

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担っている。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、私は、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。その結果、H26 年度までの本研究助成によって、下水処理場二次処理水から複数の GPCR に対する医薬品の生理活性を検出することに世界で初めて成功している⁴⁾。

H27 年度の研究では、*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桂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。H26 年度までの調査に比べて本年度の調査ではより広い範囲での河川流域において採水を行った。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。これまでの下水処理場二次処理水の調査結果から、アンタゴニスト活性は複数の GPCR に対して検出されるがアゴニスト活性はほとんど検出されないことが明らかとなっていたので、本年度の調査ではアンタゴニスト活性に焦点を絞って調査を行った。

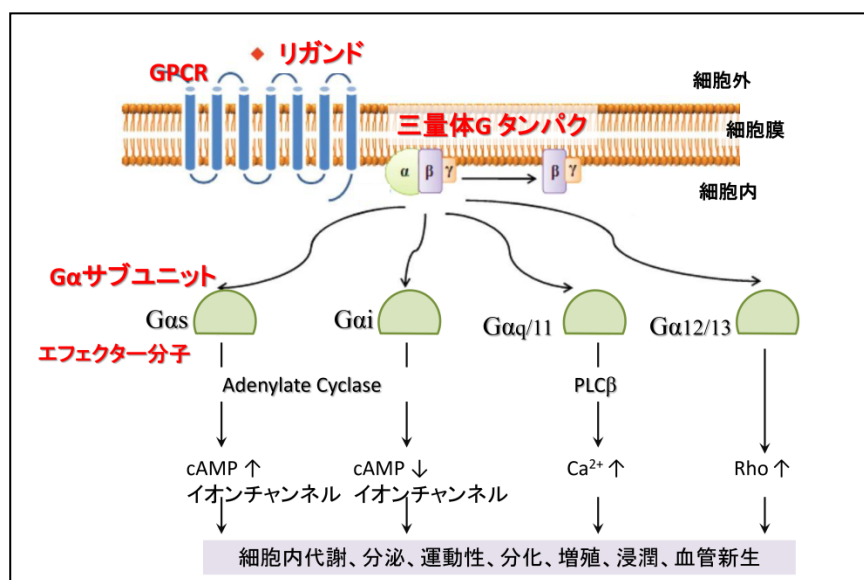


図1 GPCRの下流のシグナルの模式図

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。

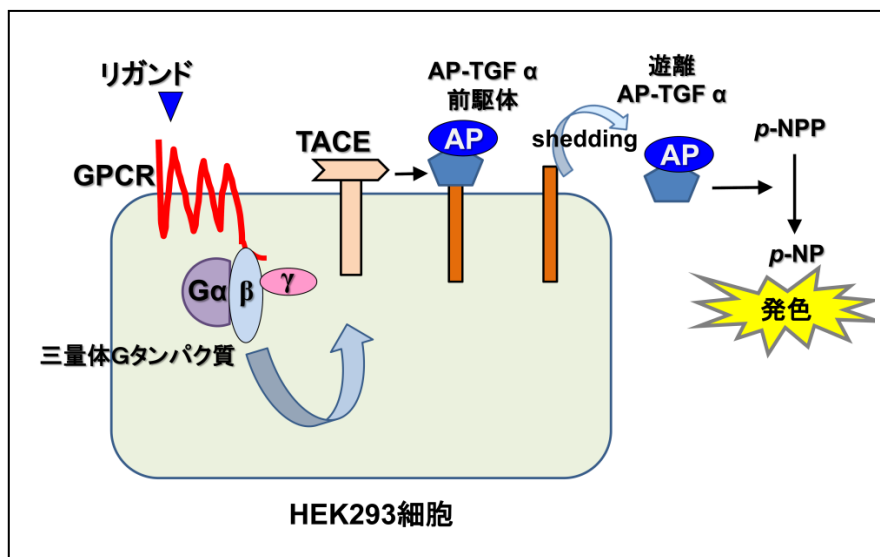


図 2 TGF α shedding アッセイの概要

2.2. アッセイに用いる GPCR の選択

H26 年度までの研究では、日本における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、下水処理場二次処理水でその生理活性を測定した。具体的には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。

- ・ 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)

