

2016.3.9 琵琶湖・淀川水質保全機構 H27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

#### 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、

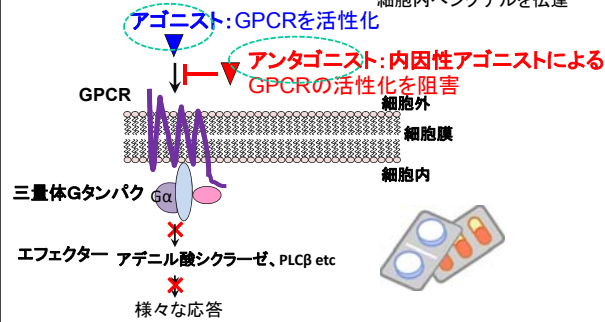
これまで、生理活性(≠致死性、成長阻害、産卵数)を検出できる  
簡便なアッセイ方法がなかったため、検証されてこなかった

### 背景

#### G protein-coupled receptors (GPCRs)

✓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



✓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: 大阪薬科大 東先生)

ランク	販売元	市販名	成分名	効能	標的GPCR
1	武田	プロプレス	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	ミカルディス	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 (オルメサルタンドキシモシル)	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	アーネスト	Carvedilol (カルベジロール)	高血圧	α1B受容体 (アンタゴニスト)
34	小野	オノン	Pranlukast hydrate (プラルカスト水和物)	アレルギー・喘息	L1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, H3 etc. (アンタゴニスト)
37	キョーリン	キプレス	Montelukast Sodium (モンテカストナトリウム)	アレルギー・喘息	L1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・蕁麻疹	H2 and H3受容体 (アンタゴニスト)
89	田辺三菱	メインテート	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

#### Transforming growth factor-α (TGFα) shedding assayの開発

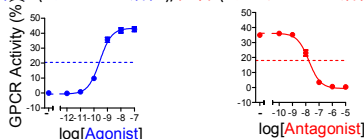
*Nature Methods*, 2012, 9, 1021-1029.

#### TGFα shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation

Asuka Inoue<sup>1</sup>, Jun Ishiguro<sup>1</sup>, Hajime Kitamura<sup>1</sup>, Naoaki Arima<sup>1</sup>, Michiyo Okutani<sup>1</sup>, Akira Shuto<sup>1</sup>, Shigeki Higashiyama<sup>2,3</sup>, Tomohiko Ohwada<sup>4</sup>, Hiroyuki Arai<sup>5,6</sup>, Kumiko Makide<sup>1,7</sup> & Junken Aoki<sup>1,6</sup>

#### TGFα shedding assay:

- ✓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
- ✓GPCRの活性化(=アゴニスト活性)/阻害(=アンタゴニスト活性) 両方を定量可能

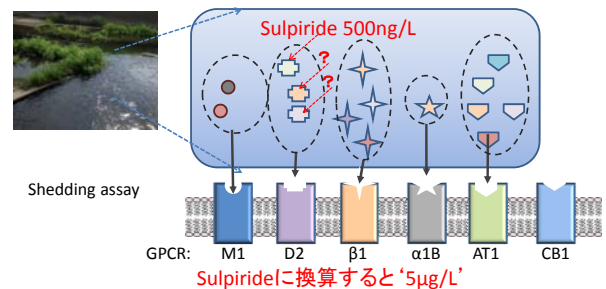


下水中の医薬品の生理活性(GPCRの活性化または阻害)の検出に  
応用出来ないか？

### 背景

#### TGFα Shedding assayから得られる情報

- ①同タイプの多種類の医薬品の活性を**包括活性**として検出(複合影響)
- ②環境水中の医薬品生理活性の強さを、  
代表的な医薬品の濃度に換算(当量値 Equivalent Quantity)
- ③機器分析の対象外の医薬品の活性も検出



**背景** 7  
**下水二次処理水からの医薬品生理活性の検出に成功**

**ENVIRONMENTAL Science & Technology** 2015, 49, 1903–1911  
Detection of Physiological Activities of G Protein-Coupled Receptor-Acting Pharmaceuticals in Wastewater  
Masaru Ihara,\* Asuka Inoue,<sup>1,4</sup> Seiya Hanamoto,<sup>1</sup> Han Zhang,<sup>1</sup> Junken Aoki,<sup>1,4</sup> and Hiroaki Tanaka<sup>1</sup>

✓19種類のGPCRに対してアッセイ実施⇒7種類からアンタゴニスト活性を検出(○)

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					
α1B	アドレナリン	・抗高血圧薬 ・気管支拡張薬	H2	セロトニン	・平滑筋作用薬 ・鎮静睡眠薬
α2A					
β1					
β3	アセチルコリン	・気管支拡張薬	5-HT1A	カンナビノイド	・薬物依存治療
M1					
M2			ED3	プロスタノイド	・平滑筋作用薬

