

下水中の医薬品類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研究センター
 井原 賢

1. はじめに

これまで、環境水の医薬品類の汚染実態が国内外で数多く報告されており、河川水や下水処理場の放流水などからは最大で $\text{ng/L} \sim \mu\text{g/L}$ のオーダーの濃度で検出されている^{1) 2)}。医薬品類は低濃度であっても生体内で特異的な生理活性を発揮するようにデザインされており、ヒトを含む生態系に悪影響を与える可能性が懸念されている。環境水に含まれる医薬品類の悪影響を評価するには、その‘生理活性’の有無を把握することが必須であるが、環境水から医薬品類の生理活性が検出されるか否かを調べる研究はこれまで行われてこなかった。理由は、環境水へ適用可能な、生理活性を検出する簡便なアッセイ系が存在しなかったからである。

細胞は外界からの刺激を受けて様々な応答をする。細胞膜上にあつて細胞外からの刺激を受け取るタンパク質を受容体と呼び、その中でも G タンパク連結型受容体 (G protein coupled receptor: GPCR) と呼ばれる一群の受容体が最も重要な役割をになっている。GPCR はヒトゲノム上に 800 種類以上存在することが知られており、市販の医薬品類の約半数は GPCR を標的として設計されている。例えば日本における生産量上位の医薬品には高血圧、胃・十二指腸潰瘍、アレルギー、統合失調症の治療薬等、GPCR を標的とした医薬品類が数多くみられる。細胞外から運ばれてくるホルモンや成長因子など、受容体に結合して作用する分子 (リガンド) と結合すると、GPCR は構造変化を起こし (活性化され)、三量体 G タンパク質と呼ばれる細胞内タンパク質と結合・作用して、様々な下流のシグナルを誘発する。三量体 G タンパク質の構成要素である G_α は G_s 、 G_i 、 G_q 、 $G_{12/13}$ の 4 種類のサブファミリーに大別され、それぞれの下流では異なるイベントが誘発される (サイクリック AMP 濃度の変動、細胞内カルシウム濃度の変動、低分子量 G タンパク質 Rho への GTP 結合 等) (図 1)。これらの三量体 G タンパク質の下流の個々のイベントを検出する方法では、リガンドによる活性化を検出できる GPCR の種類は限られており、多くの種類の GPCR の活性化を同一の方法で検出できるアッセイ系は存在していなかった。しかし、2012 年に、東北大学薬学研究科の井上助教、青木教授の研究グループによって世界で初めて、多くの GPCR のリガンドによる活性化を測定できる *in vitro* のアッセイ系 ‘TGF α shedding アッセイ’が開発された³⁾。TGF α shedding アッセイはリガンドの分かっていない GPCR (orphan レセプター) のリガンド探索、新規医薬品候補物質の探索に役立てるために開発されたアッセイ系であるが、申請者は、この TGF α shedding アッセイが環境水中の GPCR に作用する生理活性物質の検出に応用できるのではないかと考えた。上述のように、環境水から検出される特定の医薬品が魚の行動へ及ぼす影響の *in vivo* での評価は最近になり研究が進んできた。その一方、環境水中の医薬品類の生理活性を直接測定した研究はこれまでなされてこなかった。原因はアッセイ系が存在しなかったからである。先に記したように、市販の医薬品類の半数が GPCR を標的としていることを考えると、TGF α shedding アッセイは環境水中の医薬品類の生理活性を測定するのに非常に理想的なアッセイ系である。井上助教、青木教授に共同研究の申し込みを行い、アッセイ系の提供と技術

指導を受けることができた。

本研究では、*in vitro* のアッセイ系 TGF α shedding アッセイを環境水へ適用し、下水処理場二次処理水や淀川流域の河川水がどれほどの医薬品類の生理活性を持つのか(持たないのか)を明らかにすることを目指した。また、下水二次処理水の放流先である河川水についても活性を調べた。受容体に結合して、その受容体を活性化するリガンドを「アゴニスト(作動薬)」と呼ぶ。また、受容体に結合してアゴニストによる活性化を阻害するリガンドを「アンタゴニスト(遮断薬)」と呼ぶ。本研究では、環境水試料のアゴニスト活性とアンタゴニスト活性の両方を測定した。環境水や下水での医薬品類の生理活性を検出する世界で初めての試みである。

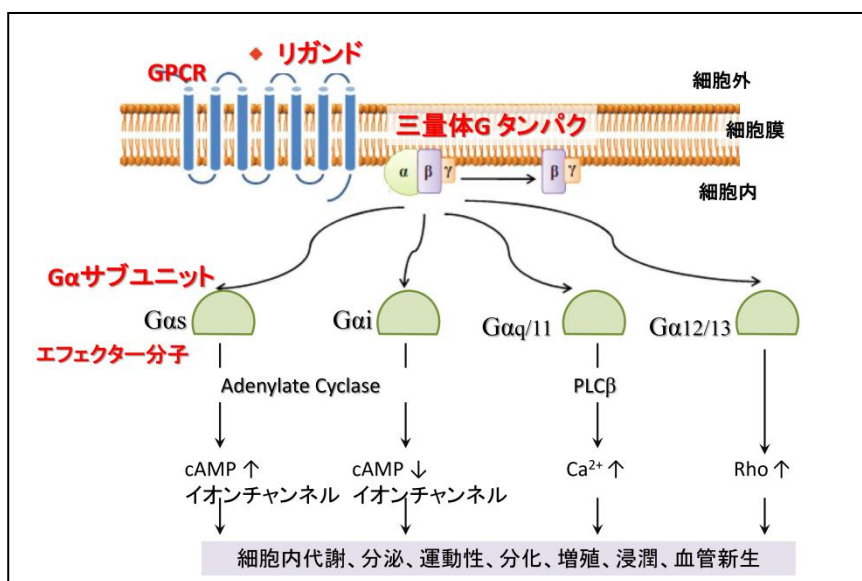


図1 GPCRの下流のシグナルの模式図

G α サブユニットは4種類に大別される。GPCRの種類によってどのG α サブユニットと共役するか異なる。Cancer Genomics and Proteomics, 2012, 9, 37-50 より改変

