

2015.3.5 琵琶湖・淀川水質保全機構 H26年度成果報告会

下水からの医薬品生理活性の検出

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 2

環境水中の医薬品、新たな研究の必要性

- ✓ 国内外における環境水からの医薬品の検出報告、これまでに多数 (ng~μg/Lの濃度で検出)
- ✓ 医薬品は**生理活性**を持つようにデザインされている
 ⇒低濃度であっても、放流先の(水生)生物への影響が懸念される

今後明らかにすべきことは、
環境水中の医薬品が
 ヒトや生態系に悪影響を及ぼすレベルに達しているのか？

この問いに答えるには、以下の点を明らかにせねばならない

- ✓どの程度の生理活性を示すのか？
- ✓現在の機器分析の対象の医薬品だけで調査対象として十分なのか？

しかし、
 これまで、生理活性(≠致死性、成長阻害、産卵数)を検出できる
 簡便なアッセイ方法がなかったため、検証されてこなかった

背景 3

GPCRに作用する医薬品の生理活性の基盤

- ✓ 多くの医薬品の標的: Gタンパク共役型受容体(G Protein Coupled Receptor :GPCR)
- ✓ 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
 アンタゴニスト: 内因性アゴニストによる GPCRの活性化を阻害

GPCR

細胞外

細胞膜

細胞内

三量体Gタンパク

α

エフェクター アデニル酸シクラーゼ、PLCβ etc

様々な応答

✓生理活性はGPCRの活性化/阻害によってもたらされる

日本におけるGPCRを標的とした医薬品売上 (2008) (提供: 大塚薬科大 東先生) 4

ランク	販売元	市販名	成分名	効能	標的GPCR
1	武田	プロレス	Candesartan cilexetil (カンデサルタンシレキセチル)	高血圧	AT 受容体 (アンタゴニスト)
7	Astellas	ミカルヂス	Telmisartan (テルミサルタン)	高血圧	AT1 受容体 (アンタゴニスト)
7	第一三共	オルメテック	Olmesartan medoxomil (オルメサルタンメドキシメド)	高血圧	AT1 受容体 (アンタゴニスト)
10	Astellas	ガスター	Famotidine (ファモチジン)	胃・十二指腸潰瘍	H2 受容体 (アンタゴニスト)
33	第一三共	アーチスト	Carvedilol (カルベジロール)	高血圧	α1β 受容体 (アンタゴニスト)
34	小野	オノン	Prenilokast hydrate (プレニロカスト水和物)	アレルギー・喘息	LT 受容体 (アンタゴニスト)
36	Astellas	セロクエル	Quetiapine fumarate (クエチアピン fumarate)	統合失調症	D2, 5-HT1A, α1, α2, H1 etc. (アンタゴニスト)
37	キヨーリン	キプレス	Montelukast Sodium (モンテカストナトリウム)	アレルギー・喘息	LT1 受容体 (アンタゴニスト)
42	協和発酵キリン	アレロック	Olopatadine hydrochloride (オロパタジン塩酸塩)	アレルギー・痒疹	H2 and H3 受容体 (アンタゴニスト)
89	田辺三菱	メインアート	Bisoprolol fumarate (ビソプロロール fumarate)	高血圧	β1 受容体 (アンタゴニスト)

✓多様なGPCRを標的としている、アンタゴニストが多い

背景 5

GPCRの活性化/阻害を検出できる簡便なアッセイの開発

Asuka Inoue et al., Nature Methods, 2012
 TGFα shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation

- ✓ 東北大学薬学研究科 井上先生、青木先生らによって開発
- ✓ In Vitro レポータージーンアッセイ
- ✓ 104種類のGPCRの活性を検出可能 (リガンド既知のGPCRは116種類)

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~

↓

下水中の医薬品の生理活性(GPCRの活性化または阻害)の検出に
 応用出来ないか？

目的 6

- TGFα shedding assayを適用して、
 下水処理場放流水および放流先河川における
 医薬品の生理活性の有無、程度を調べる

方法 TGF α shedding assayの原理

✓培養細胞を用いた*in vitro*アッセイ

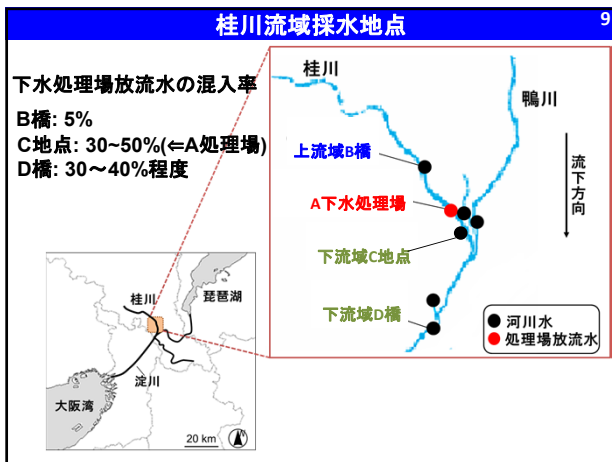
1. HEK293細胞にプラスミド導入
2. 試料曝露
3. プレートリーダーで405 nm吸光度測定