H26 年度までの下水二次処理水での調査では上記の GPCR のうちで AT1 受容体、D2 受容体、H1 受容体、M1 受容体、 β 1 受容体、 α 1B 受容体、および V2 受容体に対する受容体特異的なアンタゴニスト活性が検出された。本年度の調査では、この中でも特に高い活性値が検出された受容体、AT1 受容体、D2 受容体、H1 受容体、M1 受容体および β 1 受容体に焦点を絞って医薬品生理活性の調査を行った。これら受容体の代表的なアンタゴニスト型医薬品を表 1 に示す。

表 1 本研究で使用した GPCR 一覧

受容体	受容体クラス	アンタゴニスト型医薬品
AT1	アンジオテンシン	Olmesartan Medoxomil
D2	ドーパミン	Sulpiride
$\beta 1$	アドレナリン	Metoprolol
M1	アセチルコリン	Pirenzepine
H1	ヒスタミン	Diphenhydramine

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(標準活性汚泥法+塩素処理)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(標準活性汚泥法+塩素処理)においては放流水とその桂川上流地点およびその下流地点での採水を、2014 年 1 月、7 月、10 月、12 月、2015 年 2 月、3 月に行った。また、2015 年 4 月、7 月、10 月、2016 年 1 月には B 下水処理場放流水とその桂川地点およびその下流地点、桂川に合流する鴨川、および流下途中で流入する生活排水を含む支流での採水を行った。加えて C 下水処理場(標準活性汚泥法+オゾン処理)の放流水も採水した。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 $1\mu\text{m}$ 、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 アンタゴニスト活性の測定

まず初めに GPCR に対するアゴニスト活性の測定手順を説明する。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、 CO_2 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。 CO_2 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。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。

アンタゴニスト活性の測定の原理はアゴニスト活性の測定と同様である。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。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 IC₂₅ 値（25% 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。

2.4.2 データ解析

用量応答阻害曲線は GraphPad prism5 (GraphPad prism 社) を用いて作成した。アンタゴニストの阻害曲線から IC₂₅X (添加したアゴニストの活性の 25% 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 IC₂₅Sample (添加したアゴニストの最大活性値の 25% 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 (1) 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。

$$AntEQ(ng - X / L) = \frac{IC_{25}X}{IC_{25}Sample} \quad (1)$$

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。Shedding assay によってアゴニストによる GPCR の活性化を正常に検出できることを確認した。

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 IC₂₅ 値は環境水試料の当量値を算出する際に用いた。