2. 方法

2.1. TGF α shedding アッセイの概要

本研究で実施する TGF α shedding アッセイは東北大学薬学研究科の青木淳賢教授、井上飛鳥助教によって世界で初めて開発された³⁾。先に説明したように、GPCR にリガンドが結合すると細胞内で GPCR に三量体 G タンパク質が結合し、下流のシグナルが誘発される。G $_{\alpha s}$ 、G $_{\alpha i}$ 、G $_{\alpha q}$ 、G $_{\alpha 12/13}$ の 4 種類の中で、どのサブファミリーが GPCR と結合し作用するかは GPCR 特異的に決まっており、下流のシグナルもそれぞれ異なる(図 1)。青木教授、井上助教は、GPCR の 1 種の LPA₆ 受容体の下流で Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE) と呼ばれる膜型タンパク質分解酵素が活性化し、Transforming growth factor- α (TGF α) の膜結合前駆体を切断し(TGF α の shedding、アッセイの名称の由来)、細胞外へ放出する現象を利用して、GPCR の活性化を検出する系を構築した。アッセイの原理の概要を図 2 に示す。ヒト胎児腎臓由来の細胞株 HEK293 細胞に GPCR を発現するプラスミドとアルカリフォスファターゼ融合 TGF α (AP-TGF α) をコードするプラスミドを導入し、細胞をそれぞれのアゴニストで刺激すると、AP-TGF α が細胞膜から細胞培養の培地中へ放出される。この時、アルカリフォスファターゼの基質である *p*-Nitrophenyl Phosphate (*p*NPP) を培地へ加えると、黄色の反応生成物が生じる。AP-TGF α による黄色の発色を定量することで、アゴニストの生理活性の強さを定量することができる。この系では、G $_{\alpha s}$ 、G $_{\alpha i}$ 、G $_{\alpha q}$ 、G $_{\alpha 12/13}$ の下流のシグナルを AP-TGF α による発色という同一の系で検出することが可能である。概要を図 2 に示す。

TGF α shedding アッセイでは G $_{\alpha s}$ と G $_{\alpha i}$ のシグナルが感度良く検出できないので、これらのシグナルをそれぞれ G $_{\alpha q}$ 、G $_{\alpha 12/13}$ のシグナルに変換できるキメラ G タンパク質(G $_{\alpha q/s}$ 、G $_{\alpha q/i1}$)を必要に応じて同時に細胞へ導入している。こうすることで、例えば通常は G $_{\alpha s}$ に共役している GPCR のシグナルを G $_{\alpha q}$ に変換し検出することができる。