✓ Conditioned medium (CM) 黄色に発色 ⇒ 下水にアゴニストが存在
✓ CMのアゴニストによる黄色の発色が阻害 ⇒ 下水にアンタゴニストが存在

本研究で選択した19種類のGPCR

✓これまでに出検されている医薬品が標的とするGPCRだけでなく、これまで機器分析の対象となっていない医薬品が標的とするGPCRも選択

受容体	受容体クラス	主要薬物	受容体	受容体クラス	主要薬物
AT1	Angiotensin	・抗高血圧薬 ・平滑筋作用薬	V1A	Vasopressin & oxytocin	・平滑筋作用薬 ・利尿薬
D2	Dopamine	・抗精神病薬	H1	Histamine	・鼻アレルギー治療薬 ・消化性潰瘍治療薬
D4			H2	Histamine	
α 1B		・抗高血圧薬	H3		
α 2A	Adrenoceptors	・アドレナリン受容体遮断薬、作動薬 ・気管支拡張薬	5-HT1A	5-Hydroxytryptamine	・平滑筋作用薬 ・鎮静睡眠薬
β 1			5-HT2C		
β 3			CB1	Cannabinoid	・薬物依存治療
M1	Acetylcholine	・アセチルコリン受容体遮断薬、作動薬 ・気管支拡張薬	EP3	Prostanoid	・平滑筋作用薬
M3			BLT1	Leukotriene	・平滑筋作用薬

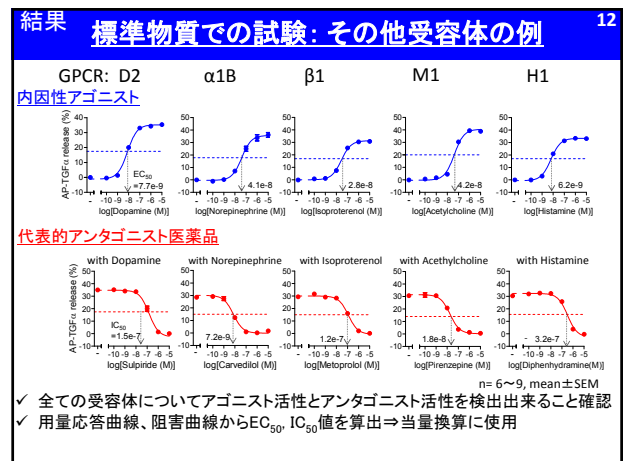
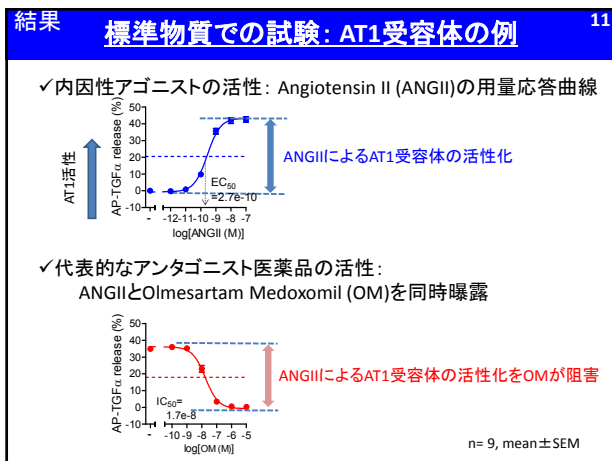