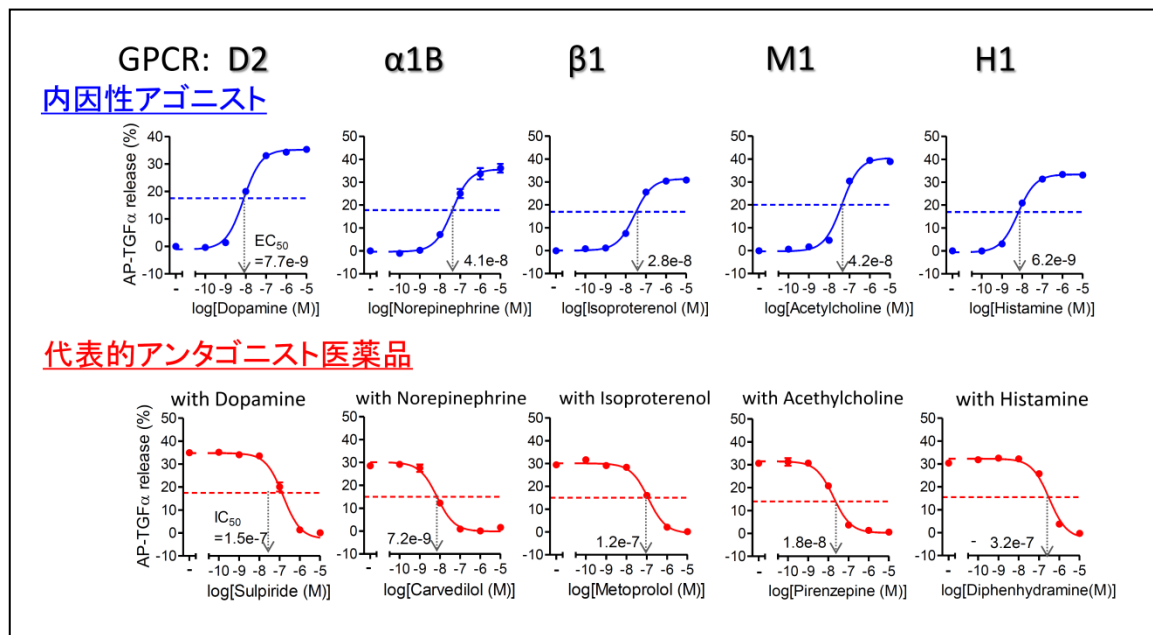


図3 既知アゴニストの用量応答曲線および既知アンタゴニストの阻害曲線
各 GPCR の用量応答曲線(上段)、阻害曲線(下段)。横軸はアゴニストまたはアンタゴニスト濃度(M)、縦軸はCM中に放出されたAP-TGF α の割合。用いたGPCRとアゴニストの組み合わせは図中に示したとおり。平均 $\pm$ SEM (n=6~9)。EC₂₅: 25%効果濃度(M) ; IC₂₅: 25%阻害濃度(M)。

3.2 下水放流水および河川水の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-O-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shedding assayの例として、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)。

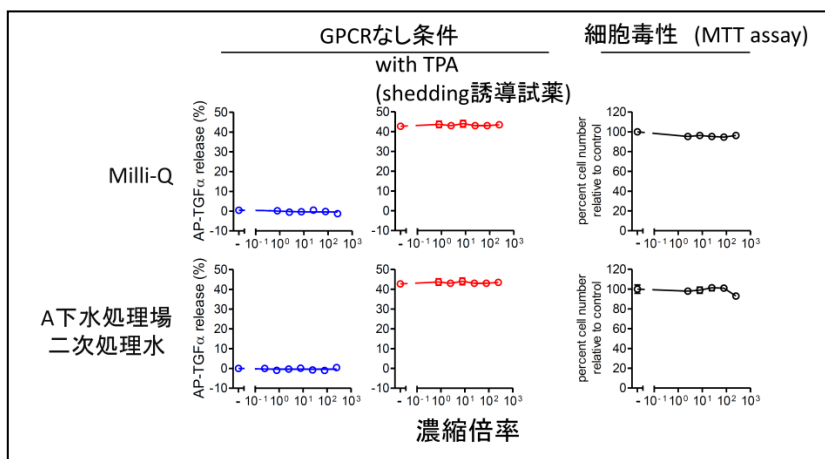


図4 Mock条件下での下水二次処理水のアゴニスト活性

横軸は濃縮倍率、縦軸はCM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)。

環境水試料の阻害曲線の例として、2014年4月に採水した桂川流域の下水処理場放流水および河川水のAT1受容体に対する阻害曲線を図5に示す。全てのサンプルでAT1受容体に対するアンタゴニスト活性が検出された。同様に、試験した全てのGPCRに対する全ての下水試料、河川水試料の阻害曲線を求めた。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)。

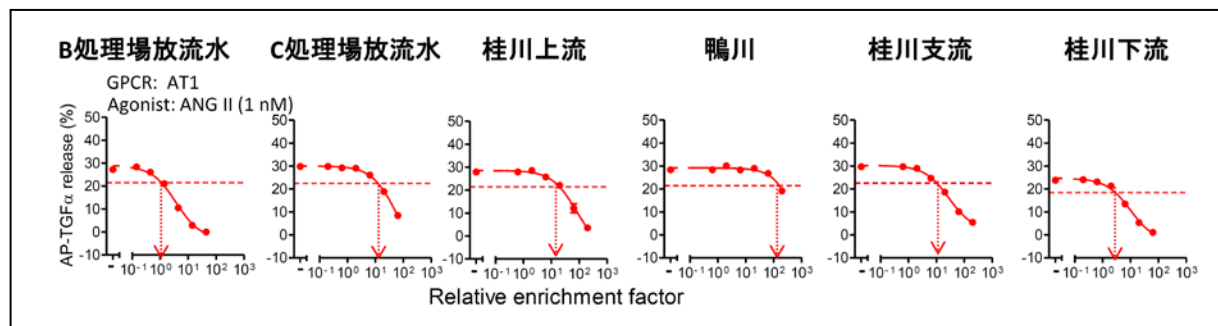


図5 AT1受容体に対する阻害曲線

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。赤矢印：25%阻害濃縮倍率(IC₂₅)，平均 $\pm$ SEM (n=3~6)。

