

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

5-1952 環境医薬品の魚類次世代生産への影響解析

令和元年度～令和3年度

Evaluation of Effects of Environmental Pharmaceuticals on Fish Reproduction

〈研究代表機関〉
長崎大学

〈研究分担機関〉
高知大学
京都大学
東京理科大学

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ．成果の概要」の図表番号は「0．通し番号」としております。なお、「Ⅱ．成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ．成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号．通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和4年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5－1. 成果の概要	
5－2. 環境政策等への貢献	
5－3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6－1. 査読付き論文	
6－2. 知的財産権	
6－3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	15
II－1 魚類の行動・繁殖に及ぼす環境医薬品の影響解析 （長崎大学）	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II－2 水域における環境医薬品の汚染実態の把握 （京都大学・高知大学）	28
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II－3 環境医薬品の標的となる魚類生体分子の同定と評価 （東京理科大学）	43
要旨	

1. 研究開発目的
2. 研究目標
3. 研究開発内容
4. 結果及び考察
5. 研究目標の達成状況
6. 引用文献

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細		57
-----------------	-------	----

Ⅳ. 英文Abstract		62
---------------	-------	----

I. 成果の概要

課題名 5-1952 環境医薬品の魚類次世代生産への影響解析

課題代表者名 征矢野 清（長崎大学海洋未来イノベーション機構環東シナ海環境資源研究センター、機構長・教授）

重点課題 主：【重点課題⑭】化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究

副：【重点課題⑮】大気・水・土壌等の環境管理・改善のための対策技術の高度化及び評価・解明に関する研究

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） （5-13）水域生態系に及ぼす医薬品由来化学物質及び内分泌かく乱化学物質の複合影響評価

研究実施期間 令和元年度～令和3年度

研究経費

120,000千円（合計額）

（各年度の内訳：令和元年度：40,000千円、令和2年度：40,000千円、令和3年度：40,000千円）

研究体制

（サブテーマ1）魚類の行動・繁殖に及ぼす環境医薬品の影響解析（長崎大学）

（サブテーマ2）水域における環境医薬品の汚染実態の把握（高知大学・京都大学）

（サブテーマ3）環境医薬品の標的となる魚類生体分子の同定と評価（東京理科大学）

研究協力機関

研究協力機関はない。

本研究のキーワード 医薬品、抗うつ薬、Gタンパク質連結型受容体阻害薬、魚類、繁殖行動、次世代生産、応答遺伝子、水域汚染

1. はじめに（研究背景等）

人が使用した医薬品は下水処理場を経由して河川や湖沼などの水域に流入する（図0.1）。我々は、環境中に存在する医薬品由来の化学物質を環境医薬品と呼ぶが、特に水域環境への流入と集中が予測されており、そこに生息する水生生物への影響が懸念される。環境医薬品の濃度は、高齢化社会による医薬品使用量の増加に伴い上昇すると予測される。EUでは新規開発医薬品の環境影響評価の実施が義務付けられているが、急性毒性評価が中心であり、水域に存在する低濃度での生物影響への対策はとられていない。近年、欧米を中心に、低濃度での医薬品曝露による魚類行動異常が研究されているが、それらは序についたばかりであり、その作用機序は明らかにされていない。また、これまでの水域での医薬品負荷の有無やその強度に関する情報も不十分である。医薬品は人の健康の維持に必須であるためその環境負荷には目を瞑りがちであるが、環境医薬品の生物影響を正しく理解し、適正な医薬品開発・使用・処理を進めることが環境先進国には要求される。これは我国が定めた「経済再生運営と改革の基本方針2018」にある「化学物質対策に関する研究」に該当する課題である。

環境医薬品とは・・・

- ◆自然環境中に存在する医薬品由来の化学物質
- ◆多くの医薬品は継続的に使用されることから、水環境へ一定濃度で流入

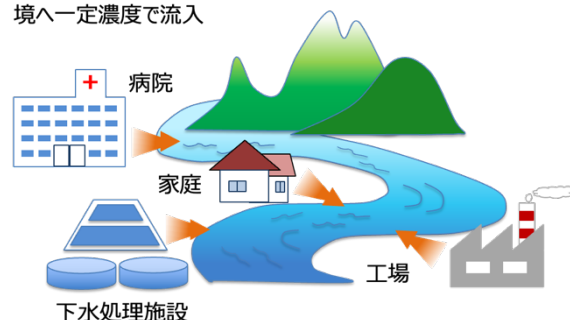


図0.1 環境医薬品の水域への流入

日本で処方量が多く水域から高濃度で検出されると予測される環境医薬品は G タンパク連結型受容体阻害薬（GPCR阻害薬）*と抗うつ薬**である（図0.2）。これらは神経細胞に作用することから、脳を中心とした神経中枢や神経内分泌系へ影響し、魚類の正常な行動や生理機能を阻害する可能性が高い。とりわけ次世代生産（繁殖）に関わる生理・行動現象への影響が健全な生態系を維持する上で懸念される。この課題の解決には、環境医薬品による生物影響とその作用機序を明確にする必要がある。

この様な背景と環境医薬品研究の現状から、環境中の医薬品由来の化学物質の動態とそれらの魚類影響を細胞応答・分子応答・個体応答の視点から明らかにすることを、世界に先駆けて計画し、実施した。

*GPCR阻害薬：G タンパク連結型受容体を標的とし、神経伝達物質による情報伝達を阻害する医薬品（図0.3）。標的とする受容体にはアンギオテンシン（AT1）受容体、ヒスタミン（H1）受容体、アドレナリン（ β 1）受容体、ドーパミン（D2）受容体、アセチルコリン（M1）受容体、などが存在する。

日本における医薬品処方とその特徴

Rank	薬効分類	薬剤料 (十億円)
1	循環器官用薬	827
2	中枢神経系用薬	799
3	その他の代謝性医薬品	744
4	腫瘍用薬	426
5	消化器官用薬	412
6	血液・体液用薬	353
7	アレルギー用薬	216
8	化学療法剤	190
9	泌尿生殖器官および肛門用薬	126
10	漢方製剤	125
11	ビタミン剤	102
12	ホルモン剤	82
13	抗生物質製剤	56
14	滋養強壮薬	53
15	呼吸器官用薬	40

2019年度医薬品使用金額ランキング
(厚生労働省HPより)

抗うつ薬／抗精神病薬を含む

細胞内の標的分子

- Gタンパク質連結型受容体（GPCR）
- モノアミントランスポーター

- ◆ GPCR阻害薬/抗うつ薬は脳を中心とした中枢神経にも作用
- ◆ 医薬品の半分はGPCR阻害薬/抗うつ薬

図0.2 日本における医薬の処方とその特徴

**抗うつ薬：神経伝達物質（セロトニンやノルアドレナリンなど）の再取り込みに関与するものアミントランスポーターに作用し、これらの再取り込みを阻害することで、神経伝達物質の量を増やし抗うつ効果を発揮する医薬品（取り込み阻害薬、選択的セロトニン再取り込み阻害薬SSRI、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 SNRI）（図0.3）。また、セロトニンやノルアドレナリンの放出を促進させる作動性抗うつ薬もある（ノルアドレナリン作動性・選択的セロトニン作動性抗うつ薬 NaSSA）。ただし、これらの薬は、同時にGPCRにも作用する能力を有することが多い。

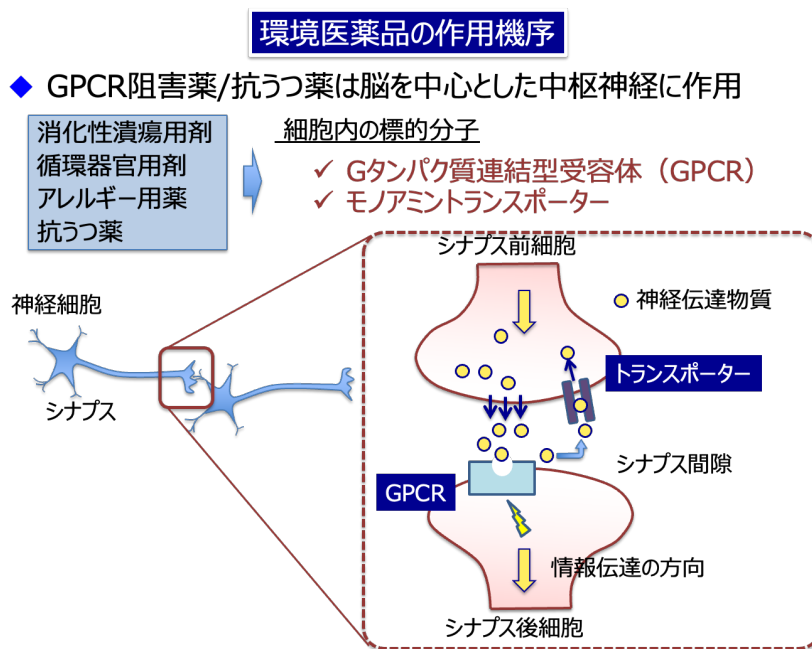


図0.3 環境医薬品の標的となるGタンパク質連結型受容体とモノアミントランスポーターの役割

2. 研究開発目的

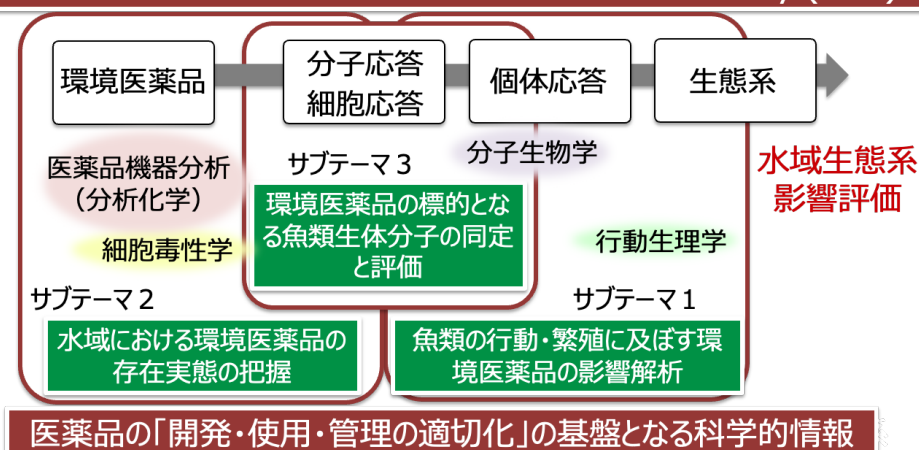
人が使用した医薬品は下水処理場を経由して水域に流入するが、高齢化社会による医薬品使用量の増加に伴い、水環境中に存在する医薬品（環境医薬品）の濃度は上昇すると予測される。特に処方量の多いGPCR阻害薬と抗うつ薬は、水域から高濃度で検出される可能性が高い。そこで本研究では、これらの物質の水域環境への負荷を、魚類[ミナミメダカ (*Oryzias latipes*、以下メダカ) 及びアユ (*Plecoglossus altivelis*)] の次世代生産に及ぼす影響を中心に解明する。実環境中における環境医薬品の動態を近畿圏の河川・下水処理場を対象として、機器分析によって明らかにするとともに、標的受容体を組み込んだ細胞培養系を用いて環境水の薬理活性を評価する。また、環境医薬品の影響を細胞応答・分子応答・

個体応答の各視点から評価し、これら生物応答の成果を有機的に結合させることによって環境医薬品の水域生態系への影響を明らかにし、環境医薬品の Adverse Outcome Pathway (AOP) を構築の基盤を整備する(図0.4)。本研究におけるAOPは環境医薬品による悪影響が分子から個体、さらに生態系まで連動してどのように起こるのかを示すことである。加えて、

環境医薬品の汚染実態から個体・生態系影響へ連動した理解

行動生理学的手法と分子生物学的手法を駆使して、環境医薬品の魚類影響を個体応答・細胞応答・分子応答の視点から明らかにするとともに、天然水域における環境医薬品影響調査への展開も視野に入れた研究を、世界に先駆けて実施する。

水域における環境医薬品の Adverse Outcome Pathway (AOP)



医薬品の「開発・使用・管理の適切化」の基盤となる科学的情報

図0.4 本研究の目的：環境医薬品の汚染実態から個体・生態系影響への連動した理解

琵琶湖淀川水系をモデル水域として環境医薬品の魚類次世代生産への影響の実態解明を試みる。本研究では目的達成に向けて、サブテーマ1として魚類の行動・繁殖に及ぼす環境医薬品の影響解析を、サブテーマ2として水域における環境医薬品の存在実態の把握を、サブテーマ3として環境医薬品の標的となる魚類生体分子の同定と評価を実施する。

水域環境中の環境医薬品を「0」にすることはできない。我々が医薬品を使用しながら環境と共生した暮らしを続けるためには、医薬品の環境影響について正しい知識を持つべきであり、それは我が国の環境行政において重要な点である。そのためには、汚染の度合い（河川等における実際の医薬品濃度とその薬理活性）と生物影響の関係、また、魚類に対して強い作用を持つ医薬品の種類などを明らかにすることが必要である（図0.5）。本研究ではこのような視点に立ち、行政対応の基盤となる科学的知見を提供するとともに、一般市民に対し環境医薬品による新たな環境汚染に関する正しい情報を提供する。

◆ 環境中の濃度と生物影響を結びつけて考える基盤の整備

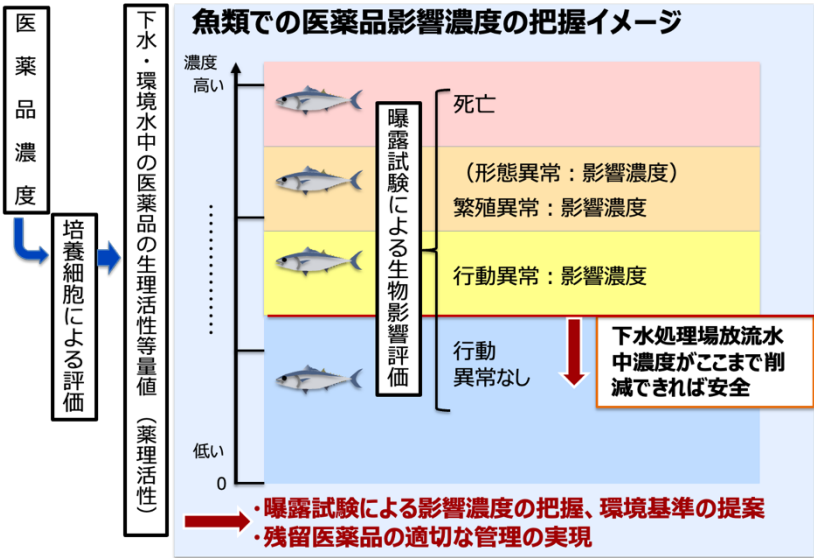


図0.5 環境中の濃度と生物影響を結びつけ、水域環境及び生態系の健全性を考える基盤整備が必要

3. 研究目標

全体目標	水環境における医薬品の濃度（等量値）を明らかにするとともに、魚類の次世代生産に及ぼす影響を、行動生理学的・細胞毒性学的・分子生物学的視点から明らかにし、環境医薬品の水環境への負荷の程度を評価するとともに、環境医薬品のAdverse Outcome Pathway（AOP）を構築し、水域生態系への影響評価の基盤を整える。
サブテーマ1	魚類の行動・繁殖に及ぼす環境医薬品の影響解析
サブテーマリーダー/所属機関	征矢野 清／長崎大学
目標	1) メダカ及びアユを試験生物として用い、その行動評価法を確立し、繁殖行動を含めた魚類の異常行動判定のための評価基準を整備する。 2) サブテーマ2により得られた水域の環境医薬品存在実態のデータ及び日本における処方量の観点から、試験対象とする抗うつ薬及びGPCR阻害薬を選定し、メダカ及びアユにおける曝露濃度設定を行うとともに、行動影響及び繁殖影響を明らかにする。

サブテーマ2	水域における環境医薬品の汚染実態の把握
サブテーマリーダー /所属機関	井原 賢／高知大学 (採択時は、京都大学工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター、2021年10月より高知大学農林海洋科学部)
目標	1) 下水や環境水中の抗うつ薬/GPCR阻害薬に対するヒト受容体及び魚受容体の応答を解明する。その結果から、環境モニタリングや魚での <i>in vivo</i> 曝露試験で優先して対象とすべき抗うつ薬/GPCR阻害薬を明らかにする。 2) 質量分析計による環境医薬品の分析法を開発し、医薬品活性の原因である環境医薬品をつきとめ、汚染実態を把握する。

サブテーマ3	環境医薬品の標的となる魚類生体分子の同定と評価
サブテーマリーダー /所属機関	宮川 信一／東京理科大学
目標	1) 環境医薬品の存在実態把握や作用機構解明に向け、魚類における医薬品応答遺伝子に関する分子基盤を整備する。 2) 医薬品応答遺伝子を取得し、魚類の行動・繁殖への影響を遺伝子発現の面から評価する。

4. 研究開発内容

本研究では、環境医薬品の実環境中における動態と薬理活性を評価するとともに、それらの影響を個体応答・細胞応答・分子応答の各視点から評価し、環境医薬品のAdverse Outcome Pathway (AOP)を構築の基盤を整備するため、各サブテーマにおいて以下の実験を実施した(図0.6)。

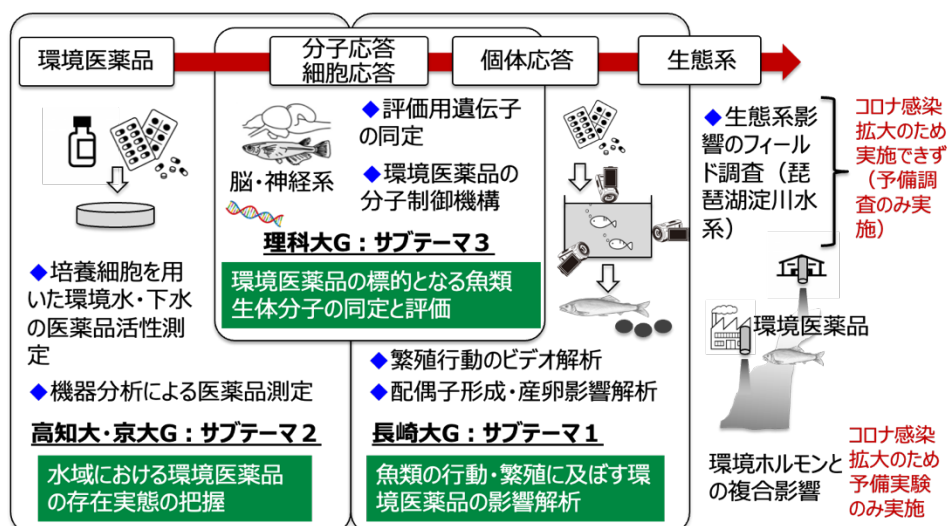


図0.6 研究体制と各サブグループの研究内容

サブテーマ1：魚類の行動と配偶子形成・産卵に及ぼす環境医薬品（GPCR阻害薬と抗うつ薬）を個体応答から明らかにするために、以下の実験を行なった。①メダカを対象生物とし、医薬品曝露の行動影響評価手法を確立し、それに沿って複数の医薬品によるメダカへの曝露実験を実施して、行動を動画解析した。これにより、環境医薬品による行動異常の有無とその特徴を明らかにした。また、メダカへの曝露試験によって配偶子形成と産卵への影響を解析した。②アユにおける産卵行動と産卵への環境医薬品の影響を解明するための評価手法を確立し、それに沿って環境医薬品によるアユへの曝露試験を実施して、繁殖への影響の有無とその特徴を明らかにした。これに加えて、③アユを対象とした環境医薬品影響実態を把握するためのフィールド調査を、医薬品応答遺伝子を指標として実施する計画を立てたが、コロナ感染拡大の影響を受け、予備調査を実施するに留まった。

サブテーマ2：日本において処方量の多い医薬品（GPCR阻害薬と抗うつ薬）に対する標的受容体の応答（細胞応答）を調べ、各化学物質の薬理活性***を明らかにするとともに、湖沼/河川や下水放流水中に存在する環境医薬品の活性を等量値****として把握することを目指し、以下の実験を行なった。また、医薬品の濃度の同時分析（一斉分析）法の開発を進め、環境水中の環境医薬品の存在実態の把握を目指した。①サブテーマ3で得た魚類受容体の情報をもとに、魚類受容体を用いた培養細胞試験によって医薬品に対する薬理活性を調べ、標的受容体の応答を明らかにするとともに、人用医薬品に対する魚類の応答性を明確化した。②琵琶湖淀川水系/下水処理場放流水の環境医薬品の等量値を算出した。③原因物質特定のため、薬理活性が強い抗うつ薬およびGPCR阻害薬の質量分析計での分析方法を開発し、機器分析による医薬品の濃度定量を進め、河川及び下水処理水における環境医薬品の動態を調べた。

***薬理活性：薬理活性は、*in vitro*アッセイによって得た受容体・トランスポーターを阻害する医薬品の能力。薬理活性の指標としては、受容体の活性を20%阻害する医薬品の濃度(IC20値)、あるいは受容体の活性を50%阻害する医薬品の濃度(IC50値)が良く用いられる。アッセイに用いる医薬品と受容体の組み合わせを変えることで、医薬品が標的とする受容体毎の活性を評価することもできる。

****医薬品濃度（等量値）：環境水を固相抽出して得られた濃縮液を*in vitro*アッセイにかけ、アッセイで得られた環境水のIC20値(濃縮倍率として求められる)で参照医薬品のIC20値を除することで得られる。環境水が持つ受容体の阻害能力を、参照医薬品の濃度としてあらわした値である。参照医薬品は、各受容体阻害の活性値が最も強い阻害薬を選定しており、本研究ではGPCR阻害薬としてAT1受容体のvalsartan、D2のdomperidone、M1のtrospium、 β 1のpropranolol、H1のmirtazapine、セロトニントランスポーターとして活性値が最も強いparoxetine。

サブテーマ3：魚類の環境医薬品（GPCR阻害薬と抗うつ薬）の標的となりうる遺伝子の分子基盤を整備し、環境医薬品の作用機序の解明を進めるため、各サブテーマにおいて得られた成果を共有かつ活用し、以下の実験を実施した。①既存の化学物質と異なる環境医薬品の存在実態把握や作用機構解明に向け、医薬品の標的となる受容体を魚類において初めてクローニングし、魚類受容体を用いた細胞培養評価系の確立に寄与した（評価系構築はサブテーマ2）。②魚類における医薬品応答遺伝子解析を進め、環境医薬品応答に関する分子基盤を整備した。③医薬品応答遺伝子と魚類の行動・繁殖への影響を関連付け、環境医薬品のAOP構築の基盤を整備した。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

環境水中における環境医薬品の動態から、これら化学物質の細胞応答・分子応答・個体応答を関連付けて理解し、生態系への影響を評価するため、サブテーマ1「魚類の行動・繁殖に及ぼす環境医薬品の影響解析」、サブテーマ2「水域における環境医薬品の存在実態の把握」、サブテーマ3「環境医薬品の標的となる魚類生体分子の同定と評価」のそれぞれの各視点からこの問題に取り組んだ。

各サブテーマ毎の成果概要

サブテーマ1 魚類の行動・繁殖に及ぼす環境医薬品の影響解析（サブテーマリーダー、征矢野清・長崎大学）

環境医薬品によるメダカの繁殖行動評価法確立とアユの産卵行動と繁殖影響解析の基盤整備

1) メダカの行動を動画解析ソフトを用いて解析する手法を確立した。ミルタザピンを用いた環境医薬品の行動解析から、医薬品曝露後に観察される表層遊泳性を影響指標とし、メダカの遊泳深度局在を動画から正確かつ簡便に定量化できる手法を整備した。この手法を用いて15種医薬品によるメダカ行動影響評価を実施した。2) 抗うつ薬及びGPCR阻害薬をメダカに曝露したところ、全15種医薬品のうち、セロトニントランスポーターへの作用を有する抗うつ薬及び抗精神病薬全8種がメダカの表層遊泳性を誘導したが、抗アレルギー薬や消化管機能改善薬など作用機序の異なる7種の医薬品にはその誘導性は認められなかった。また、その影響の濃度閾値及び残留性についても一部明らかにした。サブテーマ2との連携により、曝露水中医薬品の濃度分析に関して、試料採取・準備～微量分析までの安定的実施を可能にした。3) メダカにおいて表層遊泳性を誘起した4種の医薬品（ミルタザピン、クロルプロマジン、アミトリプチリン、デュロキセチン）を曝露したメダカの産卵状況を確認したところ、産卵数に加えて受精率の低下も認められた。また、クロルプロマジンを曝露した個体では、卵黄蓄積の阻害、卵母細胞の退行が認められた。これらの結果は、これらの医薬品が繁殖現象を統御する内分泌系（視床下部-下垂体-卵巣軸）に関わる内分泌系へ作用することを推測させる。4) アユにミルタザピンを曝露したところ、産卵行動（流れに向かって雌雄で泳ぐ行動）が阻害された。また産卵数も少なく、産卵されたもののほとんど未受精卵（死卵）であった。医薬品はアユの産卵行動を阻害することによって次世代生産に影響することが分かった。5) メダカ及びアユで行動影響を引き起こした医薬品曝露個体の脳を採取し、サブテーマ3で実施する遺伝子発現変化解析の材料として提供した。6) 琵琶湖流入河川において天然アユの予備調査を実施し、少なくとも大津市の2河川で天然アユの捕獲が可能であることを確認した。しかし、コロナ感染拡大のため、本格的に調査は実施できなかった。

