

2014.3.20 琵琶湖・淀川水質保全機構 H25年度成果報告会

下水中の医薬品類、農薬の生理活性に関する研究

京都大学大学院工学研究科附属
流域圏総合環境質制御研究センター
井原 賢

背景 下水中の医薬品類の活性測定の意義

- ✓世界中で下水からの医薬品類の検出報告、多数あり
- ✓放流先水域における生物影響が懸念
ex) 選択的セロトニン再吸収阻害剤(SSRI)による魚の行動異常

↓

下水から検出される医薬品類は医薬品としての活性を示すのか？

しかし、
これまで、簡便なアッセイ方法がないため調べることができなかった

背景 Gタンパク連結型受容体(G Protein Coupled Receptor: GPCR)

- ✓市販薬の半数以上がGPCRを標的としている
- ✓受容体の中で最大の遺伝子ファミリーを形成(ヒトゲノム上に800種以上)
- ✓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
- ✓Gタンパクを介して遺伝子発現や細胞内シグナル伝達を制御

Nature 2012, 492, 57-

GPCRのシグナル経路

細胞内代謝、分泌、運動性、分化、増殖、浸潤、血管新生
Cancer Genomics and Proteomics, 2012 vol. 9 no. 1 37-50 より改変

背景 GPCRを標的とする医薬品類

大分類	小分類	薬物例	標的GPCR
自律神経系薬	アセチルコリン受容体作動薬 (agonist)	ベタネコール、ピロカルピン、等	M受容体 (agonist)
	アセチルコリン受容体遮断薬 (antagonist)	アトロピン、ピレンゼピン、等	M受容体 (antagonist)
平滑筋作用薬	気管支拡張薬、気管支喘息治療薬	サルブタモール等 サルメテロール等 エビネフリン、インプロテレンール、等 イプラトロピウム、等 モンテルカスト、等	β受容体 β受容体 β, α受容体 M受容体 L受容体
	循環器系薬	高血圧薬治療薬	ブラゾリン、プロプラノロール、 アテノロール、メプロロール、 カルベジロール、 カンデルサルタン、ロサルタン、等
	狭心症治療薬	ブラゾリン、プロプラノロール、 アテノロール、メプロロール、等	β, α受容体
	抗不整脈薬	プロプラノロール、ソタロール、等	β受容体
	利尿薬	パソプレシン、等 ユニパタン、等	V受容体 V受容体

カッツング薬理学(丸善出版)より引用

背景 TGFA shedding assayの開発

- ✓東北大学薬学研究科 井上先生、青木先生によって開発
- ✓GPCRの活性化を検出する世界初のレポーター遺伝子アッセイ

Inoue *et al.* Nature Methods (2012)
TGFA shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation

Gタンパク質共役型受容体の活性化を網羅的に検出する手法を確立 ~新しくすりの開発に貢献~

- くすり開発の重要な標的分子であるGタンパク質共役型受容体に関して、新しい活性化検出法を開発
- 既存の手法を大幅に上回る検出効率であることを実証
- 3種類のGタンパク質共役型受容体について、活性化分子を初めて同定
- 新しくすりの開発の効率化へ期待

下水中の医薬品類の活性検出に適用出来ないか？
井上先生、青木先生にお願いしてアッセイ系の提供を受ける

目的

7

TGfα shedding assayを環境水試料に適用して
GPCRに対する活性の有無を調べる

方法

TGfα shedding assayの原理

8

✓ GPCRが活性化されると黄色に発色 ⇒ 下水のagonist活性の検出
 ✓ アゴニストによるGPCRの活性化が阻害されると黄色に発色しない ⇒ 下水のantagonist活性の検出