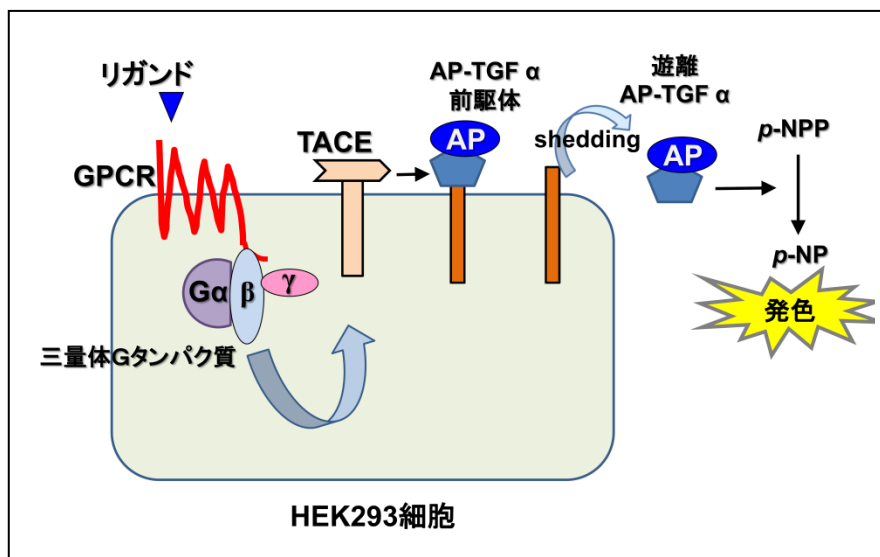


図 2 TGF α shedding アッセイの概要

2.2. アッセイに用いる GPCR の選択

本研究では売上上位の医薬品の標的となっている GPCR を中心に 19 種類の GPCR を選択した。売上上位の医薬品の受容体としてアンジオテンシン II 受容体(AT1)、ドーパミン受容体(D2)、アドレナリン受容体(α 2A、 α 1B、 β 1)、アセチルコリン受容体(M1)、ヒスタミン受容体(H1、H2)、セロトニン受容体(5-HT2C)、バソプレッシン受容体(V2)、プロスタノイド受容体(EP3)を選択した。そして、環境水中の医薬品生理活性の受容体特異性を調べる目的で、これらの受容体と同じサブファミリーに属する受容体も選択した。具体的には D4 受容体(D2 受容体のファミリー)、 β 3 受容体(β 1 受容体のファミリー)、M3 受容体(M1 受容体のファミリー)、H3 受容体(H1、H2 受容体のファミリー)、5-HT1A 受容体(5-HT2C 受容体のファミリー)、V1A 受容体(V2 受容体のファミリー)である。また、日本においては医薬品売上上位には標的としている医薬品は無いものの、幅広いファミリーの受容体に対する活性を調べるために、ロイコトリエン受容体(BLT1)とカンナビノイド受容体(CB1)も選択した。それぞれの GPCR の名称、説明、標的とする医薬品の例を以下に示す。本研究でアッセイに用いた各 GPCR のアゴニスト、アンタゴニスト、およびアゴニストの刺激によって各 GPCR の下流で誘発される三量体 G タンパク質シグナル経路を表 1 に示す。

- ・ AT1 受容体 (Angiotensin 受容体のサブファミリーの 1 つ、高血圧治療薬の標的)、
- ・ 5-HT2C 受容体 (5-Hydroxytryptamine 受容体のサブファミリーの 1 つ、統合失調症治療薬の標的)、
- ・ V2 受容体 (Vasopressin 受容体のサブファミリーの 1 つ、利尿薬、平滑筋作用薬の標的)、
- ・ D2 受容体 (Dopamine 受容体のサブファミリーの 1 つ、統合失調症治療薬の標的)、
- ・ H1 受容体 (Histamine 受容体のサブファミリーの 1 つ、アレルギー治療薬の標的)、
- ・ H2 受容体 (Histamine 受容体のサブファミリーの 1 つ、胃・十二指腸潰瘍治療薬の標的)、
- ・ M1 受容体 (Acetylcholine 受容体のサブファミリーの 1 つ、自律神経系薬、気管支拡張薬の標的)、
- ・ α 1B 受容体 (Adrenoceptor 受容体のサブファミリーの 1 つ、自律神経系薬、高血圧治療薬、気管支拡張薬の標的)、
- ・ α 2A 受容体 (Adrenoceptor 受容体のサブファミリーの 1 つ、自律神経系薬、高血圧治療薬、気管支拡張薬の標的)、
- ・ β 1 受容体 (Adrenoceptor 受容体のサブファミリーの 1 つ、自律神経系薬、高血圧治療薬、気管支拡張薬の標的)

表 1 本研究で使用した GPCR の一覧

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)	共発現させた $G\alpha$	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		
					$G\alpha_q$	$G\alpha_{12/13}$	$G\alpha_{16}$
AT1	Angiotensin	Angiotensin II	Olemsartan Medoxomil	—	○	○	
D2	Dopamine	Dopamine	Sulpiride	$G\alpha_q/i1$	○		
D4					○		
$\alpha 1B$	Adrenoceptors	Norepinephrine	Carvedilol	—	○		
$\alpha 2A$			Mirtazapine	$G\alpha_q/i1$	○		
$\beta 1$		Isoproterenol	Metoprolol	$G\alpha_q/s$	○		
$\beta 3$					○		
M1	Acetylcholine	Acetylcholine	Pirenzepine	—	○	○	
M3					○	○	
V1A	Vasopressin	Vasopressin	Tolvaptan	—	○	○	
V2			$G\alpha_q/s$	○			
H1	Histamine	Histamine	Diphenhydramine	—	○		
H2			Famotidine	$G\alpha_{16}$			○
H3			Diphenhydramine	$G\alpha_q/i1$	○		
5-HT1A	5-Hydroxy- tryptamine	Serotonin	NAD299	$G\alpha_q/i1$	○		
5-HT2C			Olanzapine	—	○	○	
CB1	Cannabinoid	CP-55940	AM251	—	○	○	
EP3	Prostanoid	Prostaglandin E2		—			
BLT1	Leukotriene	Leukotriene B4		$G\alpha_{16}$	○		○

例えば、D2 受容体は通常 $G\alpha_i$ と共役しているが、キメラ G タンパク質 $G\alpha_{q/i1}$ を同時に導入することで $G\alpha_i$ のシグナルを $G\alpha_q$ に変換し検出する。 $\beta 1$ については通常は $G\alpha_s$ と共役しているが、キメラ G タンパク質 $G\alpha_{q/s}$ を同時に導入することで $G\alpha_s$ のシグナルを $G\alpha_q$ に変換し検出する。H2 については通常は $G\alpha_s$ と共役しているが、 $G\alpha_{16}$ を同時に導入することで $G\alpha_{16}$ を通じた GPCR シグナルを検出する。 $G\alpha_{16}$ は $G\alpha_q$ のサブファミリーの 1 つで、多くの GPCR と共役することが知られている。

2.3. 採水、前処理

琵琶湖または桂川流域を放流先とする下水処理場において、複数回の採水を実施した。A 下水処理場においては 2013 年 3 月に二次処理水を採水した。B 下水処理場においては放流水とその桂川上流にあたる C 橋およびその下流にあたる D 地点での採水を、2014 年 1 月、7 月、10 月、12 月、2015 年 2 月に行った。それぞれ 3L を採水し、採水後直ちにアスコルビン酸を添加した。氷冷した状態で研究室へ持ち帰り、直ちに固相抽出による濃縮を行った。固相抽出方法は以下の通りである。水試料 3L をガラス繊維ろ紙 (GF/B、孔径 $1\mu m$ 、Whatman 社) で吸引ろ過した後、予めメタノールと MilliQ 水でコンディショニングを行った Oasis HLB カートリッジ (Waters 社) へ通水した。メタノールで溶出し、溶出液を N_2 パージで乾燥した後、1% DMSO 含有 MilliQ 水 1.5 mL で再溶解した。2000 倍に濃縮したことになる。この固相抽出方法は医薬品類の機器分析における一般的な前処理方法に準じている。また、固相抽出操作の操作コントロール