3.3 下水処理場放流水および河川水のアンタゴニスト活性の当量換算値

既知のアンタゴニスト型医薬品のIC₂₅値(図4)と環境水試料のIC₂₅値(図5)を元に、環境水試料のアンタゴニスト活性を既知アンタゴニスト型医薬品の当量値を算出した。採用したアンタゴニスト型医薬品は表1に示したとおりである。桂流域のB下水処理場(標準活性汚泥法)の放流水および桂川上流域、下流域にて2014年1月~2016年1月までに採水した試料のアンタゴニスト活性の変動を図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。

桂川上流域においては AT1 受容体に対するアンタゴニスト活性が調査期間を通じて検出された。また、H1 受容体に対しても 2015 年 3 月にアンタゴニスト活性が検出されたが、その他の GPCR に対しては桂川上流域では活性は検出されなかった。

桂川下流域においては AT1 受容体、H1 受容体に対するアンタゴニスト活性が調査期間を通じて検出され、M1 受容体に対するアンタゴニスト活性は半分程の頻度で検出された。D2 および $\beta 1$ 受容体に対するアンタゴニスト活性は、調査期間を通じて 1 回のみ検出または全く検出されなかった。

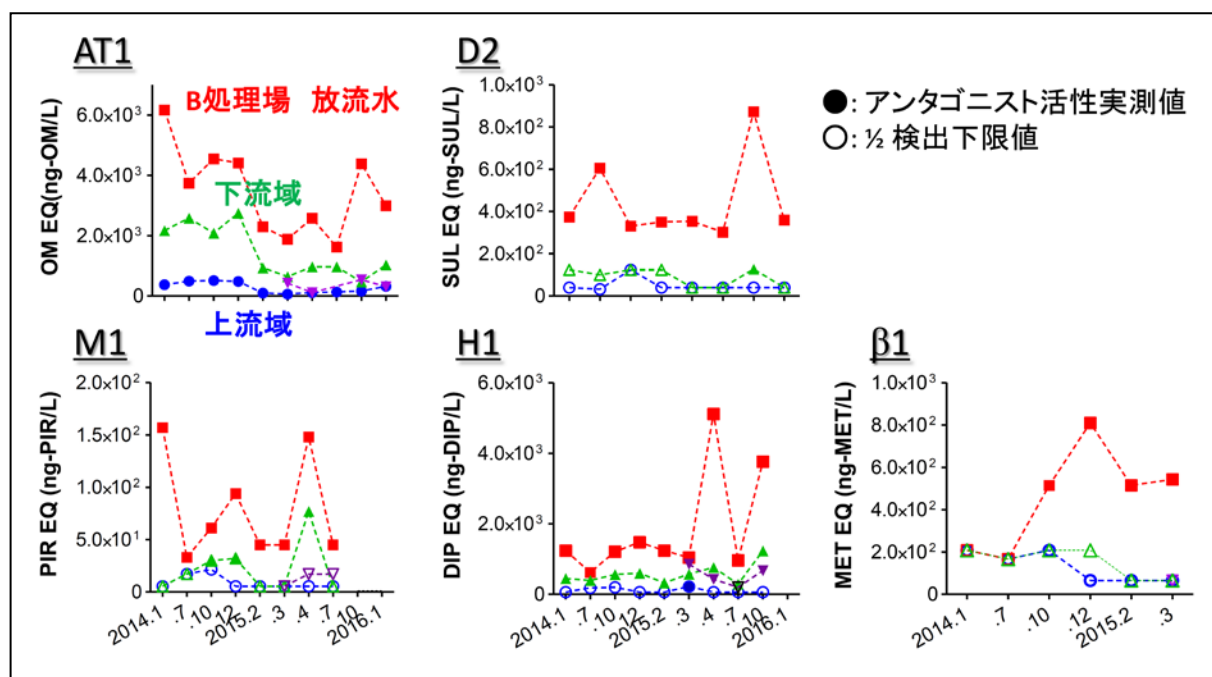


図 6 B 下水処理場放流水、桂川上流域、および下流域での
アンタゴニスト活性の変動

AT1, D2, M1, H1 および $\beta 1$ 受容体に対するアンタゴニスト活性を、それぞれ Olmesartan Medoxomil (OM), Sulpiride (SUL), Pirenzepine (PIR), Diphenhydramine (DIP) および Metoprolol (MET) 当量に換算してプロット (log10)。白抜きの記号は検出下限値 (25% 阻害) 未満のサンプルで、検出下限値の 2 分の 1 の値をプロットしている。