サブテーマ2 水域における環境医薬品の汚染実態の把握（サブテーマリーダー、井原賢・高知大学）
魚類受容体遺伝子を用いた培養細胞試験の確立、質量分析計での環境医薬品濃度データ収集

1) 処方量の多い抗うつ薬(23種)、GPCR阻害薬(48種)をリストアップし、ヒト受容体に対する薬理活性を測定した。その結果、処方量が多く、薬理活性の強い医薬品をサブテーマ1の魚類を用いた曝露試験の対象医薬品として選定した。2) サブテーマ3より提供されたメダカとアユの受容体情報をもとに、これらの受容体を組み込んだ発現プラスミドを作成し、魚類受容体に対するGPCR阻害薬/抗うつ薬の活性を測定した。その結果、環境医薬品は魚類の受容体も阻害することが体系的に明らかとなった。医薬品と受容体の相互作用としては、ヒトよりも魚類の受容体が強い阻害を受ける場合があることが分かった。3) GPCR阻害薬や抗うつ薬は複数の受容体やモノアミントランスポーターを阻害することが確認された。また、代謝物が阻害活性を保つこと、代謝によって標的受容体が変化する場合があります。4) サブテーマ1の魚類曝露試験による行動異常の誘導は、セロトニントランスポーター（SERT）の阻害を介して誘発される可能性があることが分かった。しかし、複数の受容

体を介して誘発される可能性もある。5) 下水処理場放流水の受容体阻害活性は、医薬品等量値として $\mu\text{g/L}$ から mg/L に迫る強さを示した。サブテーマ 1 で表層遊泳の見られた医薬品の濃度に匹敵する場合もあることが分かった。6) GPCR 阻害薬及び抗うつ薬成分について、環境試料用の一斉分析、曝露試験試料用の単物質分析法を検討し、前者については 68 成分の一斉分析法を、後者については 13 成分に対する分析法を確立した。7) 一斉分析法を用い、近畿圏の下水処理場における流入・放流実態、そして除去実態について調査を行い、知見を集積した。8) GPCR 阻害薬及び抗うつ薬成分の下水処理場への流入量は、日本国内における生産量と正の相関関係が確認されたが、市販薬 (OTC 薬) 成分については比較的大きな乖離が確認されたこと、分解もしくは代謝産物はそもそも同様の比較ができないことから、実測によるモニタリングの必要性が示された。9) GPCR 阻害薬及び抗うつ薬成分の下水処理場での除去率は概して低く、一部の分解もしくは代謝産物については下水処理過程での生成も示唆された。10) 放流水中で検出された GPCR 阻害薬及び抗うつ薬成分の濃度から算出した paroxetine 等量濃度 (理論活性値) は、実測された活性値と正の相関関係が確認され、(es)citalopram、*O*-desmethyl venlafaxine (ODV)、duloxetine、paroxetine、sertraline などの比較的高い寄与が示唆された。

サブテーマ 3 環境医薬品の標的となる魚類生体分子の同定と評価 (サブテーマリーダー、宮川信一・東京理科大学)

複数魚種の医薬品標的受容体の分子基盤の整備

1) メダカから抗うつ薬の標的となるモノアミントランスポーターの遺伝子をデータベースを利用して 4 種取得した (セロトニントランスポーターを 2 分子種、ノルエピネフrintransポーターを 1 分子、ドーパミントランスポーターを 1 分子)。また、GPCR については、メダカから HRH1、DRD2、DRD2-like、ADRB1、CHRM5a 遺伝子およびアユから HRH3、ADRB1、DRD2 をクローニングし、配列を決定した。2) これらの遺伝情報を用いて、モノアミントランスポーターと GPCR の分子系統樹を作成しその進化的近縁性を検討したところ、ヒトと魚類の SERT と GPCR は同じクレード (共通の祖先から派生した分類群) に属し、類似の働きをする可能性が高いことが分かった。これは、医薬品応答に対する種間差を議論する有用な情報である。3) サブテーマ 2 と連携し、これらの情報をもとに魚類受容体に対する GPCR 阻害薬/抗うつ薬の活性測定のための細胞培養系確立に成功した。環境医薬品に対して魚類はヒトと同じ分子応答を示すこと分かった。4) サブテーマ 1 と連携し、メダカにミルタザピン、アミトリプチリン、クロルプロマジンを経口投与し、またアユにミルタザピンを経口投与し、メダカへのミルタザピン曝露による遺伝子発現と比較したところ、両種で共通する応答遺伝子を 23 遺伝子取得した。5) メダカとアユを用いた応答遺伝子の解析から、中枢時計分子を含む概日リズム関連遺伝子の発現変動が数多く確認された。これにより、環境医薬品の概日リズム関連遺伝子への影響とサブグループ 1 で明らかにされた行動や繁殖異常などの表現型との関連が示唆された。

全体の成果概要

本研究の目的は、各サブテーマの課題を連結させ、環境医薬品の水域における存在実態を把握するとともに、その生物応答 (細部・分子・個体) を理解することによって、水域生態系への影響を評価しようとするものであり、その科学的基盤の整備を目指している。各サブテーマの成果にある通り、1) 魚類の受容体を組み込んだ細胞培養系によって、環境医薬品の環境水における医薬品濃度 (等量値) の評価系が可能となり、2) 質量分析計による同時分析の開発によって、環境水中の環境医薬品と一部の代謝物の濃度の測定が可能となった。これにより、未だ世界的に情報の少ない環境水中に存在する環境医薬品の実態を効率よく分析できる。また、処方量が多く環境水中の実濃度が高い医薬品に対する魚類の行動と繁殖に対する影響解析を進めた結果、3) モノアミントランスポーターを標的とする医薬品によって表層遊泳が誘発されたり産卵行動が阻害されること、4) 産卵量の減少など繁

殖（次世代生産）への影響することが明らかとなった。これは行動異常をエンドポイントとした評価手法の提案に繋がる。さらに、医薬品曝露個体を用いた応答遺伝子の網羅的解析によって、5）医薬品に曝される事によって増減する遺伝子があること、特に中枢時計分子を含む概日リズム関連遺伝子が影響を受ける可能性があることが分かった。これは、医薬品の作用機序を知ることにより、特定の遺伝子を分子マーカーとした新たな評価系確立を可能とする知見である。これらの成果は、河川や下水処理水等における環境医薬品汚染の程度とそれによって起こる生物影響を、その作用機序も含めて理解するために不可欠な情報であり、生態系への影響も含めたAOP構築の基盤が整備された（図0.7）。測定方法改善、応答遺伝子のより詳細な検討による医薬品の作用機序解明、行動や産卵などの生物影響を誘発する分子メカニズムなど、環境医薬品の評価手法を開発するにあたり、研究すべき内容なまだ多い。しかし、本研究の成果は、これまで極めて知見の少なかった環境医薬品の実態とその作用を学際的・複眼的に明らかにする道筋となるものであり、科学的価値はもとより、環境行政への貢献に繋がるものである。

本研究により得られた環境医薬品に関する初めての成果

- モノアミントランスポータを標的とする医薬品による表層遊泳誘発・産卵行動阻害
- 産卵量の減少など繁殖（次世代生産）への影響
- 魚類の受容体を組み込んだ細胞培養系を用いた、環境水中の医薬品濃度（等量値）の評価
- 質量分析計による同時分析の開発と、それを用いた環境水中の環境医薬品と一部の代謝物の濃度の測定
- 医薬品に応答し増減する遺伝子の解析、特に中枢時計分子を含む概日リズム関連遺伝子の医薬品に対する応答

行動異常をエンドポイントとした評価手法の提案

環境水中の環境医薬品の実態を効率よく分析可能。

特定の遺伝子を分子マーカーとした新たな評価系確立

河川や下水処理水等における環境医薬品汚染の程度とそれによって起こる生物影響を、その作用機序も含めて理解するために不可欠な情報を得ることに成功した。それによって、生態系への影響も含めたAOP構築の基盤が整備された

図0.7 AOP構築と環境医薬品影響評価のための基盤整備

本研究成果は、R4年度より開始された環境研究総合推進費【5-2204】魚類に対する環境医薬品の影響評価法開発に関する研究～環境分析・分子応答・行動/繁殖解析による融合評価基盤の構築～へと引き継がれた（図0.8）。

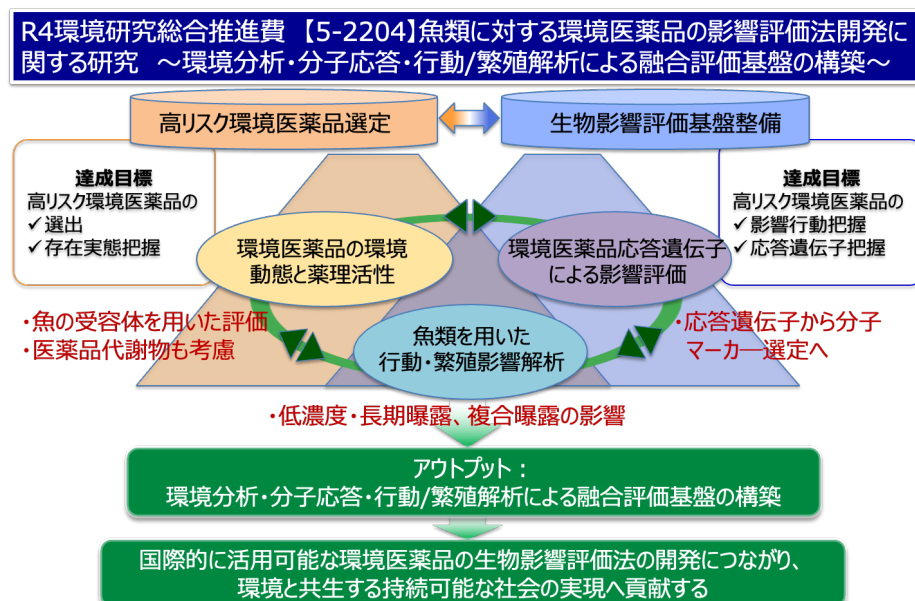


図0.8 本研究の成果をもとに、環境医薬品影響評価法開発に向けた新たな研究：
R4環境研究総合推進費

5－2．環境政策等への貢献

＜行政等が既に活用した成果＞

- 1) 環境省環境保健部環境安全課では、環境水中で検出される医薬品・生活関連物質（Pharmaceutical and Personal Care Products, PPCPs）による生態系への影響把握のための調査研究業務を行っており、「PPCPsによる生態系への影響把握研究班会議」を定期的で開催している。この会議に分担研究者の井原が出席し、急性・慢性の生態影響試験（藻類・甲殻類・魚類）の対象物質候補の選定のため、本研究の成果である GPCR 阻害薬の処方量及び薬理活性のデータを提供し、優先して試験すべき候補物質の提案を行うなど、環境政策へ貢献している。
- 2) 環境省では毎年、化学物質環境実態調査として化学物質の環境中の存在状況を調査しているが、この調査で対象とすべき医薬品の選定にも我々のデータを提供した。

＜行政等が活用することが見込まれる成果＞

- 3) 我々の研究では環境水中での抗うつ薬及び GPCR 阻害薬の濃度を機器分析によって解析したが、この調査データは、環境省が行っている医薬品等の水環境中濃度の情報収集に大きく貢献することが期待される。
- 4) 「PPCPsによる生態系への影響把握研究班会議」においては、医薬品の環境リスク評価における新たなエンドポイントを見出す検討が行われている。本研究で実施する魚曝露試験では、抗うつ薬及び GPCR 阻害薬が神経細胞で発現する受容体に作用することを鑑み、行動異常をエンドポイントに据えて研究を進めた結果、モノアミントランスポーターを標的とする医薬品では、表層遊泳など特定の行動異常が誘起されることがわかった。これは、その必要性が問われている魚類を用いた環境医薬品の評価系構築に大きく貢献する。
- 5) 本研究では、行動影響を引き起こす医薬品の作用機序の共通性が認められたことから、新たなエンドポイントの提案、試験方法の提案につながる事が示された。
- 6) 本研究において、我が国の重要水産対象魚類であり、淡水域において重要な生態的地位を示すアユにおいて、環境医薬品が次世代生産に影響することが明らかとなったが、内水面環境の維持・整備に本成果は大きく貢献する。
- 7) 魚類の次世代生産に及ぼす環境医薬品の作用機序を行動生理学・細胞毒性学・分子生物学の手法を用いて明らかにし、細胞応答や機器分析によって水環境中の環境医薬品の濃度を定量することで、医薬品の適切な取り扱いと健全な生態系維持のための水域環境管理を後押しするデータを提供することができる。我々が得た知見は「経済再生運営と改革の基本方針 2018」に課題として取り上げられた「化学物質対策に関する研究」に貢献できるものである。
- 8) 我々の研究成果は、水環境中の濃度測定だけではなく、魚の遺伝子応答及び行動を含む生物応答によって環境医薬品の影響の程度を提示するので、医薬品の魚類次世代生産への悪影響の有無を総合的に知ることができるとともに、影響がある場合には医薬品を下水処理でどこまで削減すべきかの基準を提案することができる（図 0.5 参照）。
- 9) 本研究により、医薬品の分子応答の理解が進み、新たな分子マーカーを用いた環境医薬品評価系（フィールド調査による医薬品影響評価を含む）の構築基盤が整備されつつあることから、今後この成果を用いた評価系開発に期待がかかる。
- 10) 医薬品の作用機序（構造的特徴）から、魚類の行動・繁殖、さらには次世代生産への影響を評価できる体制を提案できる。

5－3．研究目標の達成状況

本研究の全体目標は、1) 水環境における医薬品の濃度（等量値）を明らかにするとともに、魚類の次世代生産に及ぼす影響を、行動生理学的・細胞毒性学的・分子生物学的視点から明らかにし、

環境医薬品の水環境への負荷の程度を評価するとともに、2) 環境医薬品のAdverse Outcome Pathway (AOP)を構築し、水域生態系への影響評価の基盤を整える。それぞれについて、サブテーマ毎の成果とともに達成状況を示す。

全体目標1)：水環境における医薬品の濃度（等量値）を明らかにするとともに、魚類の次世代生産に及ぼす影響を、行動生理学的・細胞毒性学的・分子生物学的視点から明らかにし、環境医薬品の水環境への負荷の程度を評価する。

達成度◎：目標を上回る成果をあげた。

重要な達成点

●魚類の行動を指標とした環境医薬品の評価手法の開発とそれを用いた医薬品の行動解析・・・表層遊泳を指標とした環境医薬品の評価が可能となった。（サブテーマ1）（図1.1、図1.2、図1.3、図1.4、図1.18、表1.1、表1.2、表1.3）

●医薬品による魚類の行動と繁殖影響を介した次世代生産への影響評価・・・環境医薬品によって繁殖への影響が明らかとなり、次世代影響を評価する指標が得られた。（サブテーマ1）（図1.6、図1.7、図1.8、図1.9、図1.10、図1.11、図1.12、図1.13、図1.15、図1.16、図1.17、）

●魚類の受容体を用いた環境水中医薬品の薬理活性の解析・・・ヒト受容体ではなく魚類の受容体を用いた医薬品の評価が可能となった。（サブテーマ2）（図2.2、図2.3、図2.5）

●同時分析による68成分の測定法確立・・・河川水・下水処理水等の一斉分析が可能となった。（サブテーマ2）（図2.6a、図2.6b、図2.8、図2.9、図2.10、表2.1）

●環境医薬品の標的となる魚類の受容体のクローニング・・・医薬品の標的となる受容体の遺伝子を魚類で明らかにし、サブテーマ2の薬理活性評価のための培養系確立に貢献した。（サブテーマ3）（図3.2）

●医薬品に応答する分子の探索と分子応答の解明・・・サブテーマ1と連携し、医薬品曝露個体から応答する遺伝子の解析を進め、実態調査と作用機序解明のために活用可能な遺伝子を明にした。（サブテーマ3）（図3.6a、図3.6b、図3.7、図3.8、表3.1、表3.2、表3.3、表3.4、表3.5、表3.6）

●医薬品濃度に対応した分子応答・個体応答（行動・繁殖）の理解・・・曝露実験による応答遺伝子の検証とフィールド調査への発展を目指したが、新型コロナウイルス感染拡大による影響を受け、基礎データの収集に留まった。（サブテーマ1、2、3）^{注)}

全体目標2)：環境医薬品のAdverse Outcome Pathway (AOP)を構築し、水域生態系への影響評価の基盤を整える。

達成度○：目標どおりの成果をあげた（コロナ禍における研究であることを含め評価）。

重要な達成点

●AOP構築に向けた各視点から得られた科学的情報の融合・・・環境中の医薬品実態、その分子応答、環境医薬品による影響の表現系が明らかとなり、今後 AOP 構築に向けて埋めるべきピースが明確となった。（サブテーマ1、2、3）（表1.2、図2.4、図2.8、表3.4、表3.6）

●フィールド調査による環境医薬品の魚類への影響評価・・・応答遺伝子を分子マーカーとした魚類フィールド調査により、実環境での生物影響の可能性と水域生態系への影響解析を目指したが、新型コロナウイルス感染拡大による影響を受け予備調査に留まった。（サブテーマ1、2、3）^{注)}

●医薬品の影響とその管理に向けた科学的情報の収集・・・評価手法の開発、影響評価を理解するための医薬品作用機序のための分子情報、魚類の行動と繁殖への医薬品の影響が、本研究によって明らかになり、影響と管理に必要とされる科学情報は集まりつつある。しかし、その影響解明と管理に向けた提案を行うには、あまりにも環境医薬品の知見が少なく、3年間の研究ではそこまで到達してい

ない。ただし、実験を進める中で、多くの新たな課題に直面した。本研究において、新しい課題を抽出できたことの意義は大きく、環境医薬品研究の発展に向けて大きな一歩となった。(サブテーマ1、2、3)

注) 新型コロナウイルス感染拡大による影響を受け、フィールド調査のための移動、実験魚の搬入、学生等の登学制限のため、予定どおりの計画が実施できなかった。特に県境を跨いでのフィールド調査は、初年度の予備調査以外、いっさい許可が降りず実施できなかった。

そのほかの評価に値する点

達成度◎：目標を上回る成果をあげた。

重要な達成点

●環境水中の医薬品の実態と魚類次世代生産への影響に関する科学的情報の発信・・・市民向けシンポジウム、学会による特別セッションの実施など、最新の情報の発信を積極的に行った。(サブテーマ1、2、3)

●本研究では、効率的に研究を進めるために、参画者が頻繁に情報共有をし、また、研究を進めるにあたり意見交換を繰り返し行った(オンライン、対面、メール会議などを含め2ヶ月に1度程度)。それによって、各サブテーマが必要とする知見の収集や分析を連携して行うことができ、効率よく成果を上げることができた。サブテーマ3で明らかにした魚類の医薬品標的受容体に関する成果は、サブテーマ2の魚類受容体を用いた評価系の確立に活用された。また、サブテーマ1で実施した曝露試験の飼育水中医薬品濃度を、サブテーマ2で実測し、環境水中における医薬品活性と比較することができた。さらに、サブテーマ1で実施した曝露試験の個体を活用し、サブテーマ3では医薬品応答遺伝子を探査することができた。その結果、サブテーマ1で確認された行動異常を引き起こす可能性のある遺伝子候補が見出された。本研究の成果は、このような研究体制と各課題に対する認識の共有によってもたらされたことは間違いない。

6. 研究成果の発表状況

6-1. 査読付き論文

<件数>

6 件

<主な査読付き論文>

- 1) H. Zhang, M.O. Ihara, N. Nakada, H. Tanaka, and M. Ihara: Environmental Science & Technology, 54, 3, 1720-1729 (2020) (IF : 9.0)
Biological-activity-based prioritization of pharmaceuticals in wastewater for environmental monitoring: G protein-coupled receptor inhibitors.
- 2) M. Ihara, S. Hanamoto, M.O. Ihara, H. Zhang, and H. Tanaka: Journal of Applied Toxicology, 40 (7), 908-917 (2020) (IF : 2.9)
Wastewater-derived antagonistic activities of GPCR-acting pharmaceuticals in river water.
- 3) A.C. Johnson, Z. Jin, N. Nakada, and J.P. Sumpter: Science, 367, 6476, 384-387 (2020) (IF : 41)

- Learning from the past and considering the future of chemicals in the environment.
- 4) H. Zhang, Y. Lin, Z. Men, M. Ihara, W. Li, K. He: Chinese Chemical Letters, 31 (10), 2859-2863 (2020)
Evaluation of pharmaceutical activities of G-protein coupled receptor targeted pharmaceuticals in Chinese wastewater effluent
- 5) M. Ihara, H. Zhang, M.O. Ihara, D. Kato, H. Tanaka: Science of the Total Environment, 770, 144665 (2021) (IF : 7.9)
Proposal for fluorescence-based in vitro assay using human and zebrafish monoamine transporters to detect biological activities of antidepressants in wastewater
- 6) K. Miyaoku, Y. Ogino, A. Lange, A. Ono, T. Kobayashi, M. Ihara, H. Tanaka, K. Toyota, H. Akashi, G. Yamagishi, T. Sato, C.R. Tyler, T. Iguchi, S. Miyagawa: Journal of Applied Toxicology, 41, 1390-1399 (2021) (IF : 3.4)
Characterization of G protein-coupled estrogen receptors in Japanese medaka, *Oryzias latipes*.

6-2. 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6-3. その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0 件
その他誌上発表（査読なし）	17 件
口頭発表（学会等）	20 件
「国民との科学・技術対話」の実施	11 件
マスコミ等への公表・報道等	3 件
本研究に関連する受賞	0 件

7. 国際共同研究等の状況

日本の環境省及び英国Department for Environment Food and Rural Affairs (DEFRA)による、内分泌かく乱化学物質に関する研究の日英共同研究のworkshop (UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals)に征矢野、長江、井原、中田、宮川が参加（第21回 2019年11月12-13日大津、第22回 2020年10月26-27日オンライン、第23回 2021年11月29-30日オンライン）し、内分泌かく乱化学物質および医薬品の生物影響についての研究発表、英国側研究者と共同研究打ち合わせ、情報交換を行った。カウンターパートはAndrew Johnson (Professor, Center for Ecology and Hydrology)、Anke Lange、Charles Tyler (University of Exeter)、Ioanna Katsiadaki (Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science)、Chris Green (DEFRA)。

Andrew Johnson 教授とは、イギリスにおける下水処理場や河川での採水で長年共同研究を実施している。科研費等の自己資金を投入しイギリスに赴いて下水処理場で採水し、下水中のGPCR阻害薬と抗うつ薬の薬理活性を*in vitro*アッセイで測定する計画であったが、コロナ感染拡大を受けて、現在

調査研究を延期している。コロナ感染拡大が収まり次第、再開の予定である

Charles Tyler教授とは、ゼブラフィッシュで医薬品等に対する応答の解析を行っており、宮川が中心となりメール等で日常的に情報交換などを行っている。Charles Tyler教授との共同研究の成果は、これまでもOECDの化学物質の安全性試験・評価手法の確立のための基礎データとして活用されている。

8. 研究者略歴

研究代表者

征矢野 清

北海道大学大学院水産学研究科修了、博士（水産学）、現在、長崎大学海洋未来イノベーション機構教授/機構長

研究分担者

1) 長江 真樹

北海道大学大学院水産学研究科修了、博士（水産学）、現在、長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科教授

2) 村田 良介

琉球大学大学院理工学研究科修了、博士（理学）、現在、長崎大学海洋未来イノベーション機構助教

3) 蒔平 裕次

北海道大学大学院水産科学院修了、博士（水産科学）、現在、長崎大学海洋未来イノベーション機構特任研究員

4) 井原 賢

総合研究大学院大学生命科学研究科修了、博士（理学）、現在、高知大学農林海洋科学部准教授（申請時、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特定助教、2021年10月より高知大学へ転出）

5) 中田 典秀

東京農工大学大学院連合農学研究科修了、博士（農学）、現在、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講師

6) Zhang Han

京都大学大学院工学研究科修了、博士（工学）、現在、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特定研究員（R1年度からR2年6月まで）

7) 宮川 信一

総合研究大学院大学生命科学研究科修了、博士（理学）、現在、東京理科大学先進工学部生命システム工学科准教授

8) 宮奥 香理

大阪大学大学院理学研究科修了、博士（理学）、現在、東京理科大学先進工学部生命システム工学科博士研究員

II. 成果の詳細

II-1 魚類の行動・繁殖に及ぼす環境医薬品の影響解析（サブテーマ1）

長崎大学

海洋未来イノベーション機構環東シナ海環境資源研究センター 征矢野 清

大学院水産・環境科学総合研究科 長江 真樹

海洋未来イノベーション機構環東シナ海環境資源研究センター 村田 良介

海洋未来イノベーション機構環東シナ海環境資源研究センター 薙平 裕次

【要旨】

サブテーマ1では、日本における使用量が多く、かつ種々の神経伝達物質に対するGPCR（Gタンパク共役型受容体）阻害活性の高い数種の医薬品を選定し（サブテーマ2との連携）、メダカに対する行動影響評価手法の整備を進めるとともに、それら医薬品のメダカ行動影響を解析した。