として、MilliQ 水を同様の操作で固相抽出した抽出物もアッセイに供し、反応が無いことを確認した。

2.4. TGF α shedding アッセイの手順

2.4.1 アゴニスト活性の測定

環境水試料の GPCR に対するアゴニスト活性の測定手順は以下のとおりである。HEK293 細胞を 24 well plate で培養し、翌日に GPCR を発現するプラスミドと AP-TGF α をコードするプラスミド、必要に応じてキメラ三量体 G タンパク質を発現するプラスミドを Lipofectamine 試薬 (invitrogen 社) によって導入した。その翌日、細胞を 24 well plate から回収し、96 well plate へ蒔きなおし、CO₂ インキュベータで 30 分培養した。その後、細胞を固相により濃縮した環境水試料の濃縮液へ曝露した。曝露の際の DMSO 濃度は細胞毒性のないように 0.1% に抑えた。CO₂ インキュベータで 1 時間培養した後、細胞培養液 (Conditioned medium: CM 画分) を新しい 96 well plate へ取り分けた。CM 画分と細胞画分 (元の 96 well plate に接着している細胞) のそれぞれにアルカリフォスファターゼの基質である pNPP を加え 1~2 時間インキュベートし、黄色の発色を定量した。定量にはプレートリーダー (Tecan 社) を用い、405nm の波長における吸光度を測定した。環境水試料の濃縮液に含まれる生理活性物質によって GPCR が活性化された場合、AP-TGF α が培養液中へ放出されるので、CM 画分が黄色に発色する。濃縮液の希釈列を作成して細胞に曝露することで用量応答曲線を得て、その曲線から EC₅₀ 値 (50% 活性値) を算出、アゴニスト活性の強さを定量した。

アッセイのポジティブコントロールとして、各 GPCR の既知のアゴニスト (表 1 参照) の希釈列を細胞に曝露し、用量応答曲線が得られることを確認した。

2.4.2 アンタゴニスト活性の測定

アンタゴニスト活性の測定は、アゴニスト活性の測定と同様の方法で行った。異なる点は、細胞を固相により濃縮した環境水試料の濃縮液へ曝露した後に、細胞を各 GPCR の既知のアゴニストに同時曝露する点である。曝露するアゴニストの濃度は、EC80~90 の濃度を用いた (図 3 より算出)。アゴニストによる GPCR の活性化が、環境水試料の濃縮液に含まれる物質によって阻害される場合、AP-TGF α の培養液への放出が減少するので、CM 画分の黄色の発色が抑えられる。濃縮液の希釈列を作成して細胞に曝露することで阻害曲線を得て、その曲線から IC₅₀ 値 (50% 阻害値) を算出した。アンタゴニスト活性の強さを定量した。

アッセイのポジティブコントロールとして既知のアンタゴニスト (表 1 参照) の希釈列を細胞に曝露し、阻害曲線が得られるかどうかを確認した。

2.4.3 データ解析

用量応答曲線、阻害曲線は GraphPad prism5 (GraphPad prism 社) を用いて作成した。アゴニストの用量応答曲線から EC₅₀X (50% 効果濃度: 最大活性値の 50% 値を誘導する濃度) を算出した。また、環境水試料の用量応答曲線から EC₅₀Sample (アゴニストの最大活性値の 50% に相当する活性値を誘導する試料の濃縮倍率) を算出した。これらの値から式 (1) に従い、試料中のアゴニスト活性の大きさをアゴニスト当量 (Agonist Equivalency Quantity: AEQ) に換算した。例えば、 α 2A 受容体でのアッセイの場合、

既知のアゴニストとして Norepinephrine を用いているので、Norepinephrine 当量を知ることができる。つまり、「環境水試料の持つ α 2A 受容体に対するアゴニスト活性を、Norepinephrine 濃度に換算するとどれくらいの濃度になるのか」を知ることが出来る。

$$AEQ(\text{ng-X/L}) = \frac{EC_{50}X}{EC_{50\text{sample}}} \quad (1)$$

アンタゴニストの阻害曲線から $IC_{50}X$ (添加したアゴニストの活性の 50%を阻害するアンタゴニスト X の濃度)を算出した。また、環境水試料の阻害曲線から $IC_{50\text{Sample}}$ (添加したアゴニストの最大活性値の 50%を阻害する試料の濃縮倍率)を算出した。これらの値から式(2)に従い、試料中のアンタゴニスト活性の大きさをアンタゴニスト X 当量 (Antagonist Equivalency Quantity : AntEQ)に換算した。例えば、D2 受容体でのアンタゴニスト活性のアッセイの場合、既知のアンタゴニスト X として Sulpiride を用いているので、Sulpiride 当量を知ることができる。つまり、「環境水試料の持つ D2 受容体に対するアンタゴニスト活性を、Sulpiride 濃度に換算するとどれくらいの濃度になるのか」を知ることが出来る。

$$\text{AntEQ}(\text{ng-X/L}) = \frac{IC_{50}X}{IC_{50\text{sample}}} \quad (2)$$

