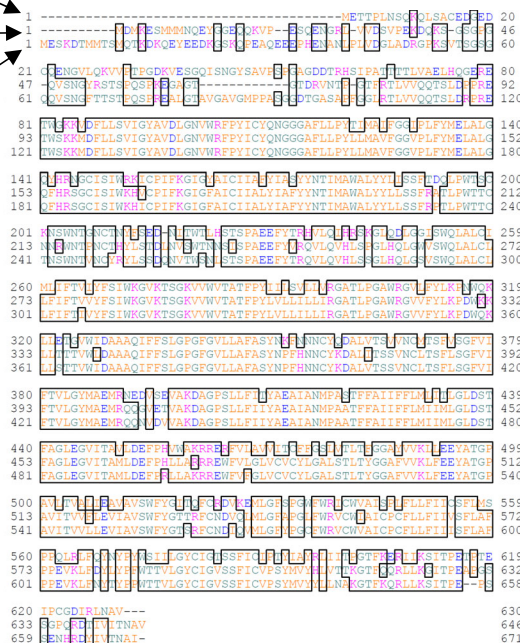
Phil. Trans. R. Soc. B, 2014, 369, 20120462

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



ヒト
ゼブラフィッシュ
メダカ



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ための培養細胞試験: モノアミントランスポーター阻害アッセイ¹⁾ ³⁰

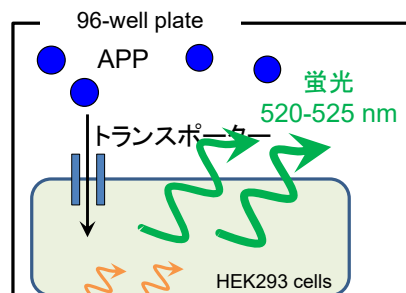
✓ APP: fluorescent substrate of transporter

(J. Biological chemistry, 2012, 287, 8852-8863)



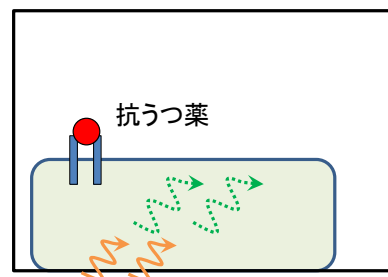
1. HEK293 細胞へトランスポーター発現プラスミドを導入
2. 細胞を医薬品とAPPへばく露 (1h)
3. 細胞を洗浄、細胞外の APP を除去する
4. 細胞内の APP 蛍光をプレートリーダーで測定

下水中に抗うつ薬が無い場合



Excitation, $\lambda = 485 \text{ nm}$

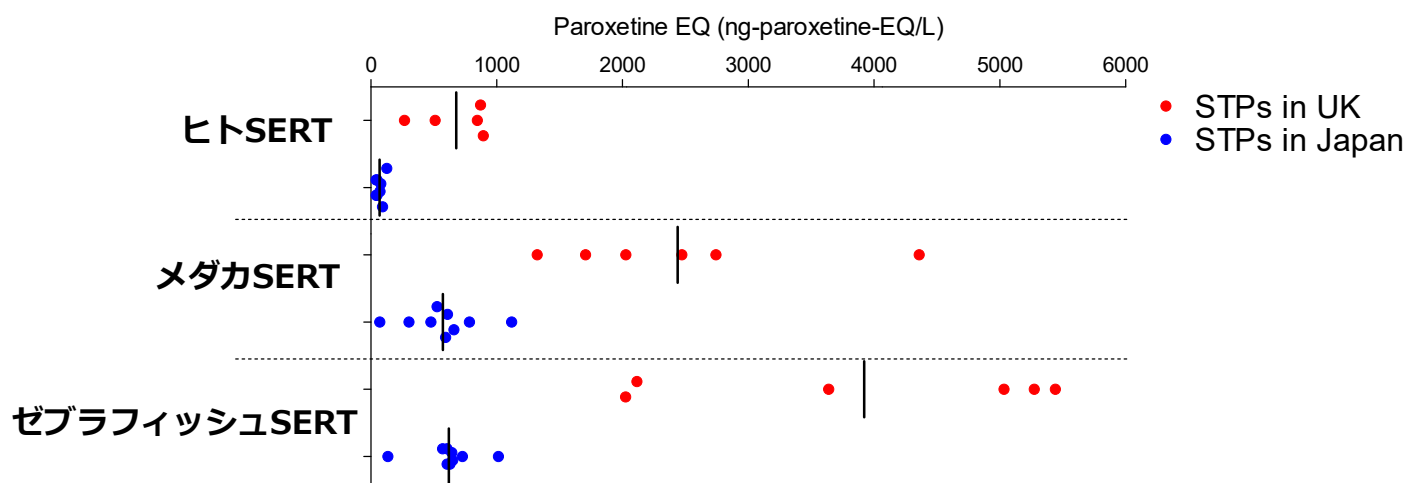
抗うつ薬が有る場合



⇒ 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

長崎大学

征矢野清

長江真樹

荻平裕次(現 高知大学)

東京理科大学

宮川信一

広島大学

豊田賢治

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

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。