⇒河川水でも医薬品生理活性は検出されるのか？


**目的** 8

TGFα shedding assayを河川水試料に適用して  
医薬品生理活性の有無、程度を調べる



**採水地点** 9

✓桂川流域: 上流域、下水処理場放流水、支流、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





上流域 桂川 京都市 ✓K下水処理場 放流口  
✓T下水処理場 放流口2  
✓T下水処理場 放流口1  
鴨川  
支流 下流域 大阪市

**方法** 10  
**水試料の前処理、TGFα shedding assay**

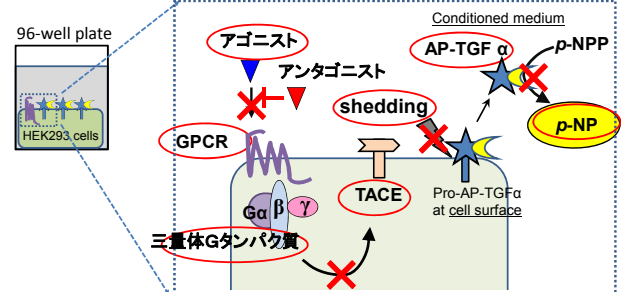
```

    graph TD
      A[水試料 3L] --> B[Filtration GF/B, 1µm]
      B --> C[Solid Phase Extraction OASIS HLB, 200mg]
      C --> D[TGFα shedding assay]
      D --> E[アゴニスト活性]
      D --> F[アンタゴニスト活性]
      E --> G[内因性アゴニストの当量換算]
      F --> H[アンタゴニスト型医薬品の当量換算]
  
```

**方法** 11  
**TGFα 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



96-well plate HEK293 cells  
Conditioned medium  
アゴニスト アンタゴニスト  
GPCR 三重体Gタンパク質  
sheddung  
TACE Pro-AP-TGFα at cell surface  
AP-TGFα p-NPP p-NP