3. 結果および考察

3.1 既知のアゴニストの用量応答曲線および既知アンタゴニストの阻害曲線

既知アゴニスト(内因性アゴニスト)の用量応答曲線の例を図 3 上段に示す。図 3 上段に示したのと同様に、全ての受容体について用量応答曲線が得られた。これらの用量応答曲線から得られた EC_{50} 値は、環境水試料の当量値を算出する際に用いた。

既知アンタゴニスト(アンタゴニスト型医薬品)の阻害曲線の例を図 3 下段に示す。図 3 上段に示したのと同様に、全ての受容体について用量応答曲線が得られた。これらの阻害曲線から得られた IC_{50} 値は環境水試料の当量値を算出する際に用いた。

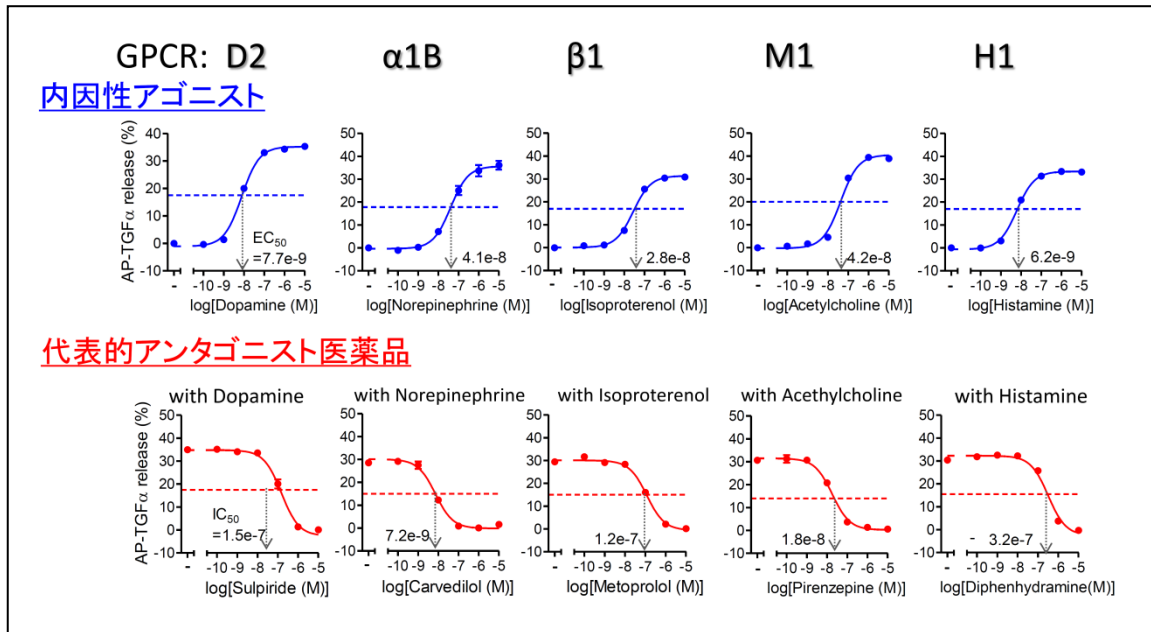


図 3 既知アゴニストの用量応答曲線および既知アンタゴニストの阻害曲線
 各 GPCR の用量応答曲線(上段)、阻害曲線(下段)。横軸はアゴニストまたはアンタゴニスト濃度(M)、縦軸はCM中に放出されたAP-TGF α の割合。用いたGPCRとアゴニストの組み合わせは図中に示したとおり。平均 \pm SEM (n=6~9)。EC₅₀: 50%効果濃度(M) ; IC₅₀: 50%阻害濃度(M)。

3.2 下水試料のアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性

初めに、GPCRを発現するプラスミドを導入せずに、AP-TGF α を発現するプラスミドのみを導入したHEK293細胞を下水試料に曝露した(mock条件)。この条件ではGPCRは発現していないので、もしもAP-TGF α のsheddingが起きた場合には、GPCRを介さない経路でAP-TGF α のsheddingが起こっていることを意味する。言い換えると、環境水試料に含まれる物質によるGPCRの活性化作用(アゴニスト活性)を検出するためには、mock条件下でAP-TGF α のsheddingが起きない濃縮倍率の範囲でアッセイを行う必要がある。また、mock条件において、HEK293細胞を、GPCRを介さずにPKCシグナルを直接刺激してsheddingを誘導試薬である12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)に曝露した。もしもAP-TGF α のsheddingが阻害される場合には、GPCRを介さない経路でAP-TGF α のsheddingの阻害が起こっていることを意味する。言い換えると、環境水試料に含まれる物質によるGPCRの阻害化作用(アンタゴニスト活性)を検出するためには、mock条件下でTPA誘導のAP-TGF α のsheddingが阻害されない濃縮倍率の範囲でアッセイを行う必要がある。Mock条件下での2013年3月に滋賀県A下水処理場にて採水した二次処理水のmock条件下でのアゴニスト活性のアッセイ結果を図4に示す。図4から、この試料は濃縮倍率250倍以下の範囲でアッセイが可能であることを確認した。また、下水試料に細胞毒性が無いことをMTTアッセイによって確認した(図4、右側)。