その結果、抗うつ薬の一種であるミルタザピン（Mir）においてのみ、メダカが表層に局在して遊泳する行動影響（表層遊泳性）が認められた。この抗うつ薬（Mir）は、アユに対しては走流性の変化を誘起させたが、この行動影響の表現型の違いは、メダカとアユの元来の行動生態（遊泳性）の違いに依るものであり、どちらもMirが同様の薬効により作用した行動影響と捉えられた。この結果を受けて、メダカにおける行動影響解析では、中枢神経シナプスを主標的とする7種の抗うつ薬および抗精神病薬を更に選定・試験し、その全てにおいて同様の行動影響（表層遊泳性）を及ぼすことを明らかにした。一方、中枢神経系を主標的としない、抗アレルギー薬など他の7種の医薬品では、このような行動影響は全く認められなかった。これら結果に、サブテーマ2での研究結果を照らし合わせた結果、これらの抗うつ薬および抗精神病薬に共通するセロトニントランスポーター（SERT）阻害活性がメダカの行動影響を誘起させたものと推察された。

加えて、上記8種抗うつ薬および抗精神病薬のうちの4種医薬品について、メダカ繁殖毒性試験を実施し、産卵数・受精率、卵形成、産卵行動などの繁殖機能項目を有意に低下させる結果を得た。

これら医薬品は、ほぼ同じ濃度でメダカの行動影響と繁殖影響を引き起こしたことから、これら医薬品に曝露された際に複数の生理機能が同時に変容することが示唆された。サブテーマ2との共同により、下水処理放流水中に含まれる複数の医薬品の濃度とそのSERT阻害活性の総和は、メダカの行動および繁殖影響を誘導させた各医薬品のSERT阻害活性と近似していることから、現在の環境中においても魚類などの水棲生物に対して環境医薬品が悪影響を及ぼしている可能性が推察された。

1. 研究開発目的

近年、膨大な種類と量の医薬品が使用されており、それらが環境水中で容易に検出される現状となっている。医薬品はその性質上、極めて生理活性が高いことから、野生生物への影響が懸念されている。特に抗うつ薬および抗精神病薬は、中枢神経シナプス間の種々の神経伝達物質レベルを調節することによりヒト精神疾患を改善する治療薬であるが、同様の神経構造を有する野生生物に対しても作用し、生理学的影響を引き起こすことが強く示唆される。これまで、抗うつ薬および抗精神病薬の魚類への影響を調べた先行研究は散見されるが¹⁻³⁾、同一の魚種・評価手法を用いて統一的に、多種類のこれら医薬品の影響を調査した例は殆どない。サブテーマ1では抗うつ薬および抗精神病薬に焦点を絞りつつ、中枢神経を主標的としない医薬品とも対比しながら、それらを代表的な試験研究対象魚であるミナミメダカ（*Oryzias latipes*）に曝露した際の行動および繁殖機能への影響を定量的に調査することを目的とした。また、内水面漁業・遊魚の対象種であり、河川生態系における重要魚種であるアユ（*Plecoglossus altivelis*）に対する影響も調査し、異なる魚種間での環境医薬品影響の共通性・相違性を明らかにす

ることも目的とした。また、それらの過程で必要となる行動・繁殖機能への影響評価手法の整備も目的の一つとした。加えて最終年度（令和3年度）には、環境医薬品と環境エストロジェンの相互作用による影響を調査するための端緒として、環境エストロジェンのバイオマーカー（ビテロジェニン）の探索を行うとともに、実際の天然河川での環境医薬品の魚類（アユ）影響実態の把握を目的としたフィールド調査の実施も視野に入れた。

2. 研究目標

- 1) メダカ及びアユを試験生物として用い、その行動評価法を確立し、繁殖行動を含めた魚類の異常行動判定のための評価基準を整備する。
- 2) サブテーマ2により得られた水域の環境医薬品存在実態のデータ及び日本における処方量の観点から、試験対象とする抗うつ薬及びGPCR阻害薬を選定し、メダカ及びアユにおける曝露濃度設定を行うとともに、行動影響及び繁殖影響を明らかにする。

3. 研究開発内容

a. 環境医薬品のメダカ行動影響評価手法の整備および影響解析

医薬品曝露：孵化後6ヶ月程度のミナミメダカ成魚を使用した。飼育条件は水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明期：暗期=16h：8hに設定した。20cmガラス水槽を使用し、1水槽に雌雄それぞれ3個体を収容し、曝露水量は4.5Lとした。主たる曝露対象医薬品として、抗うつ薬5種（アミトリプチリン(amitriptyline)塩酸塩（以下Ami）、デュロキセチン(duloxetine)塩酸塩（以下Dul）、フルオキセチン(fluoxetine)塩酸塩（以下Flu）、ミルタザピン (mirtazapine、以下Mir)、ベンラファキシン(venlafaxine)塩酸塩（以下Ven））および抗精神病薬3種（クロルプロマジン(chlorpromazine)塩酸塩（以下Chp）、オランザピン (olanzapine、以下Ola)、クエチアピン(quetiapine)フマル酸塩（以下Que））を用いた。比較対象として、中枢神経系を主標的としない医薬品7種（抗アレルギー薬、消化機能改善薬など）も用いた。これら15種の医薬品をそれぞれ種々の濃度で4日間半止水曝露した（毎日全換水）。なお助剤としてDMSO（0.01%）を使用した。給餌は1日3回、以下に示す一般遊泳行動の動画撮影に支障を来さないタイミングで実施した。

動画撮影・行動解析：上記曝露期間中、毎日朝夕2回、30秒間の個体行動を動画撮影した（1曝露水槽につき合計8つの動画を取得）。水槽前面には予め水深の上層1/3と中下層2/3を区別するラインマーキングを施し、そのラインと水平にビデオを設置し水槽前面より動画撮影した（図1.1）。

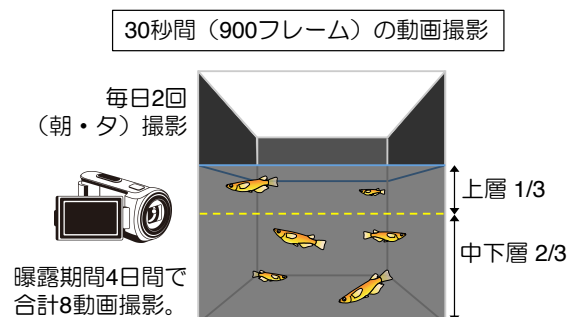


図1.1 メダカ行動動画撮影概要

取得した動画を動画解析ソフト（UMATracker14）により解析し、30秒間（900フレーム）の各個体の遊泳深度エリア（上層1/3 or 中下層2/3）を決定した。同水槽中6個体の上層および中下層遊泳フレーム数を統計検定し（Mann-Whitney U test）、遊泳深度エリアの偏りの有無を検出した。

b. 環境医薬品のメダカ繁殖機能影響評価手法の整備および影響解析

本曝露試験は概ね、OECD TG229（魚類短期繁殖試験）に従って実施した。孵化後6ヶ月程度のミナミメダカ成魚を使用した。飼育条件は水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明期：暗期=16h：8hに設定した。4L流水式ガラス水槽を使用し、1水槽に雌雄それぞれ3個体を収容し、これを1曝露濃度区につき3連設置した。曝露対象医薬品として、表層遊泳を誘起する抗うつ薬・抗精神病薬として Chp（1, 10, 100 $\mu\text{g/L}$ ）、Ami（1, 10, 100 $\mu\text{g/L}$ ）、Mir（10, 100, 1000 $\mu\text{g/L}$ ）および Dul（16, 40, 100 $\mu\text{g/L}$ ）を用いたほか、表層遊泳を誘起しない医薬品としてセチリジン塩酸塩（Cet：100, 1000 $\mu\text{g/L}$ 、抗アレルギー薬）も選定し、21日間の繁殖毒性試験を行った（流水式）。曝露期間中、毎日産卵数および受精卵数をカウントした。曝露最終週の照明点灯開始から1時

間（産卵が集中する時刻）の動画を撮影し、1時間当たりの産卵行動の回数および1回の産卵行動に要した時間を調査した。曝露後、雌の肝臓ビテロジェニン（VTG）濃度を ELISA法により測定するとともに、卵巣の組織学的解析により卵形成状況および形態異常の有無を確認した。また、曝露水中の被験医薬品の実濃度を把握するために、毎週1回各濃度区1水槽から曝露水を採取し、液体クロマトグラフ（LC）-タンデム質量分析計（MS/MS）による分析定量を行った（サブテーマ2と共同）。

c. 環境医薬品のアユ行動・繁殖機能影響評価手法の整備および影響解析

c-1. 養殖アユのサンプリングと天然アユの予備調査

アユにおける遺伝子モデル構築のため、生殖腺の発達段階に伴う組織のサンプリングを行った。供試魚にはアユ等中間育成施設（福岡県八女市）で飼育された養殖魚を用い、6月～9月の間毎月サンプリングを行った。脳、下垂体、肝臓の一部は、Ⅱ-3（サブテーマ3）にて RNAシーケンス解析に供した。また、Ⅱ-3（サブテーマ3）にて構築したアユの遺伝子モデルを基に、他魚種において環境エストロジェン評価の分子マーカーとして使用されているビテロジェニン遺伝子を成熟雌アユの肝臓からクローニングした。さらに、天然アユが捕獲可能かを調べるため、8月に大津市の河川にて電気ショッカーと投網による予備調査を行った。

c-2. アユ医薬品曝露試験

メダカで行動への影響が見られたMirを用いてアユにおける行動と産卵への影響を評価するための予備試験を行った。1,000 $\mu\text{g/L}$ のMir 曝露群と助剤として使用した DMSO のみを加えた対照群（終濃度0.01%）の2群を設定した。205Lガラス水槽に直径1～3cmの礫を約5cm敷き、水深15cmとなるように曝露水を加え、2100L/min の水中ポンプにて水流を発生させた（図1.2）。

生殖腺の発達したアユを雌雄3尾ずつ入れ、室温20℃に設定し、無給餌で4日間飼育した。飼育期間中

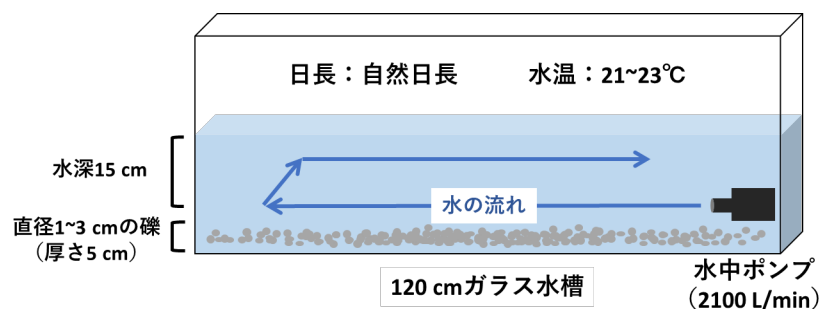


図1.2 アユ医薬品行動影響試験に用いた水槽条件

は24時間ごとに1回同濃度に調製した水を50%換水した。通常時の行動を観察するため、午前と午後15分間ずつ正面と側面からビデオカメラにて同時に撮影を行った。撮影した両動画は1分間にトリミングし、UMATracker を用いて各個体の遊泳行動を追跡し、二次元座標を取得した後、三次元座標への変換を行った。また、試験中の飼育水を採取し、Ⅱ-2（サブテーマ2）の方法でMir濃度を測定した。試験期間中は産卵の有無を確認し、4日目午後に動画撮影を行った後に全個体サンプリングした。卵巣は排卵していた場合、卵巣重量と腹腔内卵量を計測した。脳と生殖腺の一部はⅡ-3（サブテーマ3）にてRNAシーケンス解析に供した。

Mir の曝露試験中に体色の変化が見られたため、成熟雄の体色における環境医薬品の影響を調べた。100 $\mu\text{g/L}$ の Mir, Chp, Ami 曝露群と DMSO のみを加えた対照群（終濃度0.01%）の4群に各雄3尾を分け、上記と同様の条件で5時間曝露した。試験後、背部の鱗を採取し、ホルマリンで固定した。実体顕微鏡にて鱗に付着した黒色素胞の平均直径を比較することで、医薬品が体色へ及ぼす影響の評価を試みた。

医薬品によっては環境水ではなく餌生物を経由した曝露も考えられることから、餌に医薬品を添加した経口曝露試験の検討を行った。99.5%エタノールに溶解した Chp を飼料に噴霧し、一晚乾燥させた。40、400、4000ng/gBW/day（1.3、13.3、133.3 $\mu\text{g/g}$ intake）となるように経口投与した。対照群には、溶媒である 99.5%エタノールのみを飼料に噴霧し、乾燥させたものを経口投与した。曝露期間中は 100L

水槽に脱塩素水道水をかけ流した自然日長・自然水温条件で飼育し、給餌は1日2回、3%/gBW/dayとなるように行った。曝露開始1、3、7日後にサンプリングを行い、Ⅱ-2(サブテーマ2)の方法で血液中にChpが検出されるかどうか調べた。

4. 結果及び考察

a. 環境医薬品のメダカ行動影響評価手法の整備および影響解析

環境医薬品の行動影響調査手法の整備に先立ち、まずは抗うつ薬であるMirのメダカへの予備的曝露を実施した。その際、一定の曝露濃度以上で多くの個体が水面直下に局在して遊泳する様子(表層遊泳性)が観察された(図1.3)。そのため本研究では、環境医薬品のメダカ行動影響の指標の一つとして「表層遊泳性」を選択し、行動影響評価手法の整備においては、メダカの遊泳深度局在を動画から正確かつ簡便に定量化できる手法の整備に重点を置いた。その結果、3の「研究開発内容」で図1.1も含めて説明した動画撮影方法を確立し、以下の15種医薬品のメダカ行動影響評価を実施した。

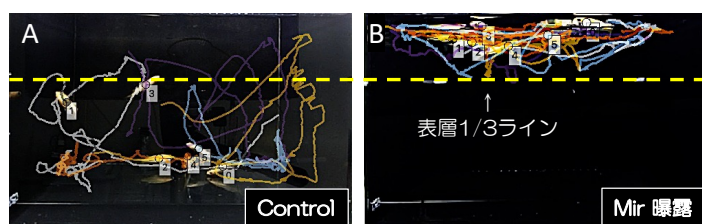


図1.3 曝露個体の30秒間遊泳軌跡。A:Control, B:Mir曝露

初めに、サブテーマ2との連携により、日本での使用量が多く、異なるGPCRに作動する5種医薬品を選定・曝露し、上記で整備した手法を用いてメダカへの行動影響(表層遊泳性誘導の有無)を調査した。その結果、抗うつ薬であるMirの曝露においてのみメダカの表層遊泳性が強く誘起されたが、抗アレルギー薬や消化管機能改善薬などの他4種医薬品では表層遊泳性は全く誘起されなかった。この結果から、抗うつ薬や抗精神病薬など、中枢神経シナプスでのモノアミン伝達レベルを調節する作用を有する医薬品がメダカ行動影響(表層遊泳性)を誘起する可能性が推察された。そこで抗うつ薬および抗精神病薬を中心に被験医薬品の例数を増やし、最終的に15種の医薬品についてメダカへの行動影響(表層遊泳性誘導の有無)および表層遊泳誘導最小濃度(LOEC値)を調査した。

一例として抗精神病薬であるChp曝露試験での行動解析経過を挙げる。上記した通り、種々の濃度での4日間の曝露試験期間中、毎日朝夕2回の動画撮影(30秒間、900フレーム)を行い、専用ソフトウェアを用いて水槽内6個体の遊泳滞在深度(上層1/3 or 中下層2/3)を検出し、統計検定により表層遊泳性を判定した。その結果の一部(Chp曝露4日目夕方)を図1.4に示す。図1.4では、Chp 35.6 μ g/L以上の曝露濃度で表層遊泳性が認められた。このような解析を、4日間8動画に対して適用し、Chpのメダカ表層遊泳誘導LOEC値を検討し、LOEC=35.6 μ g/Lと判断した(表1.1)。

上述のような解析を全15種の医薬品に対して適用・解析し、各医薬品のメダカ表層遊泳性誘導の有無およびそのLOEC値を検討し、表1.2の結果を得た。

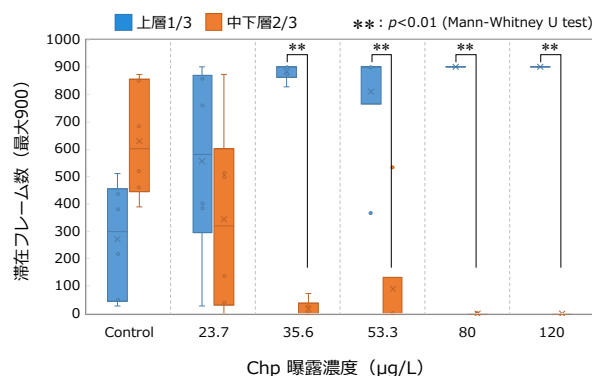


図1.4 Chp曝露4日目・夕方の各曝露区の上層-中下層滞在フレーム数比較

全15種医薬品のうち、抗うつ薬および抗精神病薬全8種がメダカの表層遊泳性を誘導し、抗アレルギー薬など他の薬効を示す7種の医薬品にはその誘導性は認められなかった。抗うつ薬および抗精神病薬は元来、脳への移行性（血液-脳関門透過性）が高い。これらがメダカにおいても容易に脳に移行し、中枢神経シナプス間のモノアミン伝達レベルを改変することでメダカの行動変容（表層遊泳性）を誘起したものと推察された。

サブテーマ2のサポートにより、これら8種の抗うつ薬および抗精神病薬に共通する薬効を調査したところ、神経シナプスにおけるセロトニントランスポーター（SERT）阻害活性が見出された（表1.3）（Queには SERT阻害活性は認められないが、その代謝物であるノルケチアピンに比較的強い SERT阻害活性が認められる）。これら医薬品の SERT阻害により神経シナプス間のセロトニン濃度が上昇し、セロトニン伝達レベルの活性化がメダカ表層遊泳性の一因である可能性が示唆された。

また、これら医薬品の脂溶性度合い（オクタノール/水分配係数（logKow or logP）、生物濃縮性の指標）も考慮してメダカ表層遊泳誘導LOEC値を比較すると、それぞれの医薬品の LOEC値は、SERT阻害活性の強さ（IC50値）と LogKow値の兼ね合いでほぼ表現できることが示唆された。今後、膨大に存在する医薬品のメダカ行動影響（表層遊泳性の誘導）については、医薬品のこれら性質からある程度予測可能と思われる。

本研究目標では更に、これら医薬品の曝露により誘起されたメダカ行動影響の回復試験も実施した。即ち、Mir、Ami および Chp について、表層遊泳性を誘起する濃度で上記と同様4日間曝露した後に、それら医薬品を含まない清浄水（通常水）で飼育を継続した際の回復およびそれに必要な時間について、朝夕2回の動画撮影および滞在深度局在解析により調査した。

その結果、図1.5に示すように、Mir およびAmi 曝露個体では、通常水移行後約1日でコントロー

表1.1 Chp の表層遊泳誘導性の検定結果

Chp 曝露濃度 (μg/L)	1日目		2日目		3日目		4日目	
	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕
Control	-	-	-	-	-	-	-	-
23.7	-	-	-	-	-	**	**	-
35.6	-	-	**	**	**	**	**	**
53.3	-	**	**	-	**	**	**	**
80	**	**	**	**	**	**	**	**
120	-	**	**	**	**	**	**	**

表1.2 全15種医薬品のメダカ行動影響とLOEC値

医薬品名	略語	主な薬効	表層遊泳性の誘起	LOEC値 (μg/L)
ミルタザピン	Mir	抗うつ薬	○	356
アミトリプチリン塩酸塩	Ami		○	53
ベンラファキシン塩酸塩	Ven		○	630
フルオキサセチン塩酸塩	Flu		○	37
デュロキサセチン塩酸塩	Dul		○	37
クロルプロマジン塩酸塩	Chp	抗精神病薬	○	36
オランザピン	Ola		○	390
クエチアピンフマル酸塩	Que		○	593
フェキソフェナジン塩酸塩	Fex	抗アレルギー薬	×	-
ベタスチンベシル酸塩	Bep		×	-
セチリジン塩酸塩	Cet		×	-
エピナスチン塩酸塩	Epi		×	-
ドンペリドン	Dom	消化管機能改善・治療薬	×	-
スルピリド	Sul	心臓疾患治療薬	×	-
ビソプロロールフマル酸塩	Bis		×	-

表1.3 メダカ行動影響医薬品のSERT阻害活性とlogKow

医薬品名	メダカSERT IC50値	logKow または logP	表層遊泳LOEC (μg/L)
クロルプロマジン 塩酸塩	1.2E-08	5.19	36
アミトリプチリン塩酸塩	3.0E-09	4.81	53
ミルタザピン	2.7E-06	2.90	356
クエチアピンヘミフマル酸塩	N.D.	3.17	593
ノルケチアピン	8.5E-08	-	未測定
オランザピン	7.5E-07	3.00	390
フルオキサセチン塩酸塩	1.9E-09	4.17	37
ベンラファキシン塩酸塩	3.7E-09	0.43	630
デュロキサセチン塩酸塩	1.6E-09	4.72	37

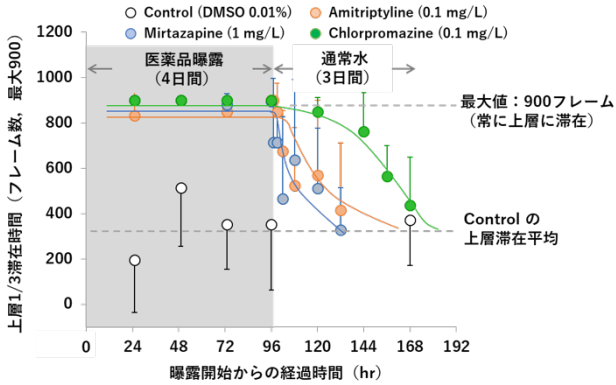


図1.5 行動影響からの回復に要する時間

ルと同様の遊泳深度（上層滞在時間）に回復したのに対し、Chp 曝露個体では、その回復に約3日間を要した。前述したように、Ami と Chp のSERT阻害活性と logKow 値の関係はほぼ同等であり、表層遊泳 LOEC値もほぼ同濃度であるにも関わらず、Ami と Chp の行動影響からの回復に要する時間には大きな差（約1日と約3日）が認められた。これらの結果から、Ami に比べて Chp は、メダカでの代謝分解および排出により多くの時間を要する可能性が示唆された。即ち、医薬品の持つ物性（SERT阻害活性、logKow）に加えて、対象となる生物種での当該医薬品の代謝・排出能も行動を始めとする生理機能に強く影響することが示された。

これらメダカの行動影響を誘起する医薬品の LOEC値は、表1.3に示すように数十～数百 $\mu\text{g/L}$ である。下水処理場放流水中のそれら医薬品濃度（ ng/L オーダー）と比較しても相当に高い濃度であり、実際の環境中で検出される単一の医薬品濃度との間には大きな乖離が認められる。しかしながら環境中には、SERT阻害活性を有する極めて多くの医薬品が同時に存在しており、それらが生物に取り込まれた際に少なくとも相加的な効果を示すと想定した場合には、大きな乖離ではなく、現時点の環境医薬品がメダカの行動影響を及ぼす可能性がある。サブテーマ2では、下水処理場放流水に含まれる各医薬品の濃度およびSERT阻害活性を明らかにしており、それらに基づきサブテーマ1で表層遊泳が認められた医薬品の等量値を算出すると、表層遊泳LOEC値と近似することが明らかとなった。これら等量値に関する詳細については、本報告書のII-2（サブテーマ2）を参照されたい。

b. 環境医薬品のメダカ繁殖機能影響評価手法の整備および影響解析

上記研究目標「a. メダカ行動影響評価」において、メダカの表層遊泳性を誘起した医薬品4種（Chp、Ami、Mir および Dul、抗うつ薬・抗精神病薬）および表層遊泳を誘起しなかった医薬品1種（Cet、抗アレルギー薬）について、21日間の流水曝露による繁殖毒性試験を実施した。

図1.6に示すように、Chp 曝露開始3日後には最高曝露濃度区の100 $\mu\text{g/L}$ （Chp100）において産卵数が著減し、それ以降も極めて低値で推移し（図1.6A）、同濃度区での総産卵数はコントロール区の約1/10にまで低減した（図1.6B）。また同濃度区では、産卵数に加えて受精率の低下も認められた（図1.6C）。

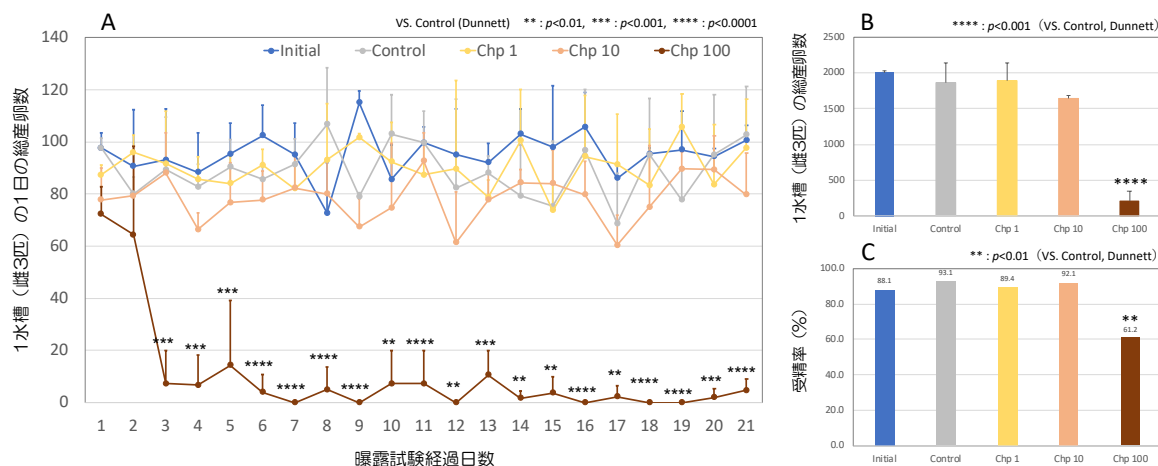


図1.6 Chp 繁殖毒性試験における産卵数の経時変化(A)、総産卵数 (B)および受精率 (C)