1. ヒト培養細胞にプラスミド導入
2. 試料曝露
3. プレートリーダーで405 nm吸光度測定

方法

本研究で選択した受容体一覧

9

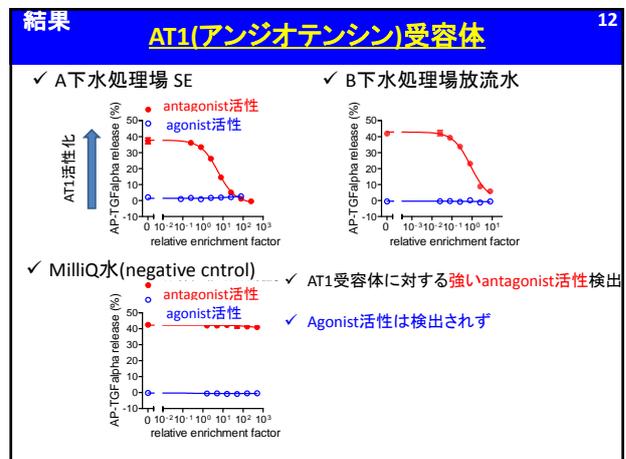
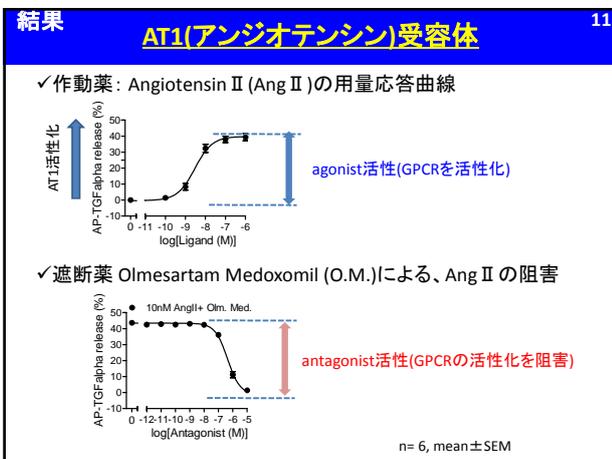
受容体	受容体クラス	アゴニスト (作動薬)	アンタゴニスト (遮断薬)	アッセイでアゴニストによって誘発される Gタンパク質シグナル経路		
				Gαq	Gα12/13	Gα16
AT1	Angiotensin	Angiotensin II	Olemsartan Medoxomil	○	○	
D2	Dopamine	Dopamine	Sulpiride	○ (with Gαq/11)		
α1B	Adrenoceptors	Norepinephrine	Carvedilol	○ (with Gαq/11)		
α2A				○ (with Gαq/11)		
β1			Metoprolol, Atenolol	○ (with Gαq/s)		
M1	Acetylcholine	Acetylcholine	Pirenzepine	○	○	
V1A	Vasopressin & oxytocin	Vasopressin		○	○	
H2	Histamine	Histamine				○ (with Gα16)
5-HT1A	5-Hydroxy-tryptamine	Serotonin		○ (with Gαq/11)		
CB1	Cannabinoid	CP-55940			○	

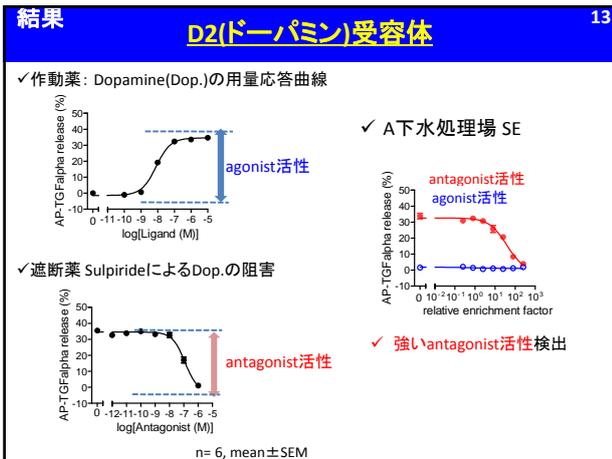
方法

試料の採水、前処理

10

- ✓ 下水二次処理水: 3~9L
 - ・滋賀県A下水処理場(2012年10月、12月、2013年3月、12月)
 - ・京都市B下水処理場(2014年1月)
- ✓ 河川水: 3L
 - ・桂川上流域C橋、下流域D橋 (2014年1月)
- ✓ 固相抽出による濃縮
 - ・Oasis HLB cartridge
 - ・250倍~5000倍濃縮
 - * PPCP機器分析の濃縮方法に準拠





考察 14

「内分泌攪乱作用」との比較

✓ 「**エストロゲン受容体を通じた内分泌攪乱作用**」
原因物質は天然のエストロゲンおよびエストロゲン様物質、
つまり**agonist活性が問題であった。**
(antagonist活性の生物影響はこれからの研究)

✓ 「**GPCRに対する作用**」
Antagonist活性が強い。
医薬品の多くが遮断薬としてデザインされていることを反映
内分泌攪乱の問題とは、本質が異なる。

まとめ 15

✓ 下水から多くの種類のGPCRに対する
アゴニスト活性、アンタゴニスト活性が検出された

✓ 特にAT1受容体に対するアンタゴニスト活性が強い

✓ 受容体特異的な活性と思われる
⇒ 受容体と特異的に結合する物質が存在

今後の課題

✓ 下水処理過程で活性はどう変化する？

✓ 下水処理水の河川への影響はどれくらいあるのか？

✓ 他の処理場では？季節変動あるのか？

✓ 消毒過程(塩素、オゾン、UV等)で活性はどう変化する？

✓ 原因物質は？

✓ 農業は活性を示さないか？

..... etc

⇒ 来年度の研究助成でこれらの課題に取り組みたい

謝辞 16

✓ 研究助成いただいた琵琶湖・淀川水質保全機構に
深く感謝いたします。

✓ TGFα shedding アッセイを提供いただき、技術指導いただいた
東北大学薬学研究科 井上飛鳥助教、青木淳賢教授に
深く感謝いたします。

17

ご清聴ありがとうございました。