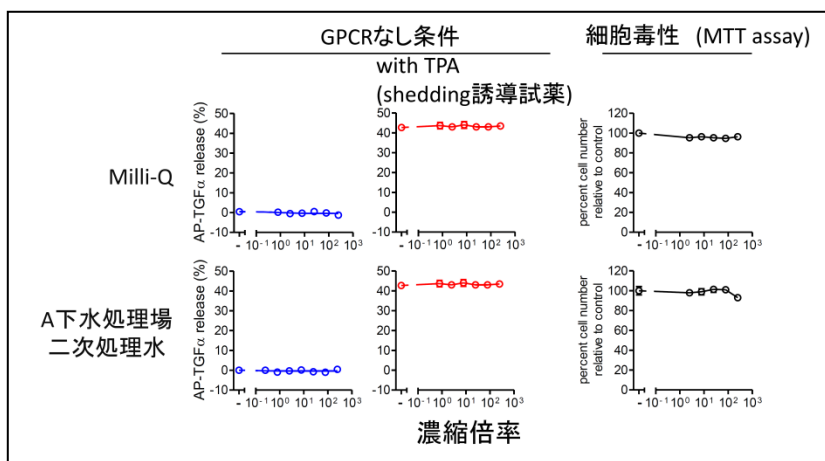


図4 Mock条件下での下水二次処理水のアゴニスト活性

横軸は濃縮倍率、縦軸はGM中に放出されたAP-TGF α の割合。MilliQ水を固相抽出したネガティブコントロールサンプル(上段)、2013年3月採水したA下水処理場二次処理水(下段)。平均 \pm SEM (n=3)。

2013年3月に滋賀県A下水処理場にて採水した二次処理水から、AT1、D2、 α 1B、 β 1、H1、M1、V2受容体に対してアンタゴニスト活性が検出された。AT1、D2、 α 1B受容体の用量応答曲線、阻害曲線を図5に示す。アゴニスト活性については α 2A受容体のみで検出された。MilliQ水を固相抽出した固相抽出操作過程のコントロールについては反応なかった(data not shown)。

検出されたアゴニスト活性とアンタゴニスト活性を表2にまとめる。三量体Gタンパク質のどの経路が阻害または活性化されたのかについても併せて示す。同じGタンパク質シグナル経路を誘発するGPCRの中で、下水二次処理水によって阻害されるGPCRと阻害されないGPCRがあることがわかる。例えば、 G_{α_q} シグナルを誘発するGPCRの中で、AT1、D2、 α 1B、 β 1、M1、V2、H1受容体は阻害されたのに対して、D4、 β 3、M3、V1A、H3、5-HT1A受容体は阻害されていない。このことから、この下水試料が持つアンタゴニスト活性は、下水に含まれるGPCRとの相互作用特異性の高い物質、つまり医薬品が原因物質であると考えられる。下水が G_{α_q} シグナルそのものを普遍的に阻害しているのであれば、 G_{α_q} シグナルを誘発する全ての受容体でシグナルが阻害されるはずであるが実際にはそうになっていない。同様のことは $G_{\alpha_{12/13}}$ シグナルシグナルを刺激するGPCR(AT1、M1、M3、CB1、V1A、5-HT2C、EP3受容体)についてもあてはまる。これらのGPCRに対する下水の阻害活性も受容体特異的である。また、 α 2A受容体に対するアゴニスト活性も受容体特異的な活性である。興味深いことに、同じ受容体クラスに属する α 1B受容体に対してはアゴニスト活性が検出されていない。 α 2A受容体特異的なアゴニストが下水中に存在すると考えられる。

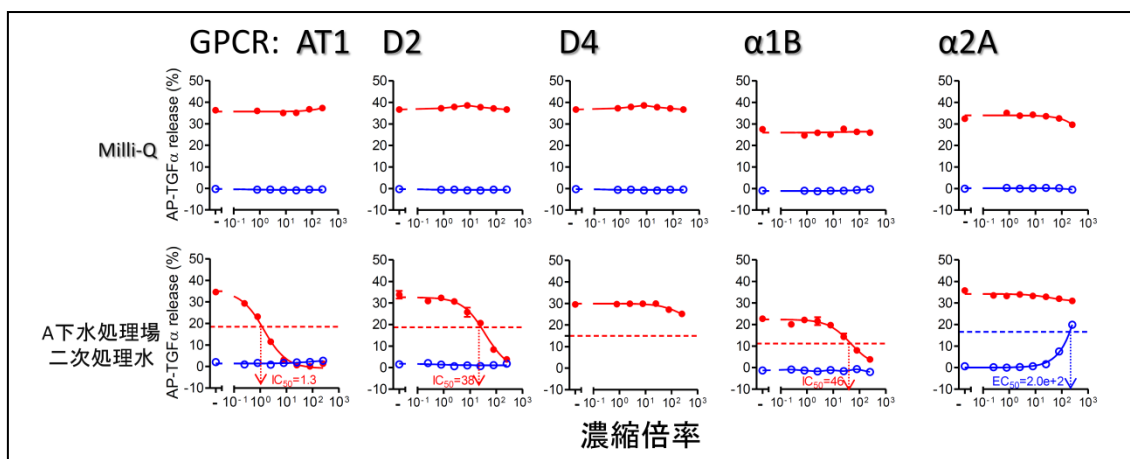


図5 下水二次処理水の用量応答曲線および阻害曲線

横軸は濃縮倍率、縦軸はCM中に放出されたAP-TGF α の割合。用いたGPCRとアゴニストの組み合わせは図中に示したとおり。平均 \pm SEM (n=6~9)。EC₅₀: 50%効果濃縮倍率。IC₅₀: 50%阻害濃縮倍率。