産卵数の大幅な低下が認められたため、その原因を探る一助として曝露終了個体の卵巢組織切片解析を行った。Control区の卵巢では、メダカが毎日産卵する魚種の特徴である非同期発達型（全ての発達段階の卵母細胞が卵巢内に存在する）の卵巢像が認められたが、Chp100 曝露区では、卵黄が蓄積された発達した卵母細胞が殆ど存在せず、かつ、卵母細胞の退行を意味する卵黄再吸収像も認められた（図1.7）。この組織学的解析結果は、Chp 曝露による産卵数の激減が多くの卵成長（卵黄蓄積）の停止に依ることが示された。

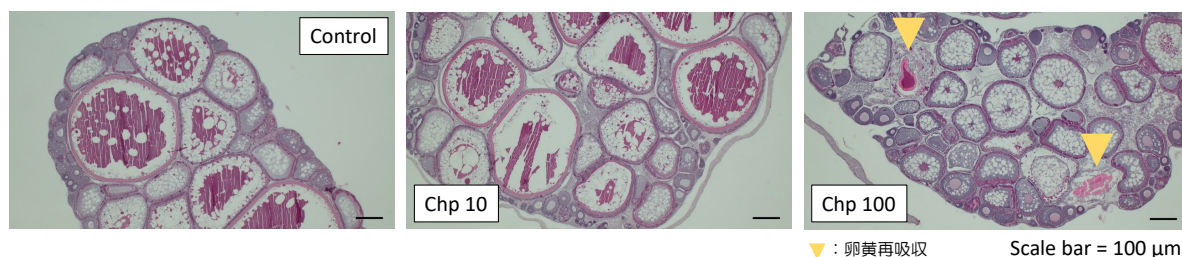


図1.7 Chp 繁殖毒性試験における卵巢組織切片像

加えて、同曝露個体雌の肝臓VTG濃度においても、Chp100 曝露区で有意に低下した（図1.8）。これらの結果は、Chp100 曝露区では生殖機能を統御する視床下部-下垂体-卵巢軸に関わる内分泌系の機能低下・異常が発生し、卵巢でのエストロゲン合成量の低下に由来する肝臓での VTG 合成量低下に繋がった可能性が示唆される。今後、これら生殖機能に密接に関与する内分泌因子の発現や濃度への影響についても評価する必要性が感じられた。

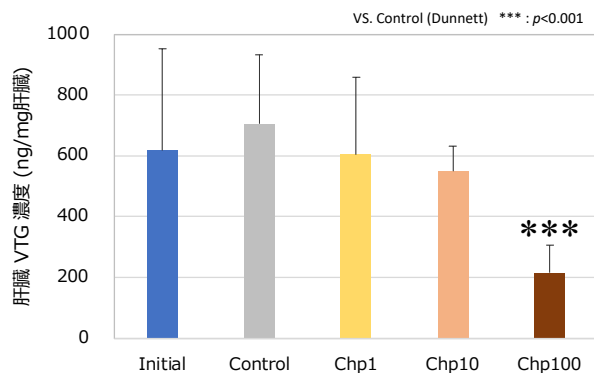


図1.8 Chp 繁殖毒性試験における肝臓VTG濃度

また、曝露最終週の照明点灯開始から1時間（産卵が集中する時刻）の動画を撮影し、1時間当たりの産卵行動の回数および1回の産卵行動に要した時間を調査した。この調査における産卵行動とは、3秒間以上雌雄が体側を密着した場合と定義した。その結果、図1.9に示すように、Initial 個体においては、3ペアの1時間当たりの産卵行動回数は17回、1回当たりの平均産卵行動時間は約8.5秒であったのに対し、Chp 曝露濃度の増加に伴って、特に Chp10 および 100 曝露区では産卵行動回数の減少および1回当たりの平均産卵行動時間の増加（約20秒）の傾向が認められた。上述したように、特に Chp100 曝露区では産卵数が著しく低下したが、産卵数が低下しても、産卵行動自体が抑制されている訳ではないことが示唆される。しかし、産卵行動内容（産卵試行回数の低下および1回の産卵行動時間の増大）には変化の傾向が見られた。このような産卵行動の変容傾向は、産卵数が低下しなかった Chp10 においても認められたことから、雌の卵形成のみならず、雄の精子形成や雄の産卵行動に対しても Chp が何らかの影響を及ぼしている可能性が推察される。今後、雌の卵形成のみならず、雄の精子形成およびそれを支配する内分泌因子への Chp の影響についても精査する必要がある。

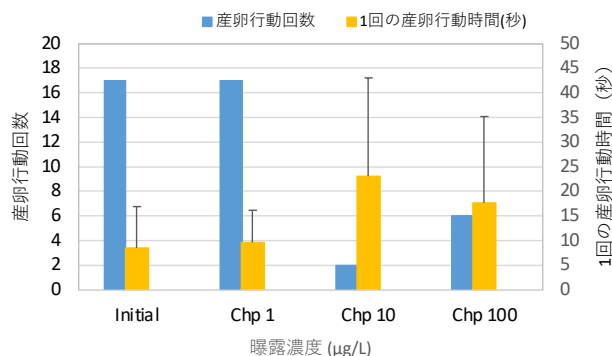


図1.9 Chp 繁殖毒性試験における産卵行動頻度と時間

本繁殖毒性試験では、被験医薬品の曝露水中実濃度を把握するために、毎週1回各濃度区1水槽から曝露水を採取し、サブテーマ2との共同により LC-MS/MS を用いた分析定量を行った。表1.4は、それぞれの曝露区における設定曝露濃度、LC-MS/MS 分析定量による実測濃度および設定曝露濃度に対する実測濃度の割合をそれぞれ示している。何れの曝露週においても、Chp の実測濃度は設定曝露濃度に対して20%程度の低値を示した。Chp の水槽内壁等への吸着性や分解性、懸濁態としての存在形態が高いことを示唆しており、溶存態 Chp 濃度が設定濃度と大きく乖離することを意味している。換言すれば、設定濃度の100 $\mu\text{g/L}$ ではなく、実測濃度で弾き出された約20 $\mu\text{g/L}$ がメダカの産卵数低下を有意に引き起こす濃度であることを示す。前述したメダカ行動影響（表層遊泳性）を誘起する Chp のLOEC値は 36 $\mu\text{g/L}$ と判定されており（表1.3）、この試験における Chp の実測濃度も設定濃度（36 $\mu\text{g/L}$ ）を大きく下回ると想定した場合（行動影響試験での Chp 実濃度分析は未実施）、メダカの行動影響（表層遊泳性）と繁殖影響（産卵数低下）が、ほぼ同濃度の Chp によって引き起こされることが推定される。今後、実施する全ての曝露試験における実濃度分析を行い、生理学的影響と医薬品濃度との相関を正確に把握したうえで、先に述べた SERT阻害活性・環境中実濃度に基づく等量値との比較を厳密に行うことが求められる。

表1.4 LC-MS/MSによる曝露水中 Chp 実濃度分析

	Chlorpromazine Hydrochloride		設定曝露濃度に対する割合 (%)
	設定曝露濃度($\mu\text{g/L}$)	実測濃度($\mu\text{g/L}$)	
1週目	100	20.01	20
	10	1.50	15
	1	0.16	16
2週目	100	28.32	28
	10	2.35	23
	1	0.19	19
3週目	100	12.02	12
	10	0.96	10
	1	0.07	7

ここまで、Chp の繁殖毒性試験については、産卵数、受精率、卵巣組織（卵形成）、産卵行動および曝露水中実濃度分析の各結果を図表を交えて詳細に記載したが、これとほぼ同様の結果が、メダカの表層遊泳を誘起した他の医薬品3種（Ami、Mir および Dul、抗うつ薬・抗精神病薬）の繁殖毒性試験においても得られており、それら医薬品曝露における産卵数・受精率の結果を図1.10～図1.12として示す。一方、表層遊泳を誘起しなかった医薬品1種（Cet、抗アレルギー薬）の繁殖毒性試験では、上述の4種抗うつ薬・抗精神病薬で認められたような繁殖影響（産卵数および受精率の低下）は認められなかった（図1.13）。（Chp 以外の、これら4種医薬品繁殖毒性試験の肝臓VTG濃度、卵巣組織、産卵行動および曝露水中実濃度分析の結果については、資料量膨大のため本報告での提示を割愛した。）

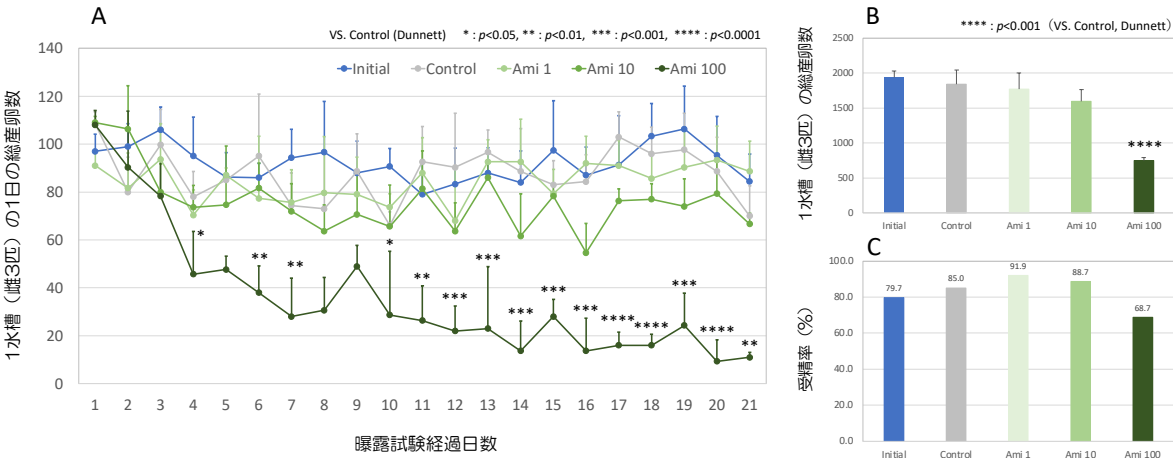


図1.10 Ami 繁殖毒性試験における産卵数の経時変化 (A)、総産卵数 (B)および受精率 (C)

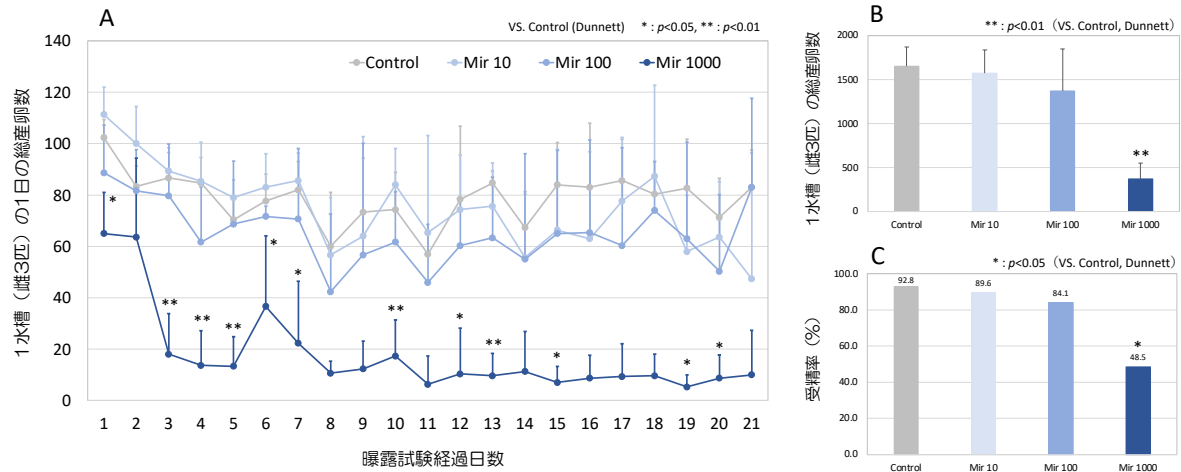


図1.11 Mir 繁殖毒性試験における産卵数の経時変化(A)、総産卵数 (B)および受精率 (C)

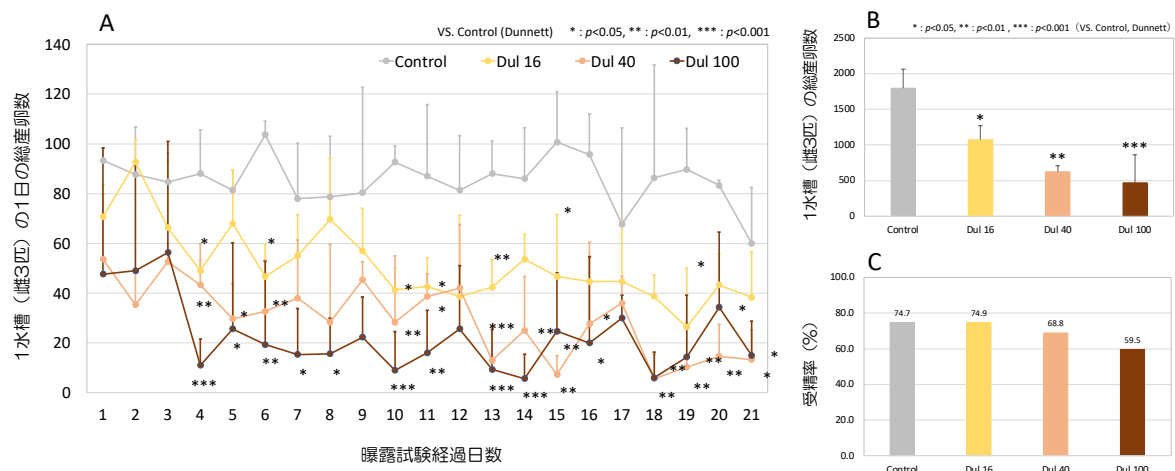


図1.12 Dul 繁殖毒性試験における産卵数の経時変化(A)、総産卵数 (B)および受精率 (C)

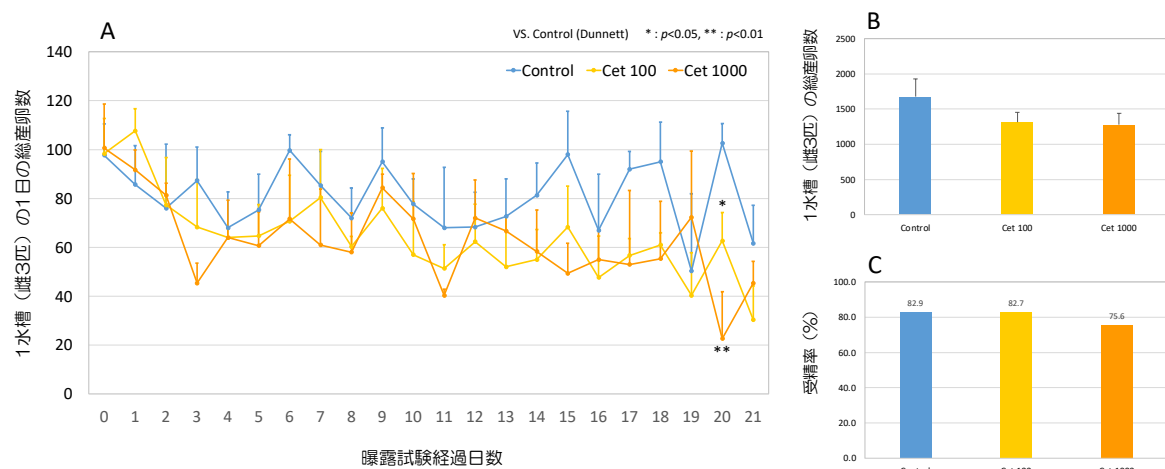


図1.13 Cet 繁殖毒性試験における産卵数の経時変化(A)、総産卵数 (B)および受精率 (C)

前項「a. 環境医薬品のメダカ行動影響評価手法の整備および影響解析」の考察において述べたように、メダカの行動影響を引き起こした医薬品（抗うつ薬・抗精神病薬）の共通点として、SERT阻害活性を挙げたが、本項「b. 環境医薬品のメダカ繁殖機能影響評価手法の整備および影響解析」において繁殖影響を及ぼした4種医薬品（抗うつ薬・抗精神病薬）についても当然、SERT阻害活性において共通点がある。これら医薬品のSERT阻害により中枢神経シナプス間のセロトニン濃度が上昇し、セロトニン伝達量が増大することが予想されるが、セロトニンは視床下部-脳下垂体への作用を介して、脳下垂体からの生殖腺刺激ホルモン分泌に関与することが明らかにされている⁴⁾。Chp の繁殖影響をより深く理解するためには、繁殖機能を統御する視床下部-下垂体-卵巣軸に関わる内分泌系への影響について調査を進める必要があると感じられた。

c. 環境医薬品のアユ行動・繁殖機能影響評価手法の整備および影響解析

c-1. 養殖アユのサンプリングと天然アユの予備調査

アユ等中間育成施設にて養殖アユを 6月～9月にサンプリングし、発達段階の異なる雌雄の組織サンプルを入手した。これらのサンプルはⅡ-3（サブテーマ3）にて後述するアユの遺伝子モデル構築に用いた。また、アユのビテロジェニン遺伝子をクローニングした結果、アユのビテロジェニン遺伝子はサケ科魚類と同様にすべての領域を保持する完全型とフォスビチン領域と3'領域を欠く不完全型の2種類存在することを明らかにし（図1.14）、環境エストロジェンの影響を評価するためのリアルタイム定量PCR測定系を確立した。さらに、8月に実施した予備調査で少なくとも大津市の2河川で天然アユの捕獲が可能であることを確認した。

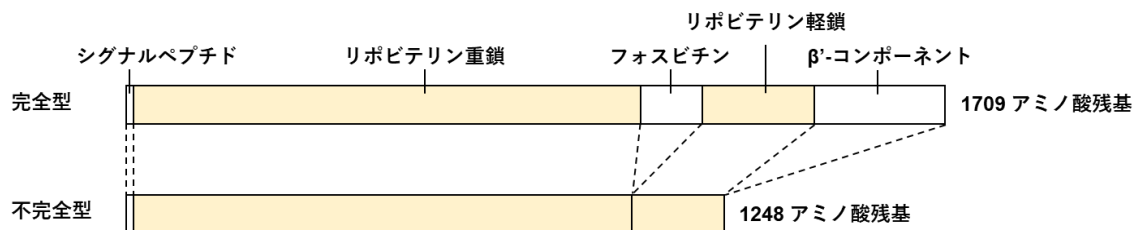


図1.14 アユビテロジェニンの一次構造模式図

c-2. アユ医薬品曝露試験

産卵誘導条件による Mir 曝露試験を初期濃度 1000 $\mu\text{g/L}$ で行ったところ、飼育水中の Mir 濃度は試験開始24時間後に 160 $\mu\text{g/L}$ まで低下した。メダカの Mir曝露試験では24時間後でも濃度の低下はほとんど見られなかったことから、産卵誘導に必要な飼育条件（礫や水流など）によって濃度の減少が引き起こされたと考えられた。しかし、これらの飼育条件はアユの産卵を誘導するのに必須であることから、産卵への影響を評価するためには飼育水中の医薬品濃度の低下をある程度考慮した上で曝露試験を行う必要があると考えられた。

Mir 曝露群と対照群で産卵の有無を確認したところ、両群とも試験期間内に付着した卵が確認された。しかし、曝露群では対照群と比べて付着卵は少なく、試験終了時には死卵が観察された（図1.15）。試験後に解剖した結果、曝露群の雌では対照群と比べて腹腔内に排卵卵が多く見られ（図1.16A, B）、排卵卵量も有意に高かった（ $p<0.05$ 、図1.16C）。曝露試験中の遊泳行動を比較したところ、曝露群では底に横たわる状態（図1.17B）や水流に流される状態（図1.17C）が対照群よりも多く観察された。

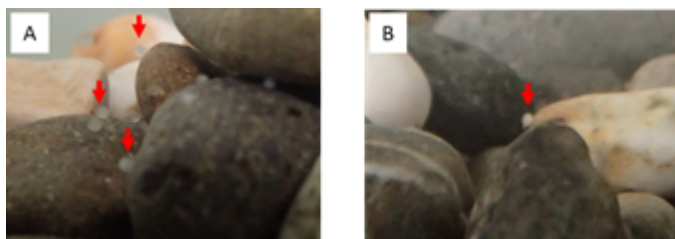


図1.15 試験終了時の対照群(A)とMir曝露群(B)における付着卵の比較

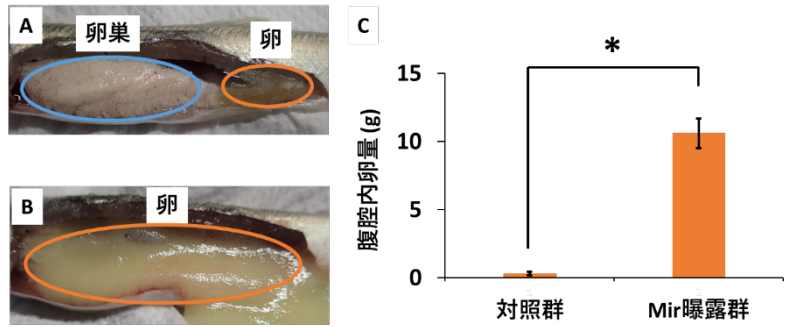


図1.16 試験終了時の対照群 (A) と Mir曝露群 (B) の卵巢の状態と腹腔内卵量(C)



図1.17 曝露試験中の対照群(A)と Mir曝露群 (B, C) における遊泳行動の比較

動画解析ソフトウェアである UMATracker を用いて二方向より撮影した動画から各個体の二次元座標情報を取得し、この情報を基に三次元座標を算出した。産卵前日における水槽内の局在を調べた結果、Mir曝露群では対照群に比べて産卵に適した場所への滞在時間が短い傾向が見られた(図1.18)。これはMirの影響で流速の早い場所へアクセスできないためであると考えられた。以上の結果から、数百 $\mu\text{g/L}$ オーダーの Mirは次世代生産へ影響を及ぼすことが示唆された。

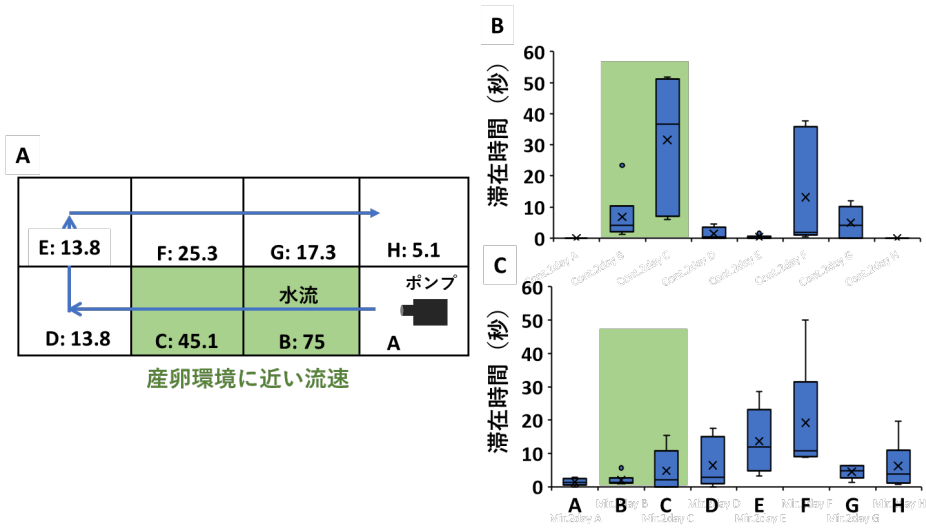


図1.18 水槽上部から見た各エリアの平均流速 (cm/s、A) と産卵前日における対照群(B) と Mir曝露群 (C) における各エリアの滞在時間比較

Mir曝露では成熟雄に顕著な体色変化が認められたことから、追加試験として医薬品曝露後の鱗に付着した黒色素胞の平均直径を測定した結果、対照群と比べて Mir 曝露群では直径の増加が見られたのに対し、Chp 曝露群では直径の減少が見られた(図1.19)。魚類では黒色素胞の直径を制御することで体色を変化させることが知られており、Mir は体色をより黒く、Chp はより白く変化させると考えられた。以上のことから、抗うつ薬や抗精神病薬の中にはアユの体色へ影響を及ぼすものがあり、体色への影響も医薬品によって異なることが示唆された。