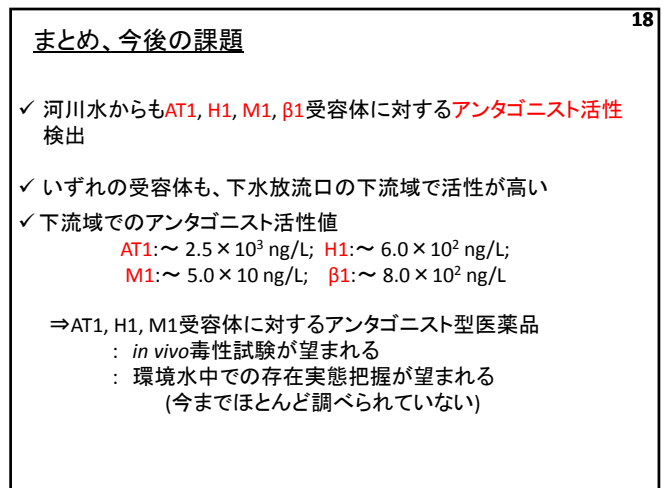
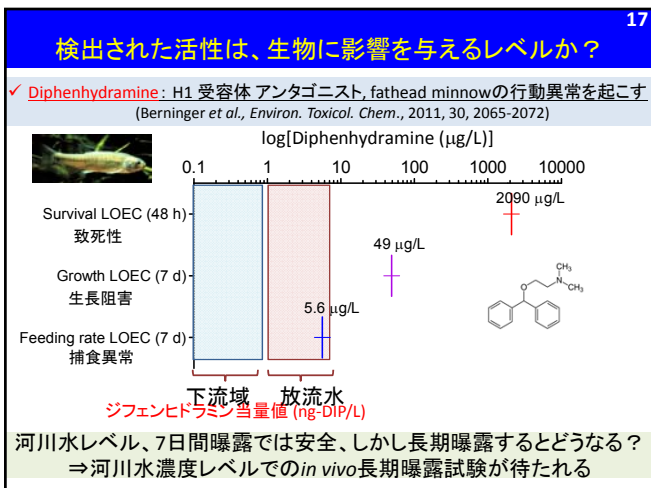
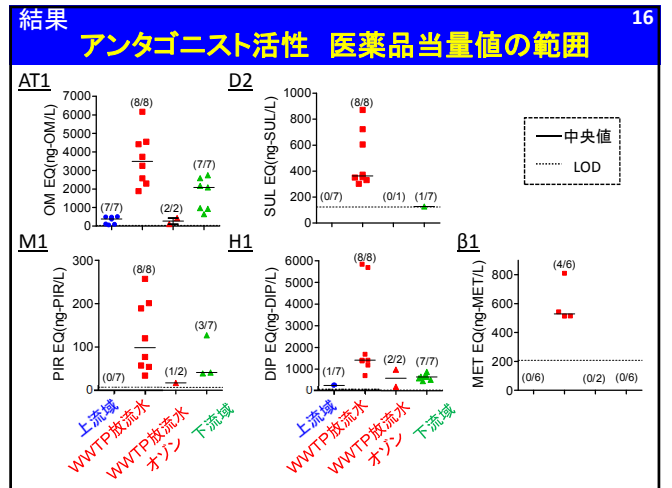
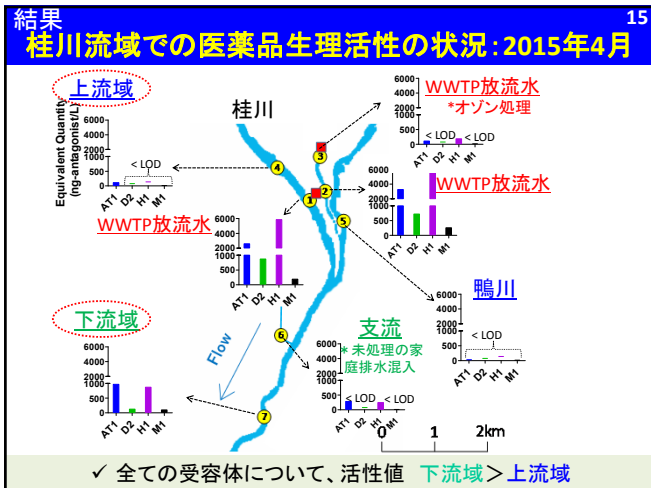
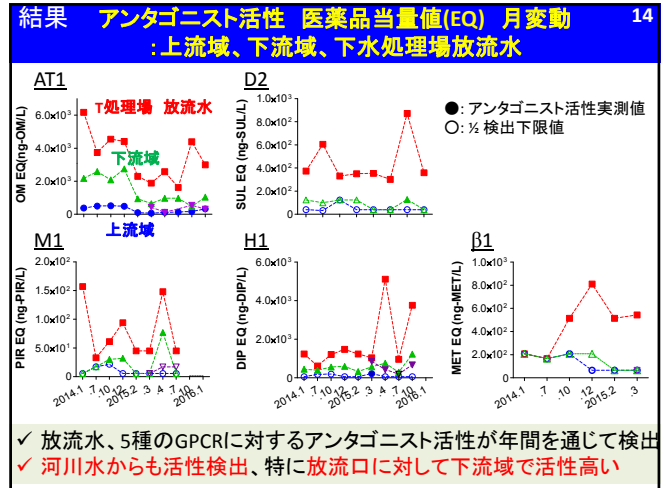
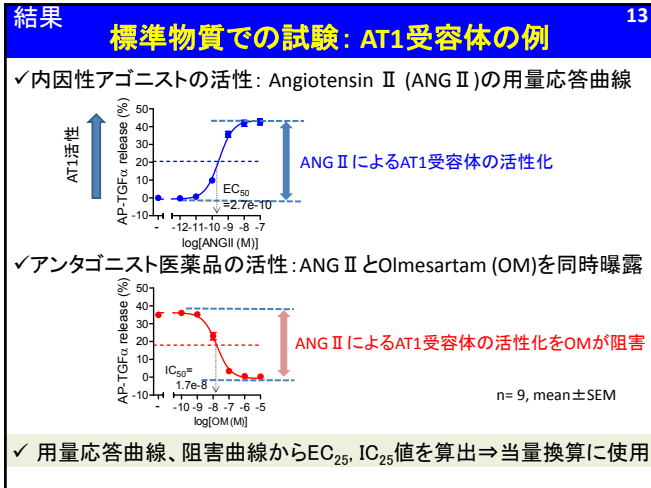
✓ Conditioned medium(CM)黄色に発色 ⇒下水にアゴニストが存在  
✓ CMのアゴニストによる黄色の発色が阻害⇒下水にアンタゴニストが存在

**本研究で選択したGPCR** 12

✓下水二次処理水でアンタゴニスト活性が検出された受容体<sup>1)</sup>のうち、活性値の大きかったAT1, D2, β1, M1, H1受容体を選択

受容体	受容体クラス	アンタゴニスト型医薬品	アンタゴニスト活性の強さ
AT1	アンジオテンシン	Olmesartan	+++
D2	ドーパミン	Sulpiride	+++
α1B	アドレナリン	Carvedilol	+
β1		Metoprolol	++
M1	アセチルコリン	Pirenzepine	+++
V2	バソプレッシン		+
H1	ヒスタミン	Diphenhydramine	+++

1) M. IHARA et. al. Environ. Sci. Technol., 2015.



ご清聴ありがとうございました。

- ✓ 3年間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。
- ✓ TGF $\alpha$  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。