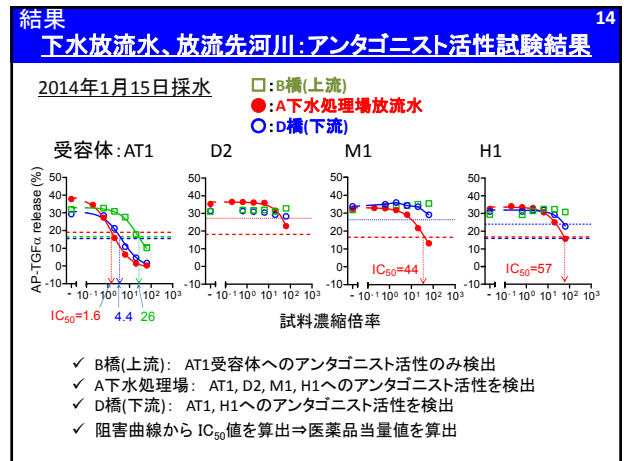
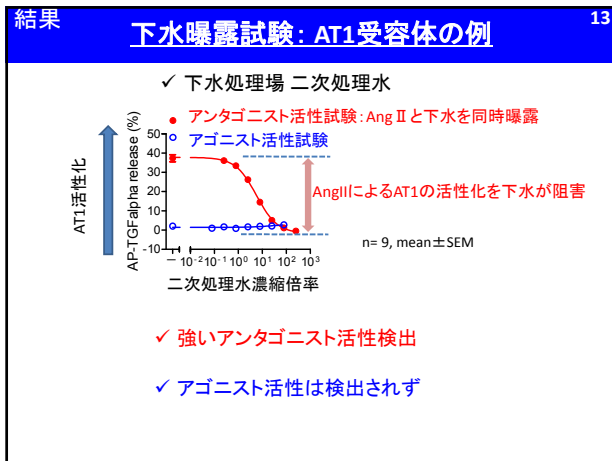
方法 試料の採水、前処理

✓下水処理場放流水、河川水: 3L
・2014年1月、7月、10月、12月、2015年2月

✓固相抽出による濃縮
・Oasis HLB cartridge
・2000倍濃縮
* PPCP機器分析の濃縮方法に準拠

Shedding assay
細胞への曝露



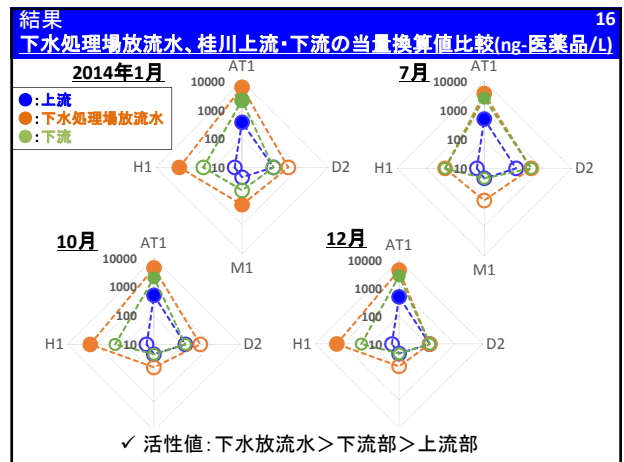


結果 15
A下水処理場放流水のアンタゴニスト活性

↓ アンタゴニスト活性

受容体	受容体クラス	医薬品当量換算値
AT1	Angiotensin	↓ 6.1 × 10 ³ ng-OM/L
D2		↓
D4	Dopamine	—
α1B		—
α2A	Adrenoceptors	—
β1		—
β3		—
M1	Acetylcholine	↓ 2.1 × 10 ² ng-PIR/L
M3		—
V1A	Vasopressin	—
V2		—
H1		↓ 1.5 × 10 ³ ng-DIP/L

下水放流水から多種のGPCRに対するアンタゴニスト活性を初めて検出、定量^(*) (ES&T, 2015, 49, 1903-1911)



17
まとめ、今後の課題

- ✓ TGFα Shedding assayによって下水から**受容体特異的な活性**を検出
- ✓ AT1, D2, β1, α1B, M1, H1, V2受容体に対する**アンタゴニスト活性**、**α2A**受容体に対する**アゴニスト活性**
- ⇒ 将来の研究において、毒性試験および環境モニタリングの対象として優先すべき医薬品を提案できる (例) βブロッカー以外のGPCR作用型医薬品
- ⇒ 得られる活性値から、将来的に、『環境水中の医薬品がヒトや生態系に悪影響を及ぼすレベルか否か』を判定できると期待
- ✓ 下水処理場放流水の放流先河川からも活性を検出、上流部に比べて下流部で高い
- ⇒ 淀川流域の他の下水処理場、他の河川地点での状況は?
- ⇒ 季節変動は?
- ⇒ 来年度の研究助成でこれらの課題に取り組みたい

18

ご清聴ありがとうございました。

- ✓ 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所 井上飛鳥助教、青木淳賢教授に深く感謝いたします。