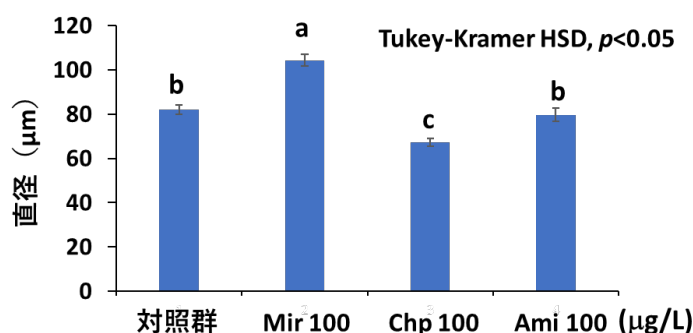


図1.19 医薬品曝露による鱗に付着した黒色素胞の直径比較

Chp 経口曝露試験の結果、4000ng/gBW/dayで曝露した群では曝露開始一日後から血清中に Chp が検出され、血清中の Chp 濃度は 0.8~29.9 μg/Lの範囲であった。しかし、40, 400ng/gBW/day で曝露した群では試験期間を通して定量限界以下であった。これはアユの血清サンプルが数十 μlと微量であったことに起因すると考えられた。以上のことから、経口曝露でも医薬品成分は体内へ取り込まれることが示された。

5. 研究目標の達成状況

目標1：メダカ及びアユを試験生物として用い、その行動評価法を確立し、繁殖行動を含めた魚類の異常行動判定のための評価基準を整備する。

- 魚類の行動様式は、一般遊泳、摂餌、逃避、群遊、縄張りなど種々に区分されるが、そのうち、一般遊泳行動について、メダカを用いた行動影響評価手法ならびにその定量的評価手法を整備・確立した。（図1.1、図1.3）
- OECD TG229「魚類短期繁殖試験」が、環境医薬品のメダカ繁殖機能影響評価を実施するうえでの試験法として適切であることを確認した。
- アユの産卵環境を再現することで、水槽内で産卵を誘導できることを確認し、アユの産卵行動への影響を評価するための基盤を構築した。（図1.2）
- アユの産卵環境を再現した水槽では長期曝露試験は困難であったことに加え、医薬品によっては餌生物を経由した曝露も想定されるため、長期飼育に適したかけ流し水槽を用いて餌に医薬品を添加した経口曝露試験の検討を行い、経口曝露試験であればアユでも医薬品の長期的な影響を調査可能であることが示唆された。

目標2：サブテーマ2により得られた水域の環境医薬品存在実態のデータ及び日本における処方量の観点から、試験対象とする抗うつ薬及びGPCR阻害薬を選定し、メダカ及びアユにおける曝露濃度設定を行うとともに、行動影響及び繁殖影響を明らかにする。

- 医薬品は種々の薬効に分類されるが、そのうち、抗うつ薬・抗精神病薬など、中枢神経を主標的とする医薬品に限定して、メダカの一般遊泳行動が強く影響を受ける（表層遊泳性の誘起）ことを明らかにした。（図1.3、図1.4、表1.2、表1.3）
- 表層遊泳性を誘起した抗うつ薬・抗精神病薬には、共通してセロトニントランスポーター（SERT）阻害活性が認められることから、これら医薬品のSERT阻害によるシナプス間のセロトニン濃度上昇がメダカの表層遊泳性を引き起こしたと推察された。（表1.2、表1.3）
- 上記の抗うつ薬・抗精神病薬は、メダカの繁殖機能（産卵数、受精率、卵形成など）に対しても阻害作用を示すことを明らかにした。行動影響と同様に、それ以外の中枢神経を主標的としない医薬品ではメダカの繁殖機能影響は認められなかったことから、メダカの繁殖機能阻害に対しても抗うつ薬・抗精神病薬に共通の薬効が作用していることが示唆された。（図1.6、図1.7、図1.8、図1.9、図1.10、図1.11、図1.12、図1.13）
- 各抗うつ薬・抗精神病薬は、メダカの行動影響（表層遊泳性）と繁殖影響をほぼ同濃度で誘起した。

これら医薬品に曝露された場合、少なくとも遊泳と繁殖という異なる生理機能が同時に抑制されることが示された。

- 高濃度ではあるが、Mirがアユの遊泳行動や産卵行動に影響を及ぼすことを明らかにした。(図1.15、図1.16、図1.17、図1.18)
- 環境医薬品と環境エストロジェンの複合影響を評価するために、環境エストロジェンの分子マーカーであるビテロジェニン遺伝子をアユでクローニングした。(図1.14)
- 初年度に大津市の2河川で投網と電気ショッカーによる天然アユの捕獲が可能であることを確認した。しかし、新型コロナウイルス感染拡大の影響により環境医薬品の魚類（アユ）影響実態の把握を目的としたフィールド調査は実施できなかった。

6. 引用文献

- 1) Theodore *et al.*, *Environ Sci Technol*, 46: 2427-2435, 2012
- 2) Demin *et al.*, *Neurotoxicol Teratol*, 62: 27-33, 2017
- 3) Gundlach *et al.*, *Sci Total Environ*, 792: 148368, 2021
- 4) Prasad *et al.*, *Frontiers in Neuroscience*, 9: 195, 2015

II-2 水域における環境医薬品の汚染実態の把握（サブテーマ2）

高知大学

農林海洋科学部 井原 賢 （申請時：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）

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 中田 典秀

大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター Zhang Han（令和1～令和2年度）

【要旨】

GPCR阻害薬や抗うつ薬が、ヒトの受容体だけでなく魚の受容体も阻害することを体系的に示した。医薬品と受容体の相互作用としては、ヒトよりも魚の受容体が高い阻害を受ける場合もあることが分かった。当初想定よりも多くの魚受容体をサブテーマ1・3でクローニングして活性を測定できた。また、GPCR阻害薬や抗うつ薬は、複数の受容体を阻害することを確認した。代謝物も阻害活性を保つこと、代謝によって標的薬受容体に変化する医薬品もある（例クエチアピン）。

サブテーマ1での魚曝露試験での遊泳異常は、SERTの阻害を介して誘発されている可能性と、複数の受容体を介して誘起されている可能性が考えられる。下水処理場放流水の受容体阻害活性は、医薬品等量値として $\mu\text{g/L}$ から mg/L に迫る強さを示した。サブテーマ1で表層遊泳の見られた医薬品の濃度に匹敵する場合もある。

GPCR阻害薬および抗うつ薬成分について、環境試料用の一斉分析、曝露試験試料用の単物質分析法を検討し、前者については68成分の一斉分析法を、後者については13成分に対する分析法を確立した。一斉分析法を用い、近畿圏の下水処理場における流入・放流実態、そして除去実態について調査を行い、知見を集積した。GPCR阻害薬および抗うつ薬成分の下水処理場への流入量は、日本国内における生産量と正の相関関係が確認されたが、OTC薬成分については比較的大きな乖離が確認されたこと、分解もしくは代謝産物はそもそも同様の比較ができないことから、実測によるモニタリングの必要性が示された。GPCR阻害薬および抗うつ薬成分の下水処理場での除去率は概して低く、一部の分解もしくは代謝産物については下水処理過程での生成も示唆された。放流水中で検出されたGPCR阻害薬および抗うつ薬成分の濃度から算出したparoxetine等量濃度（理論活性値）は、実測された活性値と正の相関関係が確認され、(es)citalopram、ODV、duloxetine、paroxetine、sertralineなどの比較的高い寄与が示唆された。

1. 研究開発目的

①培養細胞試験によって医薬品に対する標的受容体の応答を明らかにする。特に、魚類受容体の人用医薬品に対する応答性を明確化する。②この細胞応答を活用し、琵琶湖淀川水系/下水処理場放流水の環境医薬品の濃度（等量値）を算出する。③原因物質特定のため、機器分析により標的医薬品の濃度を個別に定量する。

2. 研究目標

- 1) 下水や環境水中の抗うつ薬/GPCR阻害薬に対するヒト受容体及び魚受容体の応答を解明する。その結果から、環境モニタリングや魚での*in vivo*曝露試験で優先して対象とすべき抗うつ薬/GPCR阻害薬を明らかにする。
- 2) 質量分析計による環境医薬品の分析法を開発し、医薬品活性の原因である環境医薬品をつきとめ、汚染実態を把握する。

3. 研究開発内容

はじめに、日本において処方量の多い抗うつ薬(23種)、GPCR阻害薬(48種)をリストアップし、これら

のヒト受容体に対する薬理活性を *in vitro* アッセイによって測定した。これらの結果から、処方量が多く下水中の濃度が高いと予想され、かつ薬理活性の強い医薬品を選定した。これらの医薬品は、サブテーマ1においてメダカおよびアユの曝露試験での対象医薬品とした。

サブテーマ1および3においてメダカとアユのGPCRとセロトニントランスポーター（SERT）をクローニングした。また、ゼブラフィッシュのGPCRとSERTの遺伝子配列を公共のデータベースから入手した。メダカとアユ、ゼブラフィッシュのGPCRおよびSERTがGPCR阻害剤や抗うつ薬によって実際に阻害されるのかどうかを、*in vitro* アッセイによって試験した。その結果、これらの魚の受容体もヒトと同様に阻害されることを実証した。

下水処理場で採水した放流水中の抗うつ薬の活性を *in vitro* アッセイによって測定した。ヒトのSERTとメダカのSERTのそれぞれに対する放流水中の抗うつ薬活性を等量値として把握した。

また、日本国内での生産量と、培養細胞を用いた薬理活性の測定結果より、水生生物に対し高リスクとなりうる抗うつ薬とGPCR阻害薬について、高感度な分析法を確立した。開発した方法を用い、サブテーマ1における曝露試験の水質管理、下水処理場での流入・放流実態、除去実態調査を行った。

1) 抗うつ薬及びGPCR阻害薬の流入下水中の活性値の推定と、その結果に基づく研究対象医薬品の選定

以下の手順で処方量を調査した。

- ① DrugBank オンラインデータベース (<https://www.drugbank.ca/>) で抗うつ薬と GPCR 阻害薬を検索した。抗うつ薬は、セロトニントランスポーター (SERT)、ノルエピネフリン・トランスポーター (NET)、及びドーパミントランスポーター (DAT) の阻害薬を検索した。その結果、53 種類の抗うつ薬がリストアップされた。GPCR 阻害薬は、アンギオテンシン受容体 (AT1)、ドーパミン受容体 (D2)、アセチルコリン受容体 (M1)、エピネフリン受容体 ($\beta 1$)、およびヒスタミン受容体 (H1) の阻害薬を検索した。これらの受容体は、我々のこれまでの研究で下水や河川水からその活性が高頻度に検出されているので選択した。その結果、12 種類の AT1 受容体阻害薬、51 種類の D2 受容体阻害薬、46 種類の M1 受容体阻害薬、27 種類の $\beta 1$ 受容体阻害薬、及び 71 種類の H1 受容体阻害薬の計 207 種類がリストアップされた。
- ② DrugBank でヒットした阻害薬の日本における処方量を調べた。日本の処方量は厚生労働省が公開している第3回 NDB オープンデータ* を用いて 2017 年の年間処方量 (kg) を調べた。また、比較対象として、イギリスの National Health Service (NHS) のデータベース** を用いて、イングランドにおける年間処方量 (kg) を調べた。その結果、抗うつ薬は、日本とイングランドで処方量が上位の 18 種類を特定した。GPCR 阻害薬については日本とイングランドで処方量が上位の AT1、D2、M1、 $\beta 1$ または H1 受容体阻害薬 (合計 48 種) を特定した。
 * (https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000177221_00002.html)
 ** (<https://digital.nhs.uk/data-and-information/publications/statistical/prescription-cost-analysis/prescription-cost-analysis-england-2017>)
- ③ 年間処方量を人口 (日本 1 億 2600 万人、イングランド 5560 万人) で除することで一人一日当たりの消費量 ($\mu\text{g}/\text{cap}/\text{d}$) を算出した。
- ④ 消費量 ($\mu\text{g}/\text{cap}/\text{d}$) と人体からの医薬品の未変化体の排泄率、一人一日当たりの生活用水の使用量 (日本 284 L/cap/day、イングランド 150 L/cap/day) から流入下水における予測濃度 (ng/L) を算出した。
- ⑤ 抗うつ薬アッセイによって、ヒト SERT に対する 18 種類の抗うつ薬の IC_{50} 値を測定し、活性値が最も強い paroxetine に対する比活性値を算出した。また、TGF α shedding アッセイによりヒト GPCR に対する 48 種類の GPCR 阻害薬の IC_{50} 値 (50% 阻害濃度) を測定し、活性値が最も強い阻害薬 (AT1 の valsartan、D2 の domperidone、M1 の trospium、 $\beta 1$ の propranolol、H1 の mirtazapine) に対する比活性値を算出した。
- ⑥ 流入下水における予測濃度 (ng/L) 及び比活性値から、18 種類の抗うつ薬及び 48 種類の GPCR 阻害薬の流入下水中の阻害活性を等量値 (equivalent quantities : EQs) として算出した。日本とイギ

リスの下水処理場それぞれについて算出した。

2) 抗うつ薬アッセイの方法

選択的セロトニン再吸収阻害剤(SSRI)などに分類される抗うつ薬は神経細胞の細胞膜上に存在するトランスポーターと呼ばれる膜タンパク質の働きを阻害する。よって、トランスポーターによる基質の取り込みがどれくらい阻害されるのか定量することによって、抗うつ薬の薬理活性を定量できる。本研究では、トランスポーターによって特異的に細胞内へ取り込まれる蛍光基質 4-(4-(dimethylamino)phenyl)-1-methylpyridinium (略号 APP) を利用する。APP は 2012 年に開発されたトランスポーターの蛍光基質である。細胞を培養している培地に APP を添加し、トランスポーターを介して細胞内に取り込まれた APP の蛍光強度を測定することでトランスポーターの活性を定量する。抗うつ薬の濃度依存的に細胞への APP の取り込みが阻害されるので、その差から抗うつ薬の濃度を定量できる。アッセイの詳細は、我々の論文を参照いただきたい¹⁾。本研究では、抗うつ薬の未変化体だけでなく、いくつかの代謝物の活性の強さも定量した。また、ヒト SERT とゼブラフィッシュ SERT、メダカ SERT、およびアユ SERT をそれぞれ試験し、ヒトと魚の SERT に対する抗うつ薬の阻害活性の相違を検討した。

3) TGF α shedding アッセイの方法

HEK293細胞へ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transforming growth factor- α (AP-TGF α)をコードするプラスミドを導入し、細胞をリガンドで刺激すると、下流のシグナルが誘発され、AP-TGF α の膜結合前駆体が切断され(TGF α のshedding、アッセイの名称の由来)、細胞膜表面(Cell画分)から培地(conditioned medium: CM画分)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-NPP)を培地へ加えるとCM画分に黄色の反応生成物(*p*-NP)が生じる。CM画分の黄色の発色を定量することで、リガンドの生理活性の強さを定量できる。アッセイの詳細は過去の論文を参照²⁾³⁾。本研究では、ヒトのGPCRだけでなくゼブラフィッシュ、メダカ、およびアユのGPCRをそれぞれ試験し、ヒトと魚のGPCRに対するGPCR阻害薬の阻害活性の相違を検討した。

4) 下水処理場の放流水中の抗うつ薬およびGPCR阻害薬の生理活性の測定

2018年から2021年にかけて近畿地方の6つの下水処理場で採水した放流水を固相抽出によって2000倍に濃縮した。細胞毒性のない範囲で希釈列を調整しアッセイに供した。得られた阻害曲線から20%阻害値(IC₂₀)を算出し、下水試料の医薬品の活性値を参照医薬品の等量値として算出した。

5) 抗うつ薬およびGPCR阻害薬の分析方法の開発

効率的な汚染実態調査を実施するため、一斉分析法の開発を目指した。一方、サブテーマ1で実施される曝露試験においては、単物質曝露かつ水環境よりも比較的高濃度での試験であるが、発生する試料数が多いことから、単物質を対象とした簡易的な分析方法の開発を目指した。分析法の開発は、対象物質の選定、標準物質の購入と標準溶液の調整、タンデム質量分析計(MS/MS)と液体クロマトグラフ(LC)による分析条件の最適化の順に行った。さらに、下水処理水や河川水のように、分析対象物質濃度が低濃度で存在すると予想される試料については、精製・濃縮を目的とした固相抽出(SPE)が必要となる。それぞれの操作過程の最適化ののち、実試料を用いた分析精度の確認を行い、完了する。分析過程において生じる消失や、質量分析におけるイオン化阻害や促進等を補正するため、SPEに供する試料へ、分析対象物質の重水素もしくは炭素同位体でラベル化した物質(サロゲート)を一定量添加し、定量値を補正する。分析精度の確認は、水試料へ分析対象物質とサロゲートを添加し、添加量から求めた添加回収率と繰返し分析精度から判断した。具体的には、サロゲートによる補正值を元にした添加回収率が70-130%、3連以上の変動(相対標準偏差)が20%以下となった分析対象成分について、分析法の確立と判断した。

曝露試験水の分析では、被験物質濃度が1 mg/Lでは10倍希釈、0.1 mg/Lではほぼ原液(17/20倍希釈)のまま、0.01 mg/Lではポリマー基質の逆相固相カートリッジ(Oasis HLB、Waters社製もしくはMC-1、

ジーエルサイエンス社製)により10倍濃縮、0.001 mg/Lでは同様に100倍濃縮、0.0001 mg/Lでは500倍濃縮した。全ての試験区の曝露水について、少なくとも3連での分析を行うとともに、SPEによる濃縮を行った試験区については、同じ濃度での添加回収試験を行い、分析精度を確認した。

いずれの濃縮もしくは希釈液は、最終溶媒を15%メタノール含有の0.1%ギ酸水溶液1 mLに置換し、LC-MS/MS (TDQもしくはXevo TQ-s micro、Waters社製)に供した。LC-MS/MS分析条件については、本サブテーマ担当グループが開発した既報⁴⁾を参考に調整した。

6) 抗うつ薬およびGPCR阻害薬の下水処理場での流入・放流実態および除去実態の把握

確立した分析法により、下水処理場での流入・放流実態、除去実態を把握した。GPCR阻害薬としてアンジオテンシンII受容体(AT)拮抗薬9種(分解もしくは代謝産物2種を含む)、ヒスタミン受容体(H)拮抗薬14種(代謝産物1種を含む)、アドレナリン受容体(β1)拮抗薬5種(代謝産物1種を含む)、ドーパミン受容体(D2)拮抗薬7種、ムスカリン性アセチルコリン受容体(M1)拮抗薬1種、抗うつ薬(AD)成分として24種(代謝産物7種を含む)、下水処理過程や環境中挙動の指標となりうるその他の医薬品成分11種の合計68種を一斉分析対象成分とした。2020年12月(冬季)、2021年4月(春季)、2021年9月(夏季)に近畿圏の下水処理場(STP A)1カ所にて、流入水と放流水の24時間等量混合コンポジット試料を5~7回採水した。同処理場は、標準活性汚泥処理ののち、塩素処理を行っている。また、同時期に滋賀県、京都府、大阪府の5~7ヶ所の下水処理場(STP A~G)でも放流水を採取した。これらの下水処理場の多くは、標準活性汚泥処理ののち、塩素処理を行っているが、1ヶ所では標準活性汚泥処理ののち、色素除去のためオゾン処理を行なっている。

下水試料は、ガラス繊維ろ紙(孔径1.0 μm)でろ過し、ろ液は57種のサロゲート混合溶液を添加後、Oasis HLBとOasis MCX(Waters)を連結したカートリッジにて固相抽出(SPE)した。ろ紙上残差は、サロゲート混合溶液添加後、メタノール水溶液で超音波抽出・希釈し、同様にSPEを行った。各SPE抽出液を窒素パージ後に濃縮乾固後、LC-MSMSにより同定・定量した。

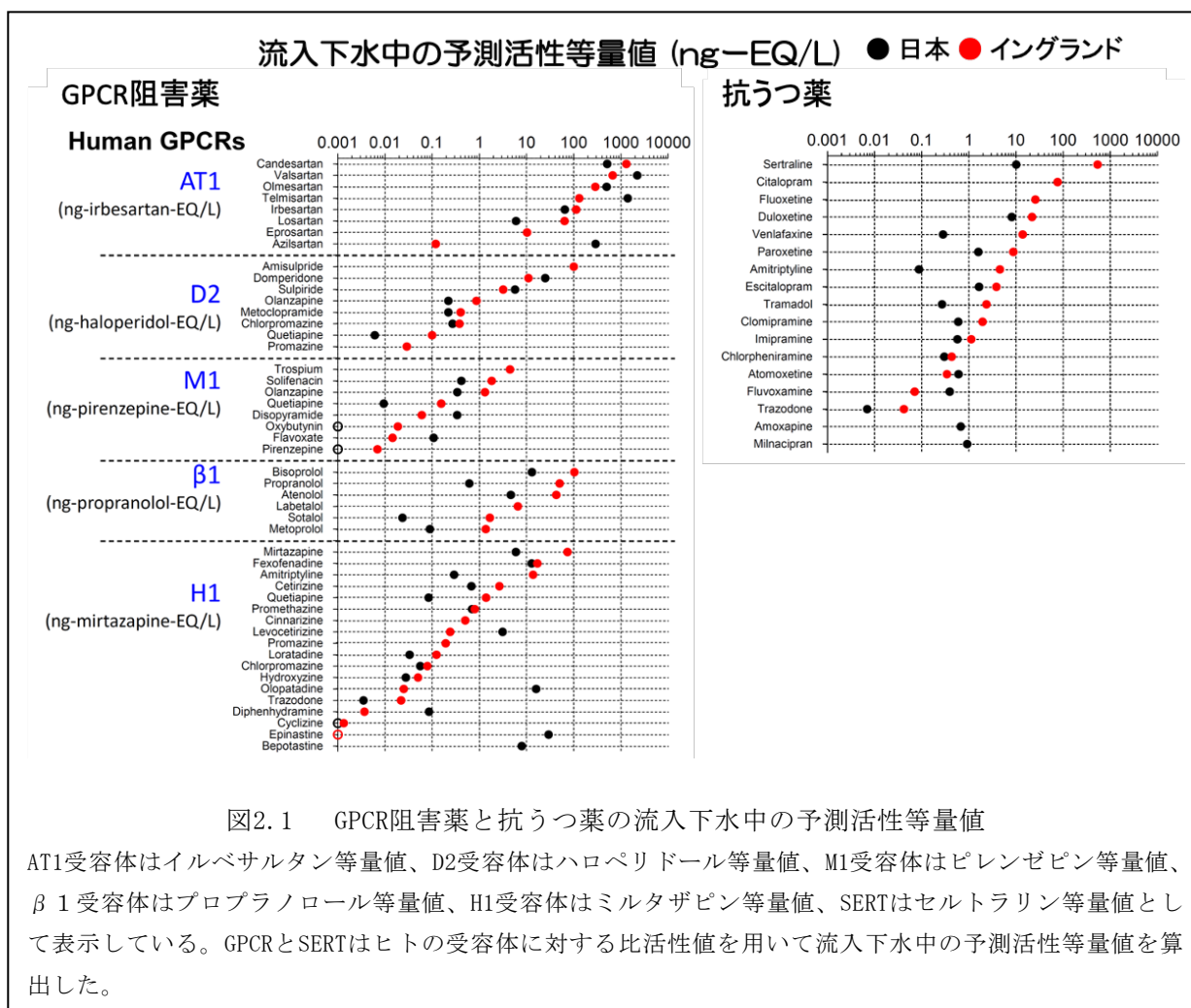
4. 結果及び考察

1) 抗うつ薬及びGPCR阻害薬の流入下水中の活性値の推定と、その結果に基づく研究対象医薬品の選定

処方量上位の抗うつ薬 18 種類及び GPCR 阻害薬 48 種類がリストアップし、リストアップされた医薬品の、日本とイングランドにおける、流入下水中の予測濃度 (ng/L) を算出した。また、抗うつ薬アッセイおよび TGF α shedding アッセイによって抗うつ薬と GPCR 阻害薬の IC₅₀ 値を求め、IC₅₀ 値を基に比活性値を算出した⁵⁾。これだけ大規模に抗うつ薬と GPCR 阻害薬の薬理活性を *in vitro* アッセイによって明らかにしたのは、本研究が世界初である。比活性値の比較から、抗うつ薬と GPCR 阻害薬の活性値は活性が弱いものから強いものまで、最大で 1000 倍程度の差があることがわかった。