表2 下水二次処理水のアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性

受容体	受容体クラス	下水二次処理水の活性		
		Gαq	Gα12/13	Gα16
AT1	Angiotensin	↓	↓	
D2	Dopamine	↓		
D4		—		
α1B	Adrenoceptors	↓		
α2A		↑		
β1		↓		
β3		—		
M1	Acetylcholine	↓	↓	
M3		—	—	
V1A	Vasopressin		—	
V2		↓		
H1	Histamine	↓		
H2, H3		—		—
5-HT1A, 5-HT2A	Serotonin	—	—	
CB1, EP3	Cannabinoid, Prostanoid		—	
BLT1	Leukotriene	—		—

赤矢印、青矢印：それぞれ、アンタゴニスト活性およびアゴニスト活性が検出されたことを示す。—：活性検出されず。

3.3 アンタゴニスト活性の当量換算

既知のアンタゴニストのIC₅₀値(図4)と2013年3月採水のA下水処理場二次処理水のIC₅₀値(図5)を元に、アンタゴニスト当量の算出を行った。その結果を表3に示す。AT1、H1、β1、D2受容体に対するアンタゴニスト活性はそれぞれの医薬品換算で1000 ng/L

以上の当量値を示した。また、M1 受容体に対するアンタゴニスト活性は 100 ng/L 以上の当量値、 α 1B 受容体に対しては 10 ng/L 以上の当量値となった。Sulpiride と Metoprolol については申請者が所属する研究室において医薬品類の機器分析の対象物質となっている。今後、これらの濃度実測値とアッセイで得られた当量値の比較を行う予定である。それによってこれらの活性が既に機器分析の対象となっている医薬品類の濃度でどれくらい説明がつくのか明らかになると期待される。なお、 α 2A 受容体に対してはアゴニスト活性が検出された（図 5、表 2）。Norepinephrine 当量は 64 ng/L となった。

表 3 下水処理場二次処理水のアンタゴニスト活性の当量換算値

アンタゴニスト型の医薬品			当量(ng/L)
名称	効能	標的受容体	A下水処理場 二次処理水
Olmesartan Medoxomil	高血圧治療	AT1	7.0×10^3
Sulpiride	潰瘍治療、 統合失調症、	D2	1.8×10^3
Metoprolol	不整脈治療	β1	2.0×10^3
Carvedilol	高血圧治療	α1B	7.4×10
Pirenzepine	潰瘍治療	M1	3.1×10^2
Diphenhydramine	アレルギー治療	H1	7.1×10^3

3.4 河川水試料での生理活性検出状況

B 下水処理場放流水、その上流域の桂川河川水（C 橋）、下流域の桂川河川水（D 橋）における当量換算値の比較を図 6 に示す。いずれの採水日も、いずれの受容体についても、下水処理場放流水でのアンタゴニスト活性が最も強く、上流域での活性が最も弱く、下流域はその間の活性を示している事がわかる。下水処理場放流水に含まれる医薬品の生理活性が放流先河川への負荷源となっていることがわかる。