アンタゴニスト活性の当量換算値の変動範囲を図 7 に示す。B 下水処理場の放流水の AT1 受容体に対するアンタゴニスト活性は Olmesartan Medoxomil (OM) 当量で 2000～6000 ng-OM/L の範囲を示した。同様に、D2 受容体に対するアンタゴニスト活性は Sulpiride (SUL) 当量で 400～1000 ng-SUL/L の範囲を示した。M1 受容体に対するアンタゴニスト活性は Pirenzepine (PIR) 当量で 50～150 ng-PIR/L の範囲を示した。H1 受容体に対するアンタゴニスト活性は Diphenhydramine (DIP) 当量で 10000～60000 ng-DIP/L の範囲を示した。 $\beta 1$ 受容体に対するアンタゴニスト活性は Metoprolol (MET) 当量で検出下限値未満～800 ng-MET/L の範囲を示した。

C 下水処理場（オゾン処理採用）の放流水では、消毒プロセスとして塩素処理を採用している B 下水処理場に比べていずれの GPCR に対するアンタゴニスト活性も 10 分の一以下の活性値であった。オゾン処理による医薬品分解の効果と考えられる。

桂川下流域では AT1 受容体に対するアンタゴニスト活性は Olmesartan Medoxomil (OM) 当量で 500～3000 ng-OM/L の範囲を示した。同様に、H1 受容体に対するアンタゴニスト活性は Diphenhydramine (DIP) 当量で 400～800 ng-DIP/L の範囲を示した。