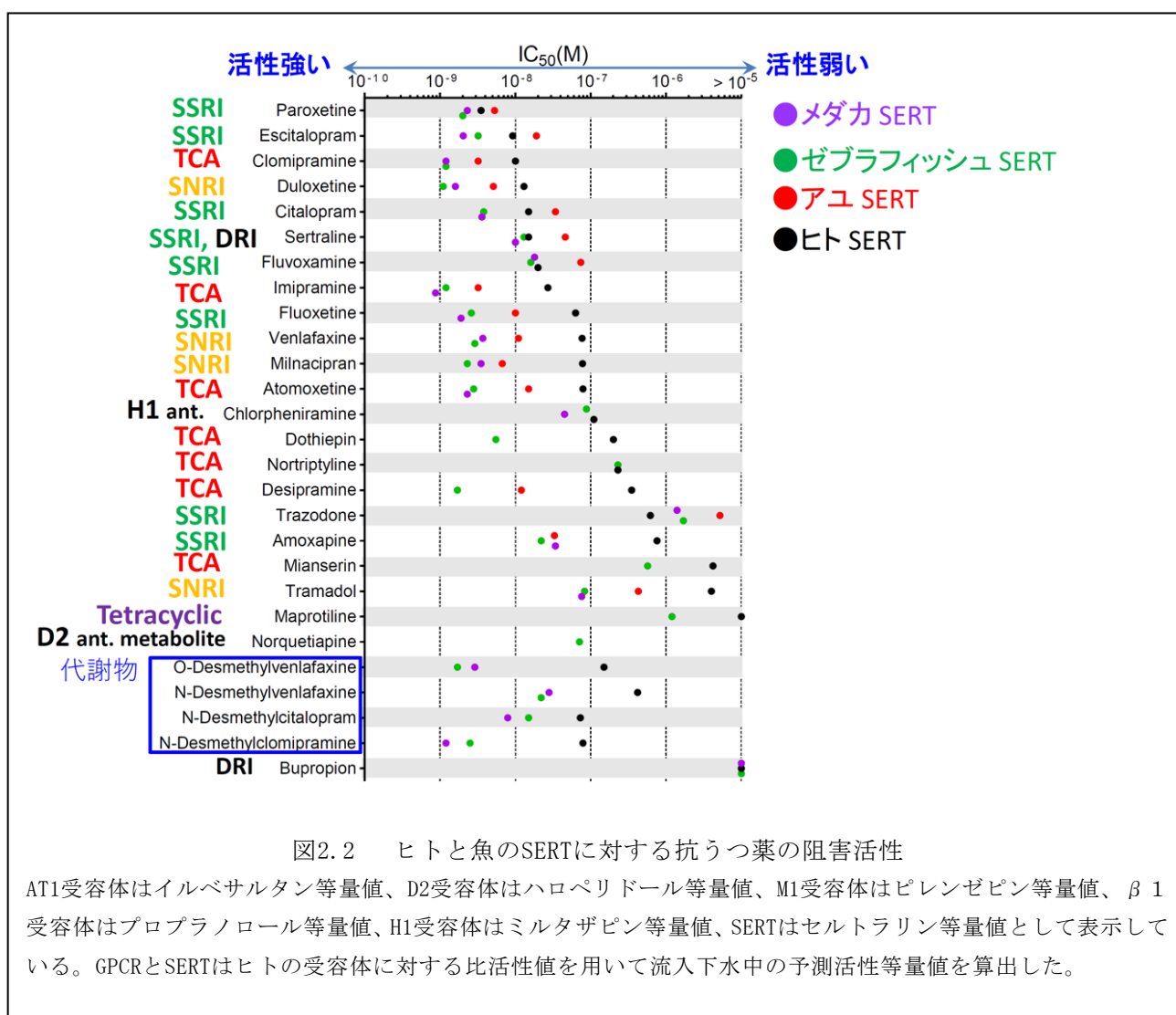
流入下水中の予測濃度と比活性値から、流入下水中の抗うつ薬と GPCR 阻害薬の予測活性値を参照医薬品の等量値 (EQ) として算出した (図2.1)。

日本において、流入下水中の活性値が高いと予測された抗うつ薬は、sertraline、duloxetine、escitalopram、paroxetine、milnacipran、amoxapine、atomoxetine、clomipramine、imipramine、fluvoxamine、chlorpheniramine、venlafaxine、tramadol、amitriptyline となった。日本において、流入下水中の活性値が高いと予測された GPCR 阻害薬は以下のとおり： valsartan、telmisartan、candesartan、olmesartan、azilsartan (以上、AT1阻害薬)； domperidone、sulpiride (以上、D2阻害薬)； solifenacin、olanzapine、disopyramide、flavoxate (以上、M1阻害薬)； bisoprolol、atenolol、propranolol (以上、 β 1阻害薬)； epinastine、olopatadine、fexofenadine、bepotastine、mirtazapine、levocetirizine (以上、H1阻害薬)。



2) ヒトとゼブラフィッシュ、メダカ、アユのSERTに対する抗うつ薬の阻害活性の相違

抗うつ薬及びその代謝物の IC_{50} 値をヒトとゼブラフィッシュ、メダカ、およびアユSERTで比較した(図2.2)。対象医薬品22種中、citalopram、escitalopram、fluoxetine、fluvoxamine、paroxetine、duloxetine、milnacipran、venlafaxine、amitriptyline、imipramine、atomoxetine、mirtazapine、chlorpheniramine、N-Desmethylcitalopram、N-Desmethylvenlafaxine、O-Desmethylvenlafaxine、N-Desmethylvenlafaxineの17種において、少なくとも分子レベルでは、ヒトSERTよりもゼブラフィッシュ、メダカSERTに対してより強い阻害活性を有することが分かった。この結果は、医薬品の生態系影響を評価する場合にヒト受容体ではなく水生生物の受容体を用いて医薬品活性を評価することの重要性を示唆している。アユSERTはメダカとゼブラフィッシュSERTに比べて阻害されにくい傾向も確認された。



3) ヒトとゼブラフィッシュ、メダカ、アユのGPCRに対するGPCR阻害薬の阻害活性の相違

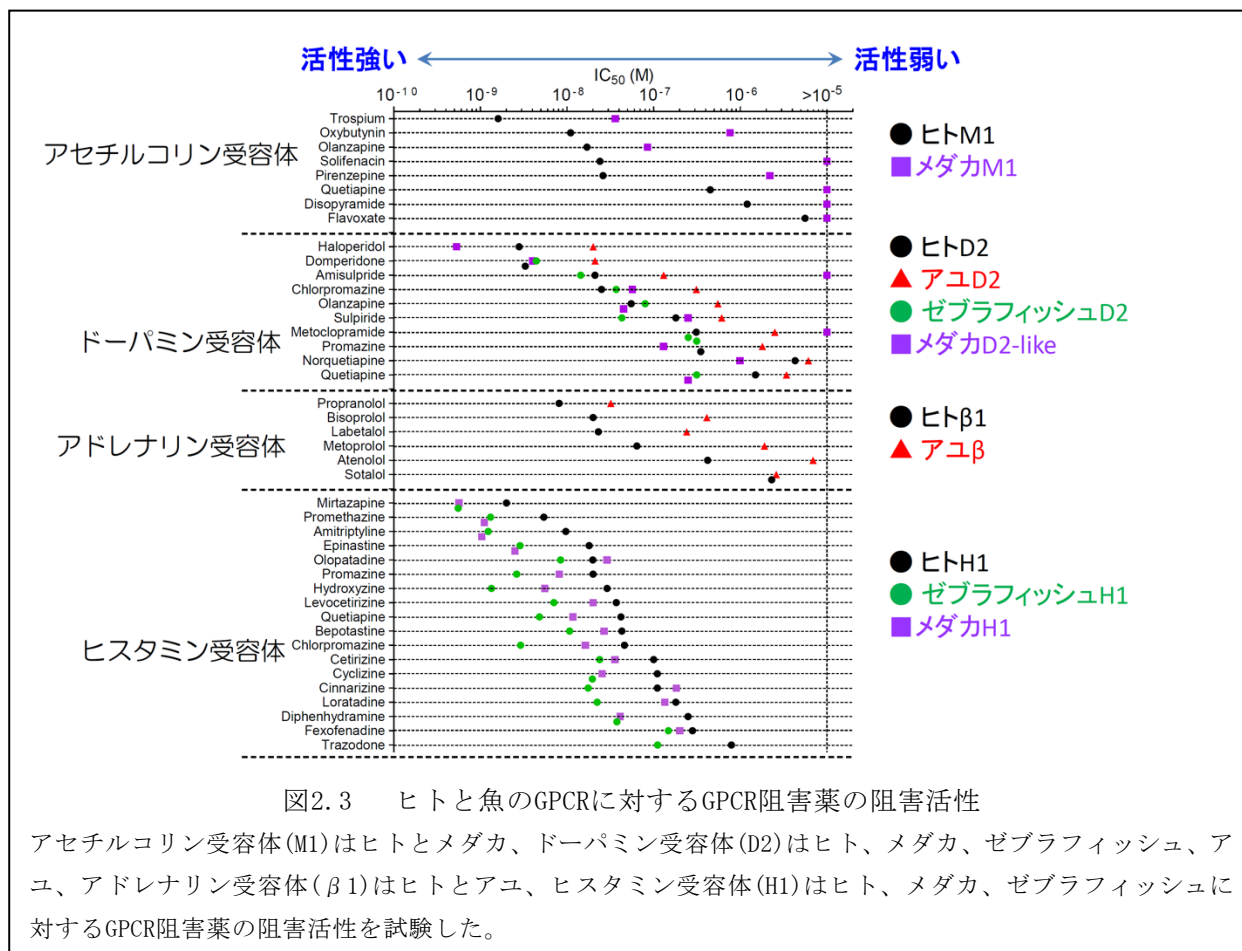
GPCR阻害薬42種類を試験した。D2受容体でのアッセイの結果から、メダカやゼブラフィッシュ、アユのD2受容もヒトD2受容体と同様に阻害されることが明らかとなった(図2.3)。メダカやゼブラフィッシュD2はヒトD2受容体に比べて強い阻害を受ける傾向が見られた。アユD2は、ヒトD2よりも阻害の程度は弱かった。

M1受容体でのアッセイの結果から、メダカM1受容もヒトM1受容体と同様に阻害されることが明らかとなった。ただしメダカM1受容体の阻害はヒトM1に比べて阻害は弱かった。 $\beta 1$ 受容体についても、アユ β

受容体もヒト $\beta 1$ 受容体と同様に阻害されることが明らかとなった。ただしアユ β 受容体の阻害はヒト $\beta 1$ 受容体に比べて阻害は弱かった。

H1受容体でのアッセイの結果から、メダカやゼブラフィッシュのH1受容もヒトH1受容体と同様に阻害されることが明らかとなった。メダカやゼブラフィッシュH1はヒトD2受容体に比べて強い阻害を受ける傾向が見られた。

これらの結果は、医薬品の生態系影響を評価する場合にヒト受容体ではなく水生生物の受容体を用いて医薬品活性を評価することの重要性を示唆している。



4) サブテーマ1での魚曝露試験で試験している医薬品のGPCRおよびモノアミントランスポーターに対するIC50値

サブテーマ1では、ヒト受容体に対する薬理活性が強く下水中の濃度も高いと予測され優先して調査研究すべきとして選定されたGPCR阻害薬と抗うつ薬 (図2.1) をメダカとアユの曝露試験で試験した。試験した医薬品のGPCRおよびモノアミントランスポーターに対するIC50値を図2.4にまとめた。魚曝露試験で表層遊泳の異常行動が見られた医薬品は、共通してSERTに対する阻害活性が高い傾向が見て取れる。QuetiapineはメダカとゼブラフィッシュのSERTを阻害しないが、quetiapineの代謝物のnorquetiapineはメダカとゼブラフィッシュのSERTを強く阻害する。表層遊泳の異常行動は、SERTの阻害を介して誘発される可能性がある。ただし、図2.4に示すように、これらの医薬品は複数のGPCRやモノアミントランスポーターを阻害するので、SERT単独ではなく複数のGPCRおよびモノアミントランスポーターの阻害を通じて行動異常を誘発している可能性も否定できない。

GPCR														モノアミントランスポーター										魚 表層遊泳 (サブテーマ1)
分類		h1h1	h1h2	h2	h4	h1h1	h1h2	h5-HT1A	h2A	hSERT	hNET	hDAT	medaka SERTa	medaka NET	medaka DAT	zebrafish SERT	ayu SERT	ayu NET	ayu DAT					
H1 アンタゴニスト	Chlorpromazine	6.3E-08	N.D.	2.6E-08	8.3E-08	2.1E-07	N.D.	4.0E-06	8.6E-06	5.7E-07			1.2E-06			9.4E-09								有
	Fexofenadine	3.0E-07	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.			> 1e-5			N.D.								無
	Amitriptyline	6.9E-09	5.5E-06	4.5E-06	1.5E-06	2.7E-08	N.D.	5.0E-06	> 1e-5	6.1E-08			3.0E-09			1.9E-09								有
	Bepotastine	4.8E-08	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	> 1e-5			> 1e-5			N.D.								無
	Cetirizine	6.5E-08	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.			N.D.			N.D.								無
	Epinastine	1.3E-08	> 1e-5	N.D.	> 1e-5	N.D.	N.D.	> 1e-5	> 1e-5	> 1e-5			2.9E-06			1.2E-06								無
	Mirtazapine	2.0E-09	N.D.	> 1e-5	3.6E-06	1.6E-06	N.D.	N.D.	1.1E-06	N.D.			2.7E-06			4.1E-06								有
β 1 アンタゴニスト	Bisoprolol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.0E-06	1.1E-08	8.7E-06	N.D.	N.D.			N.D.			N.D.								無
D2 アンタゴニスト	Sulpiride	N.D.	N.D.	1.9E-07	8.8E-06	> 1e-5	N.D.	> 1e-5	> 1e-5	> 1e-5			N.D.			> 1e-5								無
	Norquetiapine	2.4E-08	N.D.	4.3E-06	3.1E-06	1.1E-07	N.D.	9.97E-06	N.D.	6.0E-06			8.5E-08	1.8E-08	7.2E-06	7.1E-08								有
	Quetiapine	2.2E-08	> 1e-5	8.6E-07	2.7E-06	2.5E-07	N.D.	N.D.	> 1e-5	N.D.			N.D.			N.D.								有
	Domperidone	4.7E-06	N.D.	3.7E-09	1.8E-07	8.7E-06	N.D.	2.5E-06	> 1e-5	5.0E-06			1.7E-06			1.1E-06								無
D4 アンタゴニスト	Olanzapine	8.7E-09	> 1e-5	6.3E-08	5.7E-08	2.4E-08	N.D.	> 1e-5	8.2E-06	> 1e-5			7.5E-07			4.1E-07								有
抗うつ薬	Fluoxetine	> 1e-5		> 1e-5		3.5E-06	> 1e-5	N.D.		6.3E-08	5.3E-06	> 1e-5	1.9E-09	7.5E-07		2.6E-09	1.0E-08	1.6E-06	4.0E-06					有
	Venlafaxine	N.D.		N.D.		N.D.	> 1e-5	N.D.		7.7E-08	7.1E-06	> 1e-5	3.7E-09	1.8E-07	3.3E-08	2.9E-09	1.1E-08	9.3E-07	4.1E-06					有
	Duloxetine	> 1e-5		N.D.		6.5E-06	> 1e-5	N.D.		1.3E-08	1.6E-07	2.0E-06	1.6E-09	1.1E-08	2.8E-07	1.1E-09	5.1E-09	2.0E-08	> 1e-5					有

図2.4 サブテーマ1での魚曝露試験で試験している医薬品のGPCRおよびモノアミントランスポーターに対するIC50値

H1阻害薬、 β 1阻害薬、D2阻害薬、D4阻害薬、および抗うつ薬のGPCRとモノアミントランスポーターに対するIC50値を示す。濃い色の背景色のセルほどIC50値が小さい、つまり阻害活性が強い。サブテーマ1での魚曝露試験で表層遊泳の異常行動の有無も併せてしめす。表層遊泳が見られた医薬品の名前は赤字で表記している。

5) 下水処理場の放流水中の抗うつ薬およびGPCR阻害薬の生理活性の測定

下水処理場の放流水のべ27サンプルから検出されたヒトSERTに対する阻害活性を抗うつ薬アッセイによって測定して、paroxetine等量値 (ng-paroxetine-EQ/L) として定量した。処理場毎、採水日毎に活性値の差は大きく、26～1484 ng-paroxetine-EQ/Lの範囲を示した。平均値は42 ng-paroxetine-EQ/Lであった。同じサンプルをメダカSERTに対する阻害活性を定量した結果を図2.5に示す。ここでは、活性等量値をサブテーマ1で魚曝露試験を行った医薬品の等量値として定量して示している。

図2.5に示すように、阻害活性の等量値はng/L～mg/Lの範囲であった。阻害活性をミルタザピン等量やオランザピン等量に換算した場合、曝露試験で表層遊泳の見られた濃度 (1mg/L、サブテーマ1の曝露試験の項を参照) に近い活性値となった。この結果は、下水処理場放流水の受容体阻害活性は、サブテーマ1で表層遊泳の見られた医薬品の濃度に匹敵する場合もあることを示している。

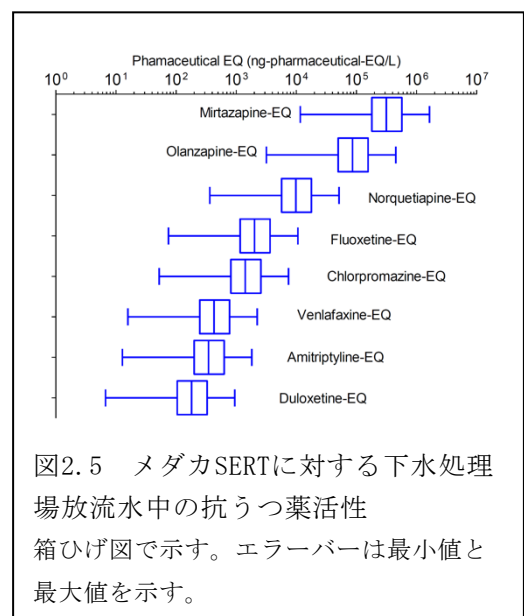


図2.5 メダカSERTに対する下水処理場放流水中の抗うつ薬活性
箱ひげ図で示す。エラーバーは最小値と最大値を示す。

6) 抗うつ薬およびGPCR阻害薬の分析方法の開発

ガラス繊維ろ紙によるろ過、サロゲート混合溶液の添加、2種のSPEカートリッジを連結した濃縮・精製、LC-MS/MSによる同定定量により、添加回収率が70-130%、3連以上の相対標準偏差が20%以下となった68成分 (表2.1) を一斉分析対象成分として、次項の環境分析に適用した。

サブテーマ1で実施された曝露試験の分析においては、個別に分析精度を確認した。単物質の分析とし

て曝露水中のmirtazapine、duloxetine、amitriptyline、chlorpromazine、cetirizine、olanzapine、quetiapine fumarate、sulpiride、fexofenadine、domperidone、bisoprolol、venlafaxine、固形上の餌に噴霧して曝露した餌試料中のethynyl estradiolとchlorpromazine、またこれらを曝露したアユの血清中のethynyl estradiolとchlorpromazineの分析を行った。

表2.1 一斉分析対象成分

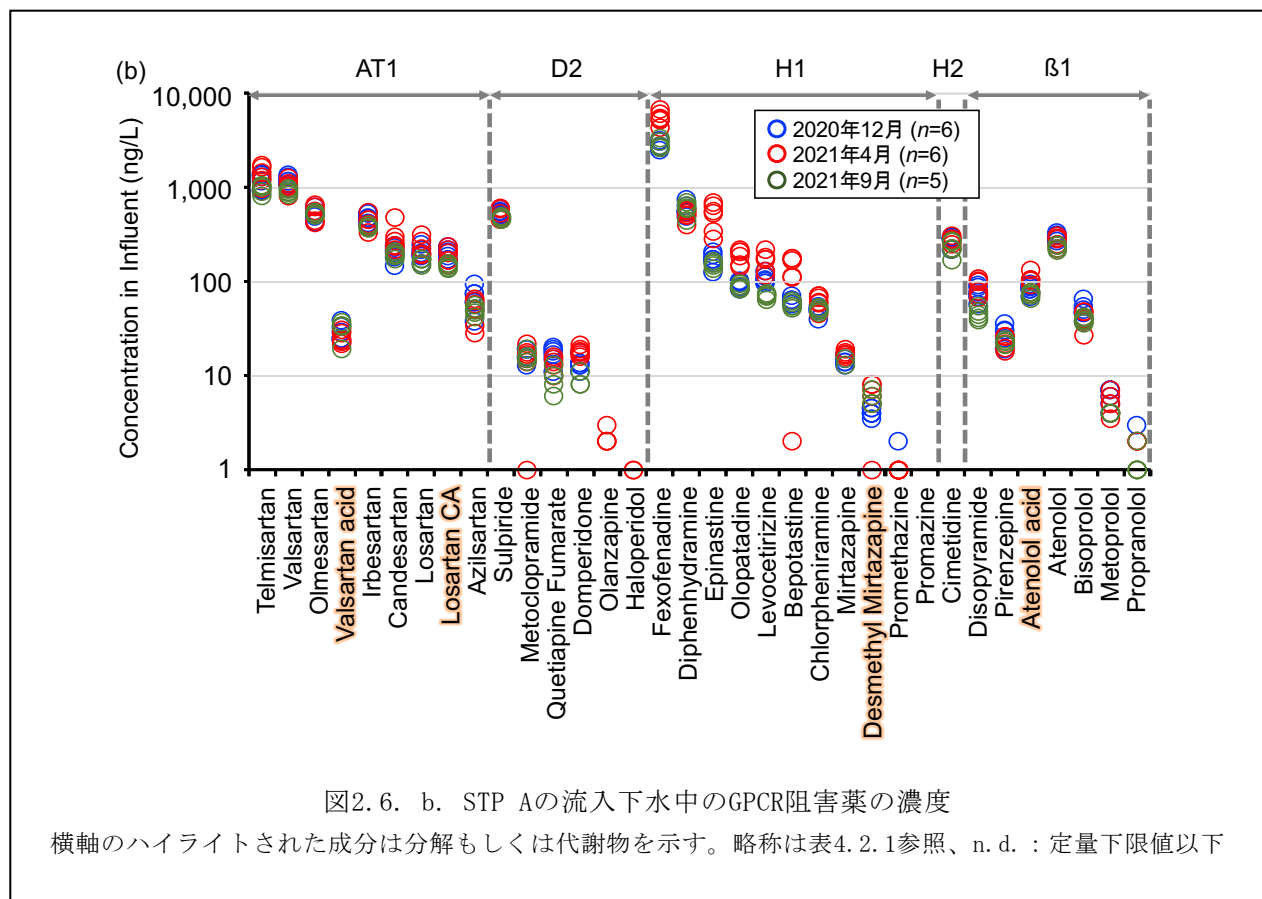
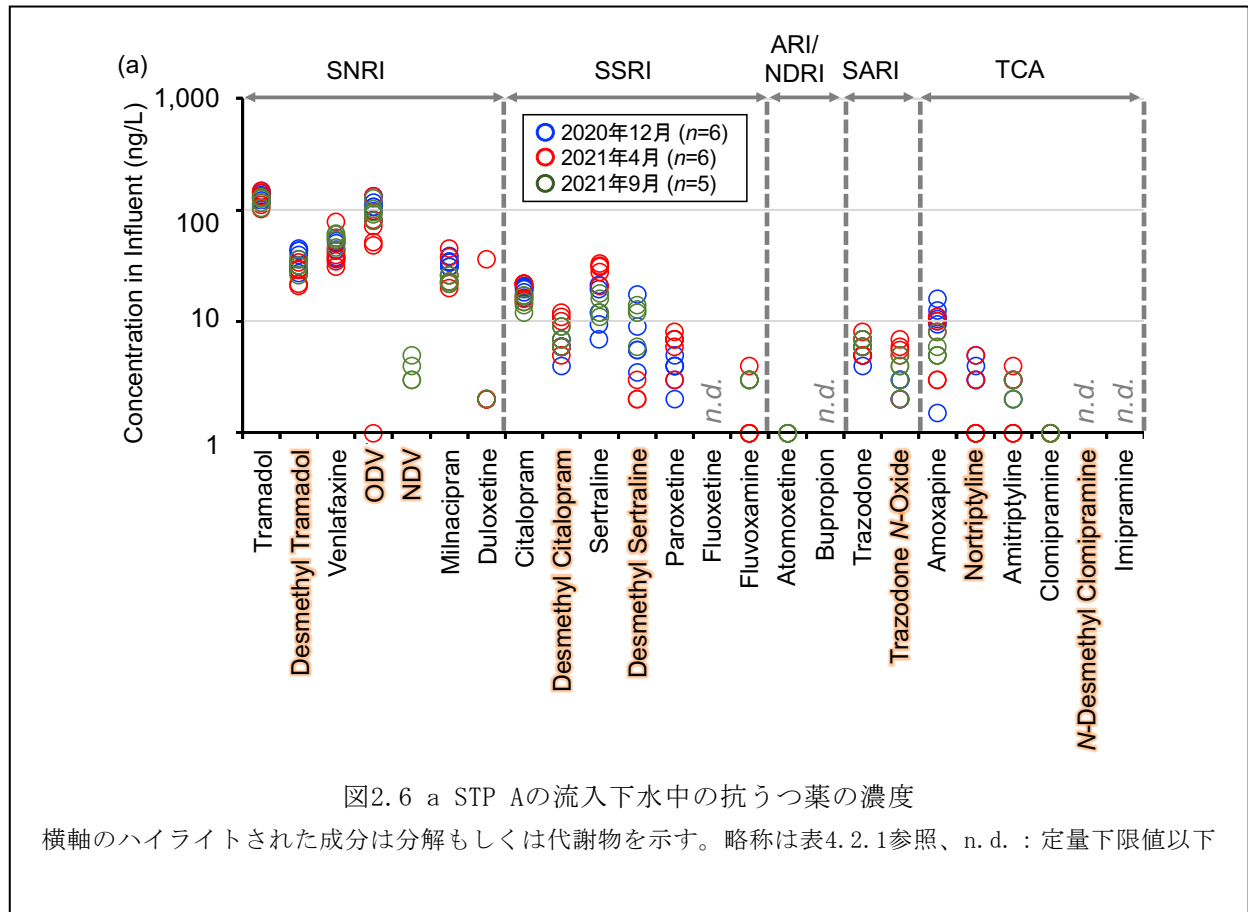
AT受容体拮抗薬 (アンジオテンシン受容体)	Azilsartan, Candesartan, Irbesartan, Losartan, Olmesartan, Telmisartan, Valsartan, Losartan carboxylic acid, Valsartan acid
D受容体拮抗薬 (ドーパミン受容体)	Domperidone, Metoclopramide, Olanzapine, Quetiapine fumarate, Haloperidol, Sulpiride
M受容体拮抗薬 (ムスカリン受容体)	Quetiapine fumarate, Pirenzepine
β受容体拮抗薬 (アドレナリン受容体)	Atenolol, Bisoprolol, Metoprolol, Propranolol, Atenolol acid
H受容体拮抗薬 (ヒスタミン受容体)	Bepotastine, Chlorpheniramine, Diphenhydramine, Epinastine, Fexofenadine, Levocetirizine, Mirtazapine, Olopatadine, Pirenzepine, Promazine, Promethazine, Desmethyl mirtazapine , Cimetidine
SNRI (セロトニン-ノルエピネフリン 再取り込み阻害薬)	Duloxetine, Milnacipran, Tramadol, Venlafaxine, Desmethyl tramadol, N-desmethyl venlafaxine (NDV), O-desmethyl venlafaxine (ODV)
SSRI (選択的セロトニン 再取り込み阻害薬)	(Es)Citalopram, Fluoxetine, Fluvoxamine, Paroxetine, Sertraline, Desmethyl citalopram, Desmethyl sertraline
TCA (三環系抗うつ薬)	Amitriptyline, Amoxapine, Clomipramine, Imipramine, Nortriptyline, N-desmethyl clomipramine
その他の 抗うつ薬成分	Bupropion (ノルエピネフリン・ドーパミン再取り込み阻害薬: NDRI), Trazodone, Trazodone N-oxide (セロトニン遮断再取り込み阻害薬: SARI)
その他の 医薬品成分#	Acetaminophen, Amantadine, Bezafibrate, Caffeine, Carbamazepine, Crotamiton, DEET, Dipyrindamole, Disopyramide, Ketoprofen, Salbutamol