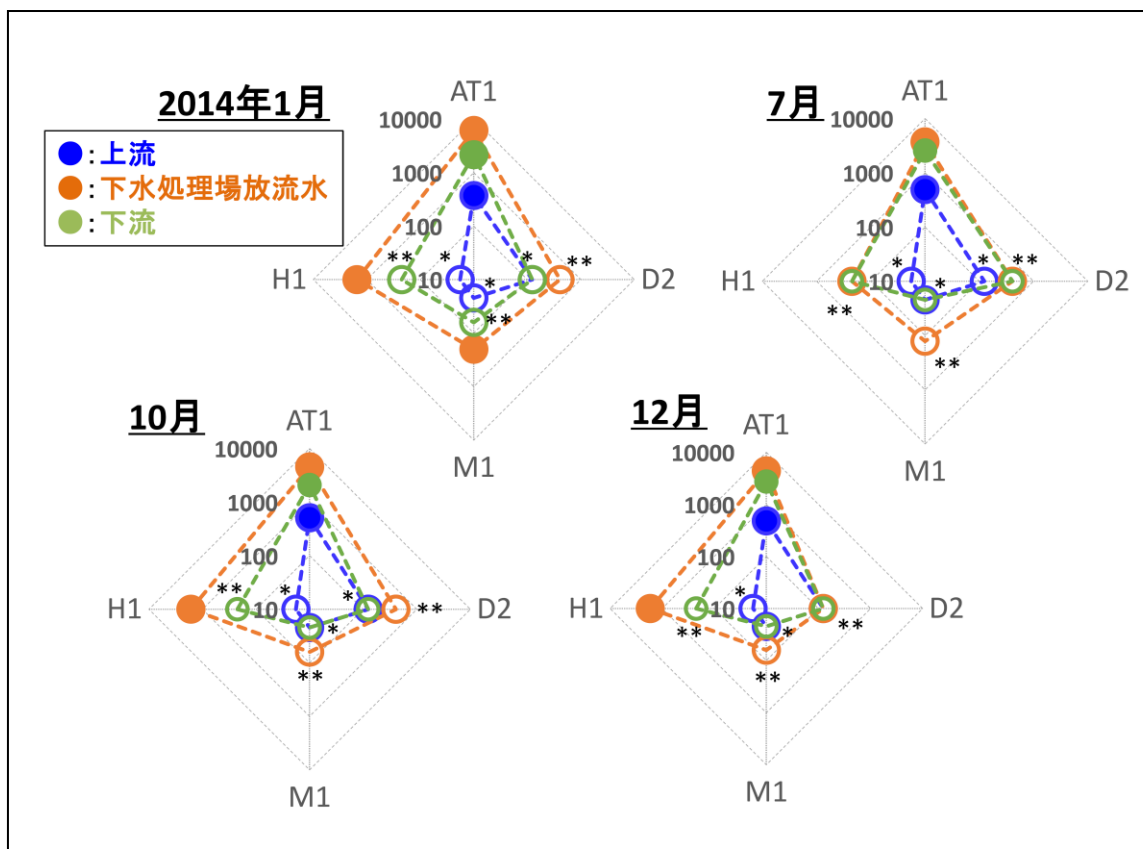


図 6 B 下水処理場放流水、桂川上流域、および下流域での
アンタゴニスト活性当量換算値の比較

AT1, D2, M1, H1 受容体に対するアンタゴニスト活性を、それぞれ Olmesartan Medoxomil, Sulpiride, Pirenzepine, Diphenhidramine 当量に換算してプロット (log10)。** : 検出下限値 (25% 阻害) 以上、定量下限値 (50% 阻害) 未満のサンプル、定量下限値の 2 分の 1 の値をプロット。* : 検出下限値 (25% 阻害) 未満のサンプル、検出下限値の 2 分の 1 の値をプロット。

3.5 内分泌攪乱作用との違い

水環境中の微量化学物質による生体影響としては内分泌攪乱作用が古くから懸念されてきた。特にエストロゲン受容体を介した内分泌攪乱としては、これまで主にエストロゲン活性 (エストロゲン受容体に対するアゴニスト活性) が野生生物へ与える影響が問題となってきた。例えば、英国では 1980 年代に下水処理場放流水の放流先河川からコイ科のローチの精巣に卵があることが頻繁に見つかり、下水処理水に含まれる未知の原因物質によってメス化が引き起こされたのではないかと懸念された。ビテロジェニンの産生を指標としてエストロゲン様作用を引き起こす物質を追及した結果、ノニルフェノール (NP) のような人工化学物質、合成エストロゲンであるエチニルエストラジオール (EE2) とともに、 17β -エストラジオール (E2)、エストロン (E1)、エストリオール (E3) のような天然エストロゲンが主な原因と考えられた。

これに対して、本研究で得られた結果からは、GPCR に対する下水二次処理水の活性としてアンタゴニスト活性が多く検出された。具体的には、アンタゴニスト活性の方がアゴニスト活性に比べて対象となる GPCR の種類が多く (図 5、表 2)、活性の当量換算値も大きな値を示していた。下水二次処理水にはアンタゴニストとして作用する微

量化学物質が多く含まれていると推測される。GPCR に対する医薬品類の多くが遮断薬（アンタゴニスト）としてデザインされていることを反映していると考えられる。

4. 結論

本研究で得られた結論を以下に示す。

- 1) TGF α shedding アッセイを下水二次処理水に適用した結果、AT1、D2、 α 1B、 β 1、M1、H1、V2 受容体に対するアンタゴニスト活性が検出された。活性の医薬品への当量換算値は、1000 ng/L を超える受容体 (AT1、H1、 β 1、D2) もあった。特に AT1 受容体に対するアンタゴニスト活性は河川水を含む全ての試料から検出された。
- 2) α 2A 受容体に対するアゴニスト活性が検出された。
- 3) 検出されたアンタゴニスト活性は受容体特異的な阻害であった。受容体に選択的に結合して阻害する物質、つまり医薬品がその原因であると考えられる。
- 4) アゴニスト活性についても受容体特異的な活性であった。
- 5) 下水放流水の影響を受ける河川水において GPCR に対するアンタゴニスト活性が上昇しており、下水処理場放流水に含まれる医薬品の生理活性が放流先河川への負荷源となっていることが示された。

なお、本年度の研究成果は Environmental Science & Technology 誌に掲載された⁴⁾。

5. 今後の課題

- 1) 淀川流域において、より多くの下水処理場放流水、河川水を調査し、実態を把握する必要がある。さらなる調査が必要である。
- 2) 下水流入水での状況はどうか調査が必要。下水処理過程で GPCR に対する活性はどのように変化するのだろうか？
- 3) 各受容体に対するアンタゴニスト活性の原因物質(医薬品)の特定が必要である。
- 4) 今回検出されたレベルのアンタゴニスト活性が *in vivo* でも影響を及ぼすのか検証が待たれる。

6. 参考文献

- 1) Kolpin, D.W. *et al.*, Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. stream, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, *36*, 1202–1211.
- 2) Hernando, D.M. *et al.*, LC-MS analysis of basic pharmaceuticals (beta-blockers and anti-ulcer agents) in wastewater and surface water. *Trends. Anal. Chem.*, **2007**, *26*, 581–594.
- 3) Inoue A., *et al.*, TGF α shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nature Methods*, **2012**, *9*, 1021–1029.
- 4) Ihara M., *et al.*, Detection of physiological activities of G protein-coupled receptor-acting pharmaceuticals in wastewater. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 1903–1911.

7. 謝辞

本研究で用いた TGF α shedding アッセイは東北大学 大学院薬学研究科 分子細胞

生化学分野の青木淳賢教授、井上飛鳥助教から提供いただきました。また、親身な技術指導もいただきました。心からの感謝の意を表します。