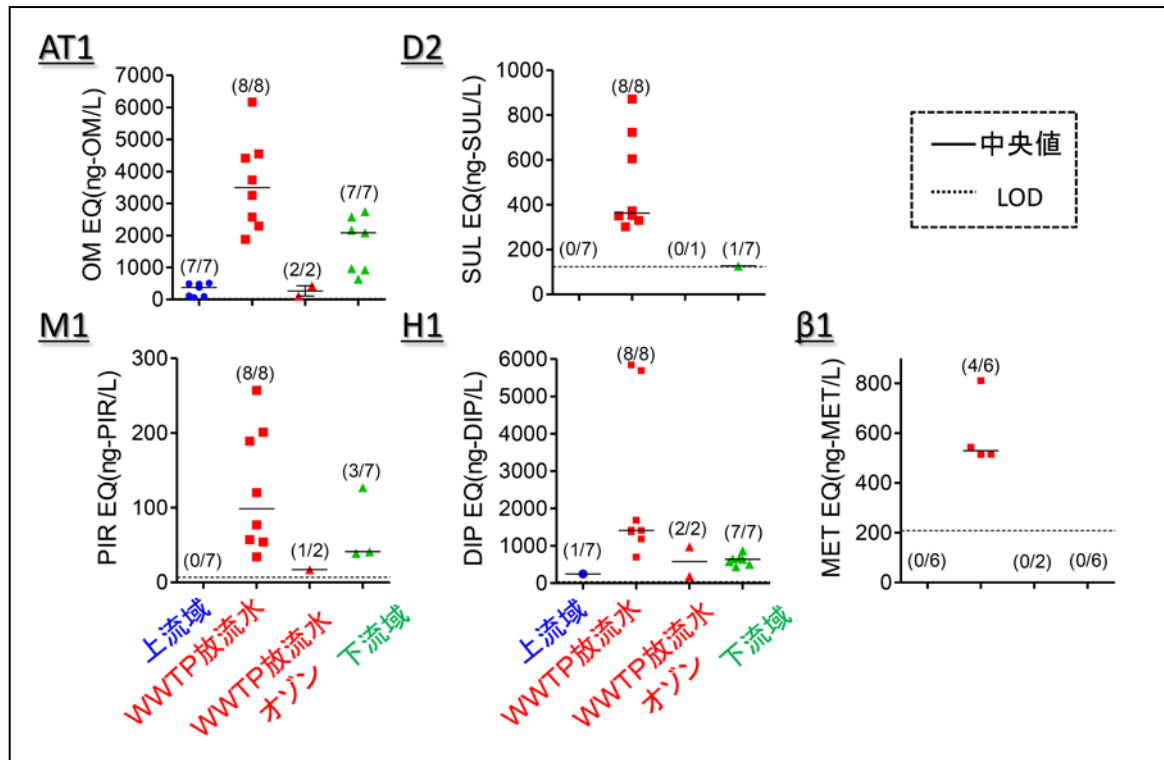


図 7 B・C 下水処理場放流水、桂川上流域、および下流域でのアンタゴニスト活性の変動

AT1, D2, M1, H1 および $\beta 1$ 受容体に対するアンタゴニスト活性を、それぞれ Olmesartan Medoxomil (OM), Sulpiride (SUL), Pirenzepine (PIR), Diphenhydramine (DIP) および Metoprolol (MET) 当量に換算してプロット (log10)。白抜きの記号は検出下限値 (25% 阻害) 未満のサンプルで、検出下限値の 2 分の 1 の値をプロットしている。

3.5 下水処理場放流水および河川水中の医薬品生理活性は水生生物へ悪影響を及ぼ

すレベルにあるのかどうかについての考察

環境水中の医薬品の生物影響を判断する上で重要な点は、今回検出されたレベルのアンタゴニスト活性が生物に影響を及ぼすのかどうかである。H1、D2、M1、および $\beta 1$ 受容体は末梢神経系だけでなく中枢神経系でも発現していることを考えると、これらの受容体に作用する医薬品は生物の行動に異常を与える可能性が考えられる。また、これらの受容体は哺乳類だけでなく魚類でも発現していることが知られており、河川水中での曝露量を考えると魚類への悪影響が最も懸念される。Shedding assay で得られた医薬品当量値と魚類などの *in vivo* での行動試験等で悪影響の観察される濃度と比較することで、今回検出されたレベルのアンタゴニスト活性が生物に影響を及ぼすのかどうか判断が可能である。

GPCR 標的医薬品の魚行動試験の例はまだまだ少ないが、2011 年に H1 受容体のアンタゴニストである Diphenhydramine を fathead minnow に曝露して行動異常を解析した論文が発表されている⁵⁾。この論文では、fathead minnow の稚魚を 7 日間 Diphenhydramine に曝露して成長阻害と捕食異常を引き起こす最低濃度 (Low Observed Effect Concentration; LOEC) を調べている。また、48 時間曝露での致死性についても LOEC を調べている。Diphenhydramine の LOEC と、本研究の shedding assay で得られた環境水試料の Diphenhydramine 当量値を図 8 に示す。致死性と成長阻害の LOEC がそれぞれ 2090 $\mu\text{g/L}$ および 49 $\mu\text{g/L}$ と高濃度であるのに対して、捕食異常の LOEC は 5.6 $\mu\text{g/L}$ と比較的 low 濃度である。本研究で調査対象とした B 下水処理場放流水の H1 受容体に対するアンタゴニスト活性の Diphenhydramine 当量値の範囲は捕食異常の LOEC を超える時があった。桂川下流域においては Diphenhydramine 当量値の範囲は捕食異常の LOEC の 10 分の 1 から 7 分の 1 の値であった。よって、7 日間の曝露の条件であれば桂川流域において魚の行動異常が起こる可能性は低いと考えられるが、河川環境では魚は恒常的に下水由来の医薬品に曝露されており、このような恒常的曝露条件下で行動異常が誘発される可能性を否定できない。今後は、実河川環境での Diphenhydramine 当量値で長期間曝露した場合の魚の行動試験が求められる。

今後は、河川で検出される医薬品生理活性が魚類に悪影響を及ぼすレベルにあるか否かを判断するために、Diphenhydramine の魚曝露試験および行動解析と同様に、D2、M1、および $\beta 1$ 受容体のアンタゴニスト型医薬品による魚曝露試験および行動解析が求められる。