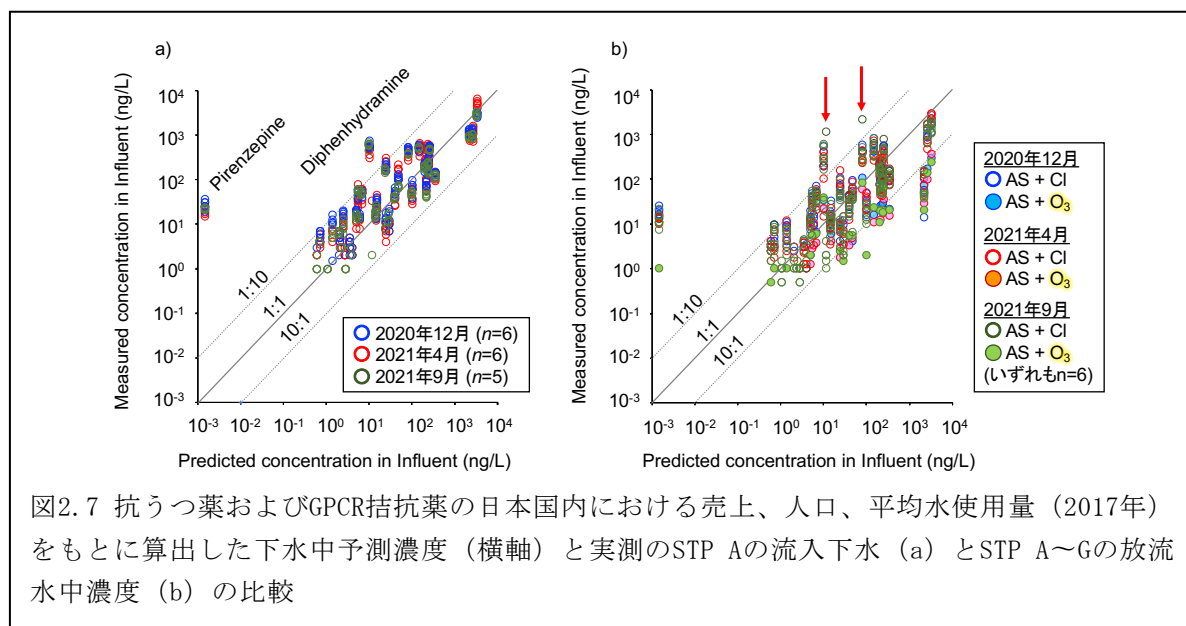
*ハイライトした成分は代謝もしくは分解産物 # 下水処理プロセスや水環境中挙動の指標

7) 抗うつ薬およびGPCR拮抗薬の下水処理場での流入・放流実態および除去実態の把握

流入水中の抗うつ薬とGPCR拮抗薬の検出濃度を図2.6 a, bに示す。抗うつ薬成分については、Tramadolとvenlafaxineが比較的高濃度かつ高頻度で検出され、これらの代謝産物も高濃度で検出された。SNRIに比べSSRIの検出レベルは1/10程度であったが、citalopramとsertralineも代謝物と共に高頻度で検出された。下水処理場への流入濃度について、現時点では明確な季節変動は確認されなかった。流入水中のGPCR拮抗薬成分（図2.6 b）については、fexofenadineが特出して高濃度かつ高頻度で検出された。他の成分についても高頻度で検出され、分析を行った代謝産物についても高頻度で検出された。一方、抗うつ薬成分同様に現時点では明確な季節変動は確認されなかった。

既報⁵⁾に従い、日本国内での抗うつ薬およびGPCR拮抗薬の売上、人口、平均水使用量（2017年）をもとに、下水中の濃度を予測（予測濃度）、STP Aの流入水の分析結果と比較した（図2.7 (a)）。分析対象成分のうち、多くの成分が下水中の予測濃度と実測値との間で±10倍の範囲に収まった。今回用いた調査結果では、冬・春・夏季の観測結果が含まれるが、季節による乖離傾向の差異は確認されなかった。±10%の範囲を大きく超過したのは、胃薬の成分であるpirenzepine (M1) と痒み止めや睡眠改善治療薬成分のdiphenhydramine (H1) であった。これらは抗うつ薬成分のような他の多くの成分と異なり、市販薬（OTC薬）としても流通しているため、処方薬を対象としたNDBデータベースをもとにした予測濃度との乖離が生じたものと考えられる。分解もしくは代謝産物については、比較対象となる予測濃度の算出が現時点ではできないが、これらにも薬理活性がある成分もあるため、OTC薬同様に、実測によるモニタリングが必要だと考えられる。





STP Aの放流水からは、GPCR拮抗薬の中ではtelmisartan、sulpiride、fexofenadineが比較的高濃度（それぞれ734～1250 ng/L、328～640 ng/L、1668～5240 ng/L）で検出され、さらに代謝もしくは分解産物であるvalsartan acidやatenolol acid（それぞれ3.5～618 ng/L、211～470 ng/L）が親物質よりも高濃度かつ高頻度で検出された（それぞれ26～185 ng/L、59～125 ng/L）（図2.8）。抗うつ薬の中ではtramadol、milnacipranが比較的高濃度（それぞれ96～157 ng/L、24～37 ng/L）で検出され、さらに代謝もしくは分解産物であるdesmethyl tramadolも同程度の濃度（24～41 ng/L）で検出された。

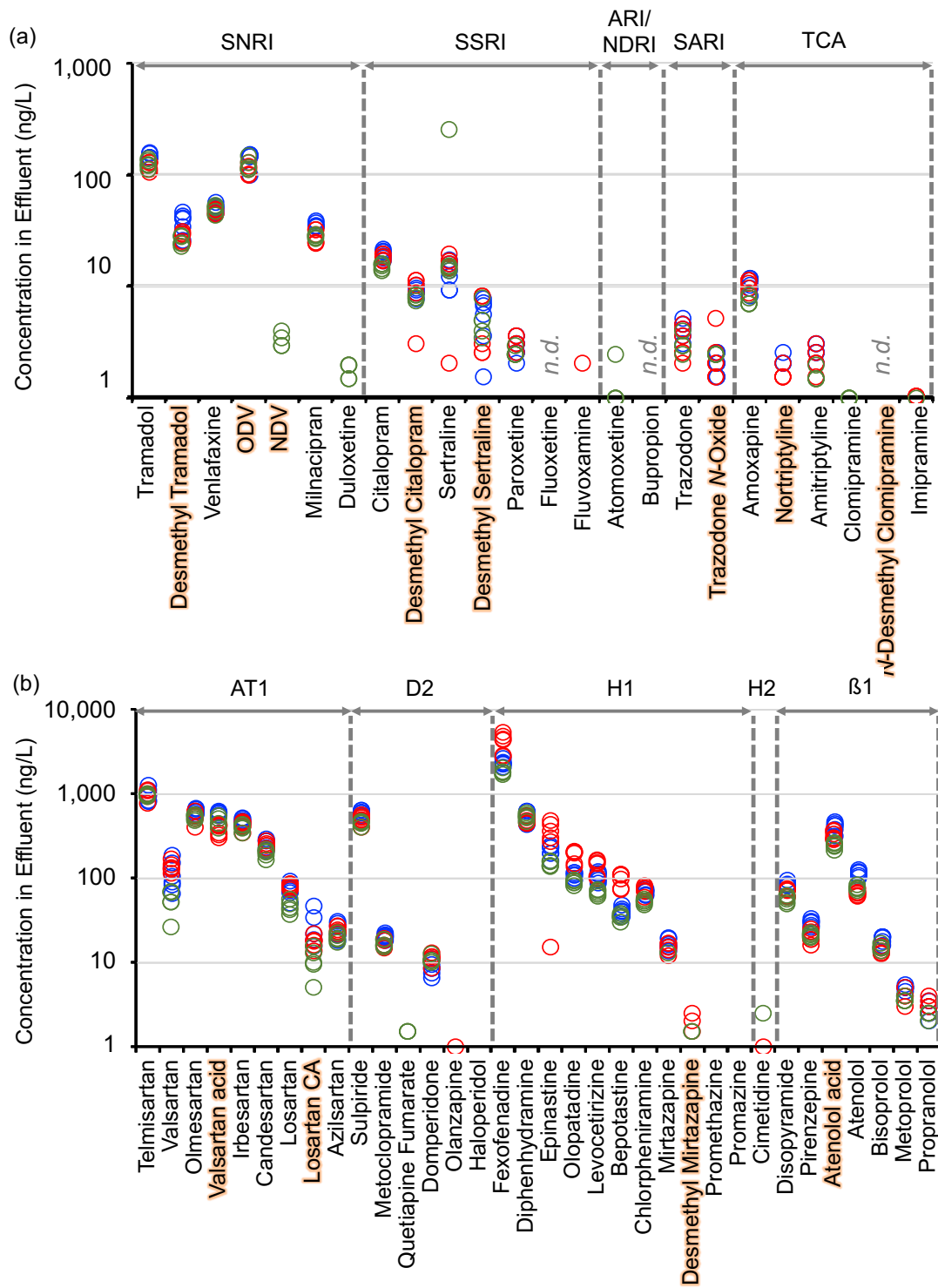
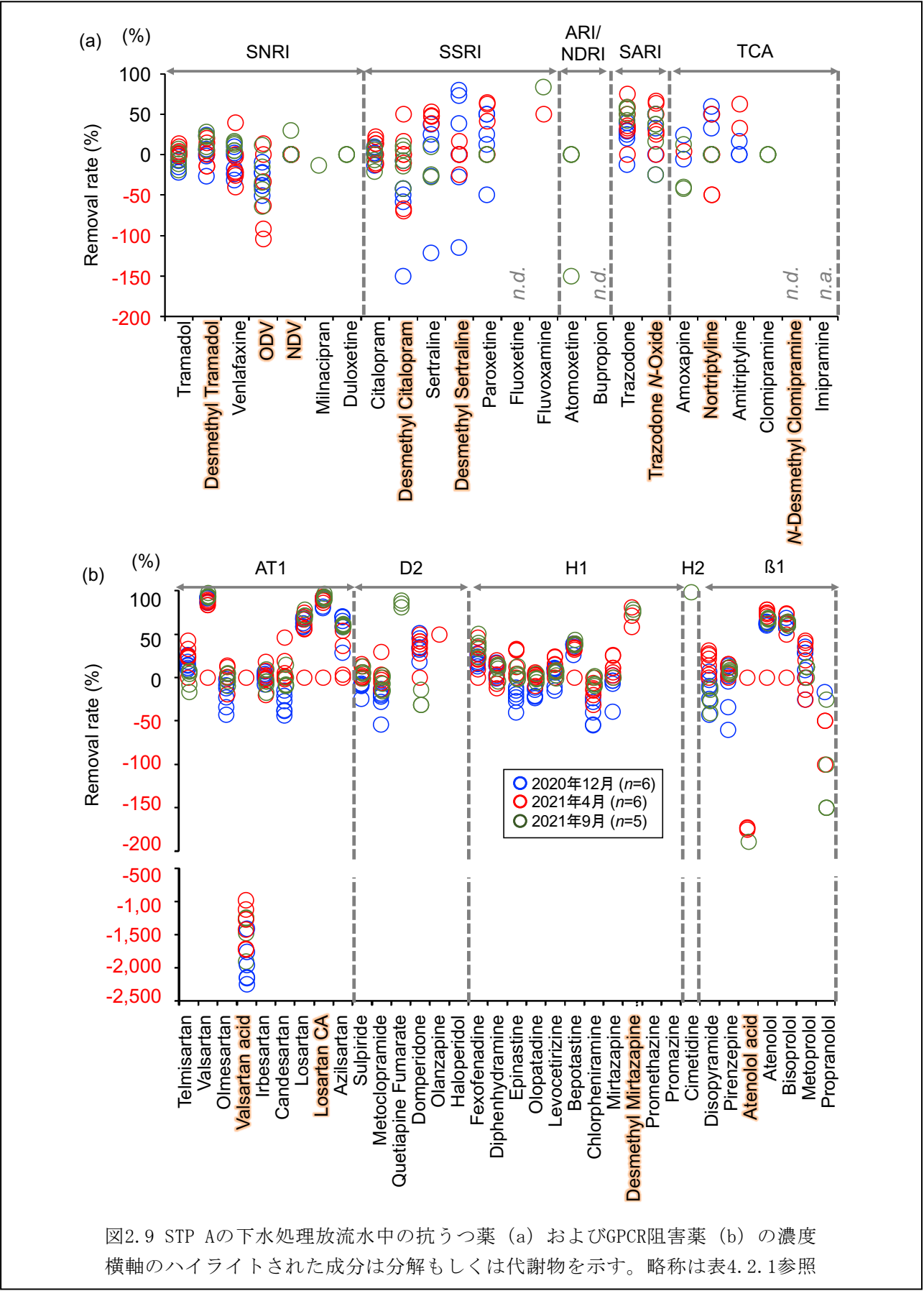


図2.8 STP Aの下水処理放流水中の抗うつ薬 (a) およびGPCR阻害薬 (b) の濃度
横軸のハイライトされた成分は分解もしくは代謝物を示す。略称は表4.2.1参照

除去率について、valsartanやlosartan carboxylic acid (CA) はほぼ100%、losartan、desmethyl mirtazapine、atenolol、bisoprolol、trazodoneやfluvoxamineは50～100%程度の値を示した(図2.9)。しかし、分解または代謝産物であるvalsartan acidやatenolol acidの除去率は、それぞれ-500%と-150%



以下という値を示し、放流水中濃度が流入水中濃度に対し10倍以上の濃度で検出され、処理過程での生成が示唆された。抗うつ薬のtramadol、desmethyl tramadol、GPCR拮抗薬のlosartan CA、valsartan acid、metoclopramide、fexofenadine、desmethyl mirtazapine、atenolol、atenolol acidについて冬季に比較的低い除去率が確認された。今後、室内実験などを通じ、除去率に与える影響を解明する必要がある。

STP A～Gの放流水の分析結果のうち、抗うつ薬成分の分析結果を図4.2.10に示す。STP Aの放流水中の濃度組成と類似の組成にて抗うつ薬およびGPCR阻害薬成分が検出されたが、オゾン処理を行っているSTPの放流水中では比較的低濃度で検出され、塩素処理に比べオゾン処理の有効性が示された。抗うつ薬成分のduloxetineについては、2021年9月の調査以降で検出されたが、これは同調査以前にLC-MS/MSを更新したことによる感度向上に加え、同調査より追加したSTP2ヶ所のうち1ヶ所で極めて高濃度で放流していることに起因している。このような局所的な高濃度での排出源があることが確認された。

流入水中の予測濃度と、STP A～Gの放流水中の実測濃度を比較（図2.7 (b)）したところ、前述のOTC薬成分の乖離が同様に見られたものの、多くの成分で流入水に対する比較と同様、±10倍の範囲に収まった。このことは、STP B～Gにおいても除去率が低いことを示唆しているものと考えられる。OTC薬成分以外にもduloxetineと高血圧治療薬成分のirbesartanとが予測濃度から大きく乖離（図中矢印）して検出、つまり予測濃度よりも高い濃度で検出された。これらは2021年9月の調査にて追加された1ヶ所のSTPであることから、同STPの処理流域において他のSTPの処理流域とは異なる医薬品の排出または使用実態があるものと予測される。

STP A～Gの放流水中で検出された濃度と、培養細胞を用いた試験により得られた比活性値より、抗うつ薬成分のparoxetineに対する等量濃度を算出した（図2.11）。より、水生生物への影響濃度が比較的多く報告されているfluoxetineに対する等量濃度を算出した。その結果、両者に正の相関関係が確認され、乖離は1/5～5倍の範囲内であった。未同定の活性成分の存在も考えられうるが、バイオアッセイにおいては純水を用いた試験においても活性が確認されることもあり、今後更なる検討が必要だと考えられる。なお、各理論値において寄与が大きかった成分として(es)citalopram、venlafaxineの分解もしくは

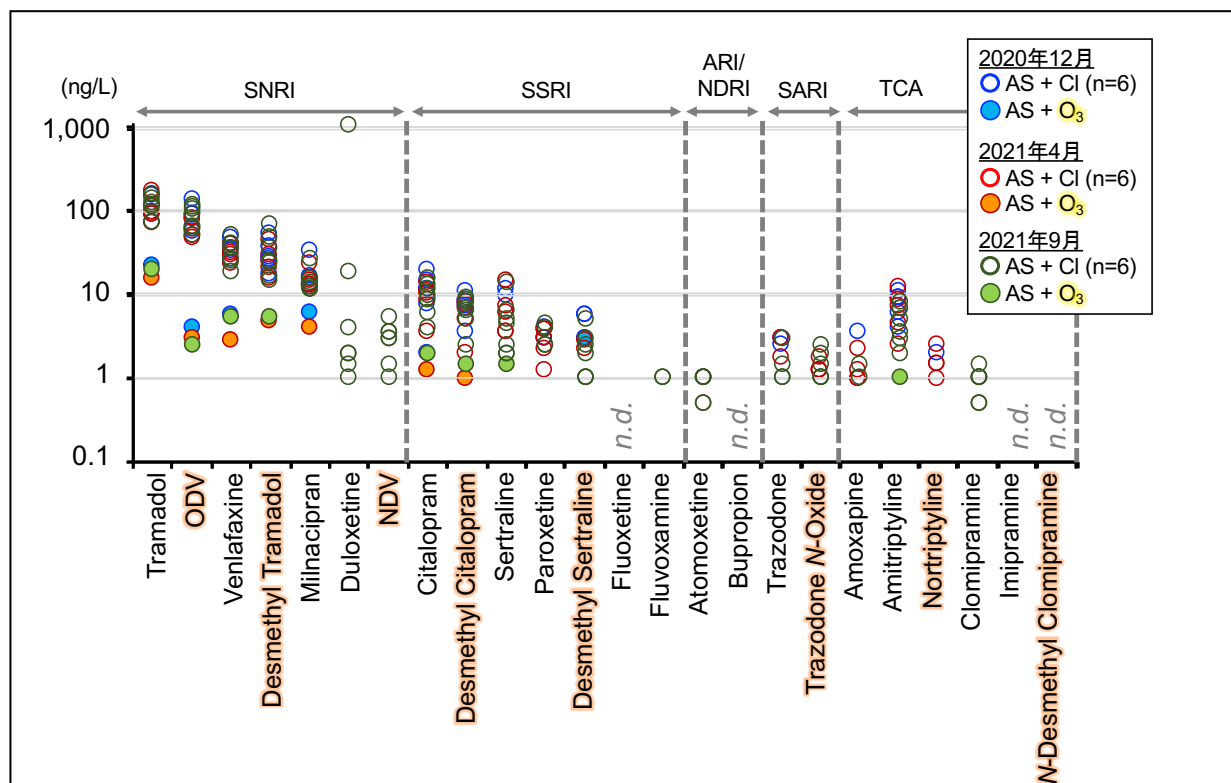


図2.10 STP A～Gの放流水中の抗うつ薬成分の濃度

横軸のハイライトされた成分は分解もしくは代謝物を示す。

AS：標準活性汚泥処理、Cl：塩素処理、O₃：オゾン処理、その他の略称は表4.2.1参照

は代謝産物のODV、duloxetine、paroxetine、sertralineなどが挙げられ、前述の予測活性値（図2.1）とも整合している。Jこれらの成分については、今後の水質モニタリングにおいて特に注視する必要があると考えられる。

5. 研究目標の達成状況

得られた成果を以下に示す。ここに示すように、当サブテーマの研究目標は達成された。

目標1：下水や環境水中の抗うつ薬/GPCR阻害薬に対するヒト受容体及び魚受容体の応答を解明する。その結果から、環境モニタリングや魚での*in vivo*曝露試験で優先して対象とすべき抗うつ薬/GPCR阻害薬を明らかにする。

- GPCR阻害薬や抗うつ薬が、ヒトの受容体だけでなく魚の受容体も阻害することを体系的に示した。医薬品と受容体の相互作用としては、ヒトよりも魚の受容体が強いつ害を受ける場合もあることが分かった。（図2.2、図2.3）
- GPCR阻害薬や抗うつ薬は、複数の受容体を阻害することを確認した。代謝物も阻害活性を保つこと、代謝によって阻害薬受容体に変化する医薬品もある。（図2.4）
- サブテーマ1での魚曝露試験での遊泳異常は、SERTを介して誘発される可能性と複数の受容体を介して誘起されている可能性が考えられる。（図2.4）
- 下水処理場放流水の受容体阻害活性は、医薬品等量値として $\mu\text{g/L}$ から mg/L に迫る強さを示した。サブテーマ1で表層遊泳の見られた医薬品の濃度に匹敵する場合もある。（図2.5）

目標2：質量分析計による環境医薬品の分析法を開発し、医薬品活性の原因である環境医薬品をつきとめ、汚染実態を把握する。

- GPCR阻害薬および抗うつ薬成分について、環境試料用の一斉分析、曝露試験試料用の単物質分析法を検討し、前者については68成分の一斉分析法を、後者については13成分に対する分析法を確立した。
- 一斉分析法を用い、近畿圏の下水処理場における流入・放流実態、そして除去実態について調査を行い、知見を集積した。（表2.1、図2.6a、図2.6b、図2.6a、図2.8）
- GPCR阻害薬および抗うつ薬成分の下水処理場への流入量は、日本国内における生産量と正の相関関係が確認されたが、OTC薬成分については比較的大きな乖離が確認されたこと、分解もしくは代謝産物はそもそも同様の比較ができないことから、実測によるモニタリングの必要性が示された。（図2.7）
- GPCR阻害薬および抗うつ薬成分の下水処理場での除去率は概して低く、一部の分解もしくは代謝産物については下水処理過程での生成も示唆された。（図2.9、図2.10）
- 放流水中で検出されたGPCR阻害薬および抗うつ薬成分の濃度から算出したparoxetine等量濃度（理論活性値）は、実測された活性値と正の相関関係が確認され、(es)citalopram、ODV、duloxetine、paroxetine、sertralineなどの比較的高い寄与が示唆された。（図2.11）

6. 引用文献

- 1) Ihara M., et al. Sci. Total Environ., 770, 14466, 2021.
- 2) Inoue A., et al. Nature Methods, 9, 1021-1029, 2012
- 3) Ihara M., et al. Environ. Sci. Technol., 49, 1903-1911, 2015
- 4) Narumiya et al. J. Hazard. Mat. 260, 305-312.
- 5) Zhang H., et al. Environ. Sci. Technol., 54, 3, 1720-1729, 2020