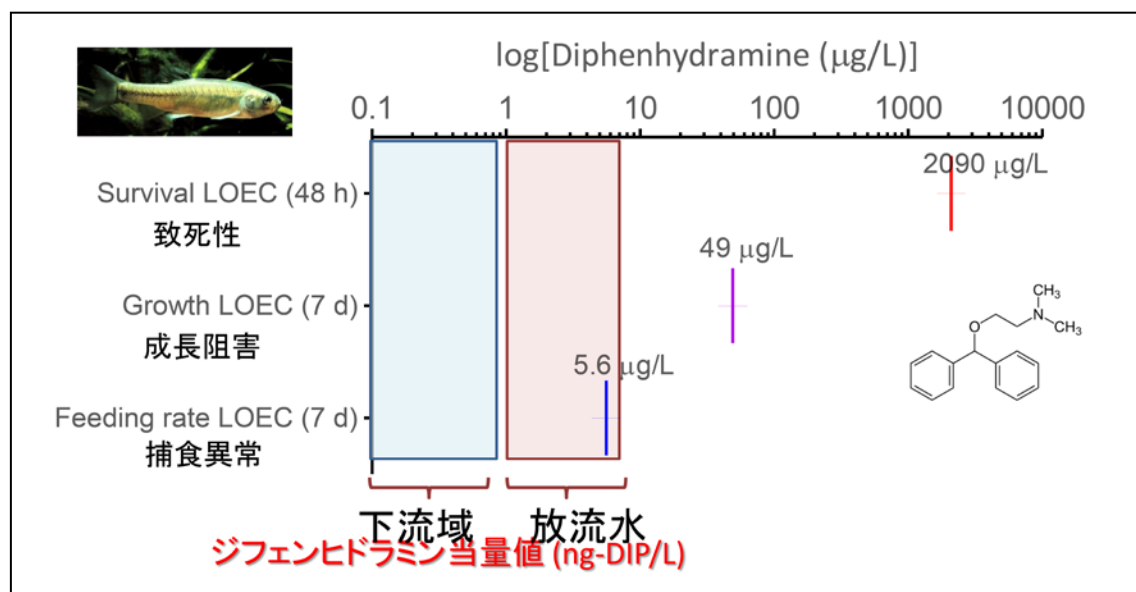


図8 急性、慢性毒性試験での Diphenhydramine の LOEC と環境水の Diphenhydramine 当量値の比較

4. 結論

本研究で得られた結論を以下に示す。

- 1) TGF α shedding アッセイを桂川流域の下水処理場の放流水、桂川の河川水に適用した結果、AT1、D2、 β 1、M1、および H1、受容体に対するアンタゴニスト活性が検出された。
- 2) 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。
- 3) 本研究で調査対象とした B 下水処理場放流水の H1 受容体に対するアンタゴニスト活性の Diphenhydramine 当量値の範囲は試験魚での捕食異常の LOEC (7 日間曝露) 文献値を超える時があった。
- 4) 桂川下流域においては Diphenhydramine 当量値の範囲は捕食異常の LOEC の 10 分の 1 から 7 分の 1 の値であった。よって、7 日間の曝露の条件であれば桂川流域において魚の行動異常が起こる可能性は低いと考えられた。

5. 今後の課題

- 1) 桂川下流域においては Diphenhydramine 当量値の範囲は捕食異常の LOEC の 10 分の 1 から 7 分の 1 の値であり、7 日間の曝露の条件であれば桂川流域において魚の行動異常が起こる可能性は低いと考えられたが、河川環境では魚は恒常的に下水由来の医薬品に曝露されており、このような恒常的曝露条件下で行動異常が誘発される可能性を否定できない。今後は、実河川環境での Diphenhydramine 当量値で長期間曝露した場合の魚の行動試験が求められる。
- 2) 今後は、河川で検出される医薬品生理活性が魚類に悪影響を及ぼすレベルにあるか否かを判断するために、Diphenhydramine の魚曝露試験および行動解析と同様に、D2、

M1、および $\beta 1$ 受容体のアンタゴニスト型医薬品による魚曝露試験および行動解析が求められる。

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.
- 5) Berninger *et al.*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **2011**, *30*, 2065–2072.

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。