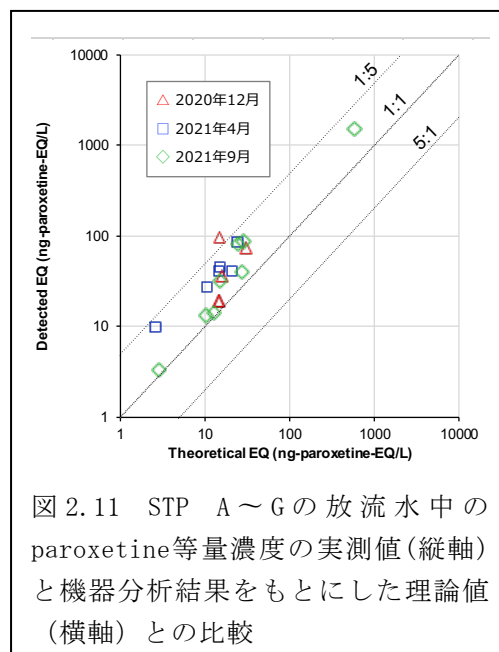


図 2.11 STP A～G の放流水中の paroxetine 等量濃度の実測値（縦軸）と機器分析結果をもとにした理論値（横軸）との比較

Ⅱ－３ 環境医薬品の標的となる魚類生体分子の同定と評価（サブテーマ３）

東京理科大学

先進工学部生命システム工学科 宮川 信一

先進工学部生命システム工学科 宮奥 香理

【要旨】

環境中に存在する医薬品由来の化学物質が、魚類をはじめとする水生動物に作用し、悪影響をおよぼすことが懸念されている。環境医薬品の魚類に対する作用機序を調べるため、生体内での標的となる分子（モノアミントランスポーターとGPCR）のクローニングと機能解析、および環境医薬品曝露によって発現が変動する遺伝子の解析をおこなった。その結果、魚類にもヒトの医薬品標的遺伝子と相同な遺伝子が存在し、さらに医薬品に対して同程度に応答することがわかった。すなわち、魚類は環境医薬品に対してヒトと同じ分子応答を示すことが示唆された。さらに、メダカとアユ成魚を用いて、医薬品曝露による遊泳行動異常とそれに関連して発現変動する遺伝子をRNAシーケンス法によって解析した。その結果、医薬品曝露による表現型に対して、概日リズム関連遺伝子の発現変動の関与を示唆する結果を得た。本研究で得られた成果は、環境医薬品が水生動物に作用したときに、どのような経路によって影響が顕れるのか、すなわちAOPを明らかにするための基盤となる。

1. 研究開発目的

自然界に存在する医薬品（環境医薬品）が、魚類をはじめとする水生動物に作用し、悪影響をおよぼすことが懸念されている。医薬品の多くはヒトの神経細胞を標的として作用することから、環境医薬品は魚類でも脳を中心とした神経中枢や神経内分泌系に影響する可能性がある。実際に、医薬品を曝露した水生生物に異常行動が報告されていることから、環境医薬品が生物に及ぼす影響のメカニズムを調べることは喫緊の課題である。環境医薬品が魚類に悪影響を及ぼす際の分子メカニズムを知るうえで、標的分子に作用するステップ（Molecular Initiating Event; MIE）の詳細を明らかにする必要がある。特に、抗うつ薬や脳神経系に作用する医薬品類の主要な標的であるモノアミントランスポーターやGタンパク質連結型受容体（G protein-coupled receptor; GPCR）について、魚類にも相同遺伝子が存在しているかどうか、また存在していた場合どの程度活性化あるいは不活性化されるのかはほとんど調べられていない。そこでサブグループ3では、水生動物に対する環境医薬品の作用機序の解明に向け、医薬品標的タンパク質の遺伝子をクローニングや機能解析実験によって整理し、環境医薬品の研究基盤を整備・構築することを目的とした。

また、環境医薬品による生物影響を理解するためには、MIEに続く分子・細胞応答を遺伝子発現の面から整理する必要がある。これにより、環境医薬品の生物影響の作用機序解明だけでなく、生体影響を迅速に検出可能なマーカー遺伝子候補を取得につながることが考えられる。そこで、環境医薬品を曝露したメダカとアユの医薬品応答遺伝子を解析し、環境医薬品のAdverse Outcome Pathway（AOP）構築のための基盤を作ることを目指した。

2. 研究目標

- 1) 環境医薬品の存在実態把握や作用機構解明に向け、魚類における医薬品応答遺伝子に関する分子基盤を整備する。
- 2) 医薬品応答遺伝子を取得し、魚類の行動・繁殖への影響を遺伝子発現の面から評価する。

3. 研究開発内容

- ・ 魚類に対する環境医薬品の研究基盤を整備するために、魚類（メダカとアユ）の医薬品の標的となり得るモノアミントランスポーター遺伝子およびGPCRをクローニングし、その活性を評価する系を構築した（サブグループ2との共同研究）。これにはメダカ（Cab系統）脳のサンプルを用いて、公共データベースに記載されている情報をもとにモノアミントランスポーター及びGPCR遺伝子のクローニングをおこなった。哺乳類細胞発現ベクター（pcDNA3.1）にサブクローニングし、各モノアミントランスポーターをHEK293細胞で発現させ、蛍光基質であるAPPの取り込みを指標として、活性測定をおこなった。アッセイ方法はⅡ-2水域における環境医薬品の汚染実態の把握（サブテーマ2）の3. 研究開発内容2）及び3）に記載した。
- ・ サブテーマ1にてメダカを4日間、ミルタザピン1 mg/L、アミトリプチリン0.1 mg/L、クロルプロマジン0.1 mg/Lに曝露し、オスとメスの脳各群3個体から抽出したRNA、アユを3.5日間mirtazapine 1 mg/Lに曝露し、脳と生殖腺から抽出したRNAを用いて、RNAシーケンス解析をおこなった（NovaSeq6000、1サンプルあたり100bpのpair end、4Gb=2000万リード）。アユについては、Trinityプログラムで遺伝子モデルを予測し、データベースを作成した。
- ・ 上記環境医薬品に応答する遺伝子の発現解析によって、メダカとアユで共通する応答遺伝子を取得した。想定される医薬品曝露による生体影響を遺伝子発現の面から評価することで、環境医薬品の曝露に対するマーカー遺伝子候補を選出するとともに、環境医薬品の生体影響に対するAOP構築を可能とする分子応答情報の一端を明らかにした。

4. 結果及び考察

1) 環境医薬品の標的となる生体分子の同定

＜モノアミントランスポーター＞

モノアミントランスポーターであるセロトニントランスポーター（SERT）、ドーパミントランスポーター（DAT）、ノルエピネフrintransポーター（NET）は神経シナプス細胞に存在する。分泌された神経伝達物質（モノアミン）はモノアミントランスポーターによって回収され、シナプス間隙から除去される。このような機能を持つことから、モノアミントランスポーターは抗うつ薬の標的となっている。そこでこれらの3つのモノアミントランスポーター遺伝子の情報を整理し、メダカとアユからその遺伝子をクローニングした。

メダカ（*Oryzias latipes*; 遺伝子のクローニングにはCab系統を使用した）から、公共データベースを利用して、モノアミントランスポーターであるセロトニントランスポーターを2分子種（それぞれのパラログをo1SERTa（XM_004075915）およびo1SERTbとした。さらにo1SERTbにはN末端側の配列が異なるスプライスバリエーションがあり、それぞれo1SERTbx1（XM_004072602）、o1SERTbx2（XM_023958472）とした）、ノルエピネフrintransポーター（o1NET; XM_004067311）とドーパミントランスポーター（o1DAT; XM_020710025）をそれぞれ1分子種取得した。このとき、プライマーはアミノ酸のコード領域に重ならないように5'-UTRまたは3'-UTRに設計し、シーケンスを行うことでアミノ酸コード部分の全長配列を決定した。その結果、o1SERTaでは18番目のアミノ酸がE→G、o1NETでは50番目、236番目、250番目のアミノ酸がそれぞれA→P、E→Q、V→Iとなっていた。o1SERTb、DATに関してはアミノ酸の変化はなかった。

一方、アユ（*Plecoglossus altivelis*）については公共データベースでは遺伝子情報の取得ができなかったため、オス及びメスの肝臓、脳、下垂体からRNAを抽出し、トランスクリプトーム（RNAシーケンス）解析を行い、Trinityプログラムを用いて遺伝子モデルを作成した。これにより、アユに任意の遺伝子の配列情報を簡便に取得できるような状況になった。そこでアユのモノアミントランスポーター遺伝子のオルソログを解析したところ、アユでもメダカ同様、SERTが2分子種（paSERTaとpaSERTb; paSERTbにスプライシングバリエーションはなかったが、paSERTaにはC末端側の配列が他の動物種とは異なるスプラ

イスバリエントが予測され、olSERTax2とした。ゼブラフィッシュのolSERTにもスプライスバリエントが存在するが、これはN末端側の配列が異なるバリエントであるため、C末端側のスプライスバリエントはアユにしかみつかっていない)、DAT、NETが1分子種存在することが明らかとなった。

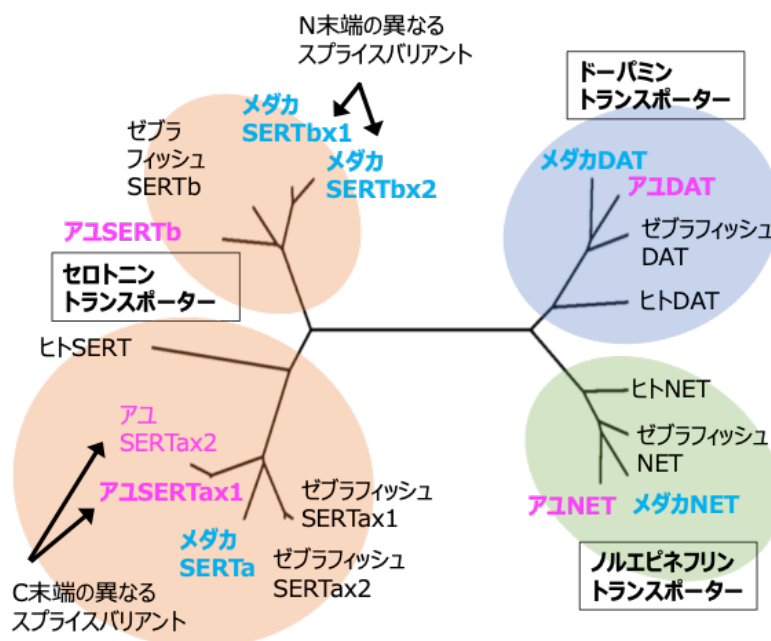


図3.1 魚類モノアミントランスポーターの分子系統樹

各遺伝子のアミノ酸配列をMEGA Xを用い、Muscleプログラムによってアラインメントした。アラインメント結果のうち、ギャップを除いた配列のみを用いて1000回の反復ブートストラップ分析を使用して、最尤法によって系統樹を作成した。太字の遺伝子を今回クローニングした。

今回取得したメダカとアユに加え、公共データベースに登録されているヒトおよびゼブラフィッシュのモノアミントランスポーター遺伝子のアミノ酸配列を用いて、最尤法による分子系統樹を作成した(図3.1)。ヒトでは、モノアミントランスポーターはそれぞれ1分子種しかない。多くの魚種でも同様にDATとNETは1分子種しか見当たらない。一方SERTは多くの魚種で2分子種存在する(SERTaおよびSERTb)。そのため、魚類のSERTは真骨魚類特異的全ゲノム重複によって生じた可能性が非常に高い。興味深いことに、ヒトのSERTは、魚類のSERTaのクレードに入ることが分かった。このことは、ヒトのSERTに構造や機能がより近い魚類のSERTは、SERTaであることが示唆される(下記の述べるように、三環系抗うつ薬が結合するアミノ酸の保存性からもこのことが示唆される)。また、メダカのSERTbには、他の魚種のSERTbとは異なるN末端配列をもつスプライスバリエント(SERTb2)が存在するが、このスプライスバリエントはメダカにしか見つかっておらず、他の魚種にも存在しない。一方で、アユではSERTaにC末端の配列が異なるスプライシングバリエントが見つかった。このように魚類のSERTは、複数のパラログに加え、魚種特異的なスプライシングバリエントも存在することから、多岐にわたる機能分化やシグナル伝達の複雑化が予想された。モノアミントランスポーターの生体内リガンドあるいは医薬品の結合部位に位置するアミノ酸の保存性について検討した⁴⁾。SERTについては、ヒトSERTにおいて三環系抗うつ薬が結合するアミノ酸が、メダカ、アユ、ゼブラフィッシュいずれの魚種のSERTaでも保存されていた(図3.2)。一方SERTbでは一部保存されていないアミノ酸が存在していた。DAT、NETについても同様に調べたところ、ドーパミンやノルエピネフリンの結合部位はいずれの動物種でも保存されていた(data not shown)。

	TM1a	TM1b	TM3
ヒトSERT (L05568)	KVDFLLSVIGYAVDLGNVWRFPYICYQ...	PIFKGIGYAICIIAFYIASYYNTIMAWALYYLI...	
メダカSERTa	KMDFLLSVIGYAVDLGNVWRFPYICYQ...	PIFKGIGFAICIIALYIAFYNTIMAWALYYLL...	
メダカSERTbx1	KMDFLLSVIGFAVDLGNVWRFPYICYQ...	PIFKGIGYAICIIALYVSFYNTIIAWALFYFY...	
メダカSERTbx2	-----CSSWETPLSGMS...	PIFKGIGYAICIIALYVSFYNTIIAWALFYFY...	
アユSERTax1	KMDFLLSVIGYAVDLGNVWRFPYICYQ...	PIFKGIGFAICIIALYIAFYNTIMAWALYYLL...	
アユSERTax2	KMDFLLSVIGYAVDLGNVWRFPYICYQ...	PIFKGIGFAICIIALYIAFYNTIMAWALYYLL...	
アユSERTb	KMDFLLSVIGFAVDLGNVWRFPYICYQ...	PIFKGIGFAICIIALYVSFYNTIIAWALFYFY...	
ゼブラフィッシュSERTa1 (NP_001035061)	KMDFLLSVIGYAVDLGNVWRFPYICYQ...	PIFKGIGFAICIIALYIAFYNTIMAWALYYLL...	
ゼブラフィッシュSERTa2 (NP_009289948)	-----	-----	
ゼブラフィッシュSERTb (NP_0011709)	KMDFLLSVIGFAVDLGNVWRFPYICYQ...	PIFKGIGFAICIIALYIAFYNTIMAWALYYLL...	

	TM6a	TM6b	TM8
ヒトSERT (L05568)	TGVWIDAAAQIFFSLGPGFCVLLAFAS...	STFFFAIIFFLMLITLGLDSTFAGLEGVITAVLDE...	
メダカSERTa	TTVWIDAAAQIFFSLGPGFCVLLAFAS...	ATFFFAIIFFLMIIMLGLDSTFAGLEGVITAVLDE...	
メダカSERTbx1	TSVWVDAAAQIFFSLGPGFCVLLALSS...	STFFFAIIFVMMISLGLDSTFGGLEAITAVLDE...	
メダカSERTbx2	TSVWVDAAAQIFFSLGPGFCVLLALSS...	STFFFAIIFVMMISLGLDSTFGGLEAITAVLDE...	
アユSERTax1	TTVWIDAAAQIFFSLGPGFCVLLAFAS...	ATFFFAIIFFLMIIMLGLDSTFAGLEGVITAVLDE...	
アユSERTax2	TTVWIDAAAQIFFSLGPGFCVLLAFAS...	ATFFFAIIFFLMIIMLGLDSTFAGLEGVITAVLDE...	
アユSERTb	TSVWVDAAAQIFFSLGPGFCVLLALSS...	STFFFAIIFVMMITLGLDSTFGGLEAITAVLDE...	
ゼブラフィッシュSERTa1 (NP_001035061)	TTVWLDAAAQIFFSLGPGFCVLLAFAS...	ATFFFAIIFFLMIIMLGLDSTFAGLEGVITAVLDE...	
ゼブラフィッシュSERTa2 (NP_009289948)	TTVWLDAAAQIFFSLGPGFCVLLAFAS...	ATFFFAIIFFLMIIMLGLDSTFAGLEGVITAVLDE...	
ゼブラフィッシュSERTb (NP_0011709)	TSVWVDAAAQIFFSLGPGFCVLLALSS...	STFFFAIIFVMMITLGLDSTFGGLEAITAVLDE...	

	TM10
ヒトSERT (L05568)	GAYVVKLLFEYATGPAVLTVALIEAVAVSWF...
メダカSERTa	GAFVVKLFEYATGPAVITVVLLEVIASWF...
メダカSERTbx1	GAYVVKLLFEFGVGSIIAVGFLEAIAVSWF...
メダカSERTbx2	GAYVVKLLFEFGVGSIIAVGFLEAIAVSWF...
アユSERTax1	GAFVVKLFEYATGPAVITVVFLEVIASWF...
アユSERTax2	GAFVVKLFEYATGPAVITVVFLEVIASWF...
アユSERTb	GAYVVKLLFEFGVGSIIAVGFLEVIASWF...
ゼブラフィッシュSERTa1 (NP_001035061)	GAFVVKLFEYATGPAVITVVFLEVIASWF...
ゼブラフィッシュSERTa2 (NP_009289948)	GAFVVKLFEYATGPAVITVVFLEVIASWF...
ゼブラフィッシュSERTb (NP_0011709)	GAYVVKLLFEFGVGSIIAIVFLEATAVSWF...

図3.2セロトニントランスポーターの三環系抗うつ薬結合部位を含む膜貫通構造のアミノ酸アラインメント

ヒト・メダカ・アユ・ゼブラフィッシュのアミノ酸アラインメントであり、青色が三環系抗うつ薬のイミプラミン結合部位をヒトで決定されていた結合部位をもとに作成した。TMは膜貫通領域を示しており、結合部位を含むtransmembrane ドメイン (TM) 1, 3, 6, 8, 10を示している。膜貫通領域はヒトの遺伝子で予測された領域から推定した。各配列のアクセッション番号を括弧内に示す。配列上の数字はヒトの配列のアミノ酸番号である。メダカは本研究でクローニングして得られた配列を使用している。ループの配列は図中では省略し、ドットで表した。ドットの数省略された配列の長さを示すものではない。

さらにサブグループ2と共同して、その活性を蛍光基質APPの取り込みを指標として測定した。その結果、o1SERTa、o1SERTb1、o1NET、o1DATはAPPを取り込むが、mSERTb2はAPPを取り込まず、スプライシングバリエーション間で活性に違いがあることがわかった (図3.3)。

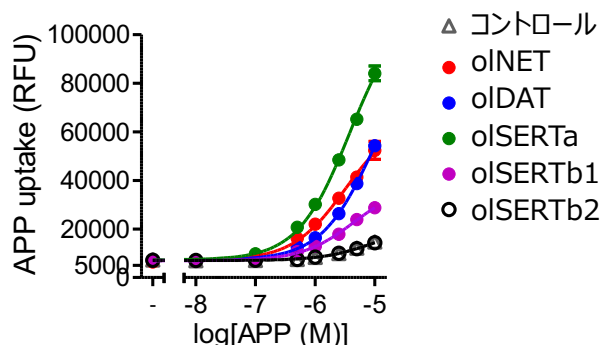
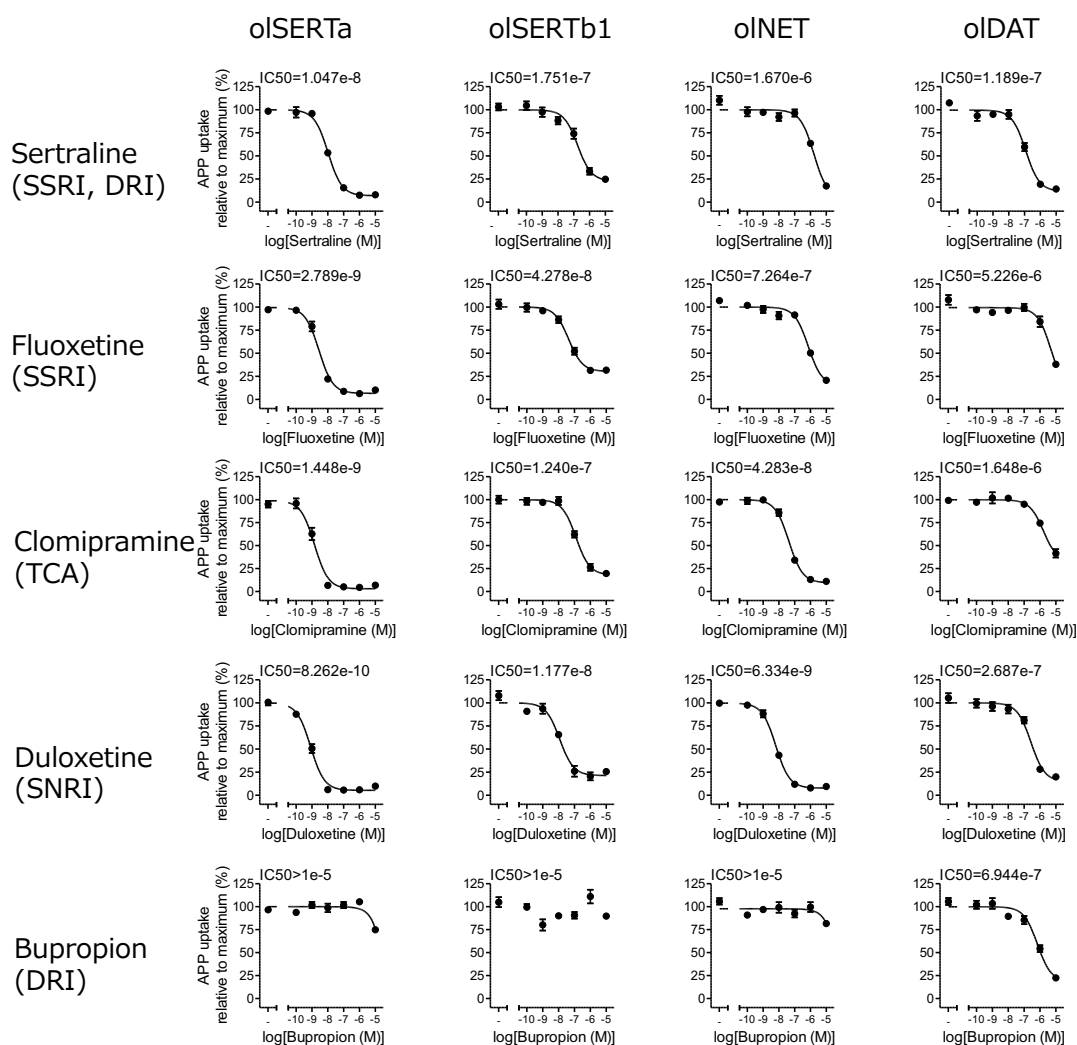


図 3.3 メダカモノアミントランスポーターの蛍光基質 APPの取り込み

各記号で示したメダカモノアミントランスポーターが蛍光気質APPを気質として取り込むかを測定した。

olSERTa、olSERTb1、olNET、olDATについて、抗うつ薬（モノアミントランスポーター阻害薬）存在下でAPPの取り込み実験をおこなったところ、olSERTa、olSERTb1、olNET、olDATはいずれも抗うつ薬存在下でAPPの取り込みが阻害されたことから、抗うつ薬の標的となりうるということが明らかとなった（図3.4）。ここで使用したSertralineは選択的セロトニン再取り込み阻害剤（Selective serotonin reuptake inhibitor; SRI）およびドーパミン再取り込み阻害剤（Dopamine reuptake inhibitor; DRI）、FluoxetineはSSRI、Clomipramineは三環系抗うつ薬（Tricyclic antidepressant; TCA）、Duloxetineはセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害剤（Serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors; SNRI）、bupropionはDRIとして用いられている。Bupropionを除く医薬品において、メダカSERTaは、メダカSERTb1、メダカNETおよびメダカDATよりも低濃度でAPPの取り込みが阻害された。olSERTaのほうがolSERT1bよりも低濃度の抗うつ薬で取り込みが阻害されることは、三環系抗うつ薬が結合するアミノ酸の保存性によって考えられる。また、olNETがduloxetineで強く阻害されることや、DATだけがbupropionで強く阻害される結果から、環境医薬品が、魚類のモノアミントランスポーターを介して作用するだけでなく、



SSRI : selective serotonin reuptake inhibitor
TCA: tricyclic antidepressant
SNRI: serotonin norepinephrine reuptake inhibitor
DRI: dopamine reuptake inhibitor

図3.4 抗うつ薬存在下でのメダカモノアミントランスポーターの蛍光基質APPの取り込み
左側に示す各抗うつ薬存在下でAPP1μMを曝露し、細胞内に取り込まれたAPPの蛍光を定量した。

モノアミントランスポーター阻害薬の標的の特性にも合致することが明らかとなった。また、アユの SERTa も医薬品類に応答することを見いだしている。

＜GPCR＞

医薬品の標的となる GPCR として、ヒスタミン受容体 (Histamine Receptor ; HR)、ドーパミン受容体 (Dopamine receptor ; DR)、アドレナリン受容体 β (beta-Adrenergic receptor ; ADRB)、ムスカリン性アセチルコリン受容体 (Muscarinic acetylcholine receptor ; CHRM) に注目した。これらの受容体にはさまざまなサブタイプがあるが、環境河川中で検出される医薬品成分によって活性化されるヒトの GPCR サブタイプ (HRH1、DRD2、ADRB1、CHRM1) について⁵⁾、魚類でもそのパラログが存在するか調べることにした。ヒトの HRH1、DRD2、ADRB1、CHRM1 を BLAST 検索したところ、NCBI のデータベースにはメダカの予測配列として、1 種類の HRH1 (XM_011474840)、2 種類の DRD2 [DRD2 (XM_004075413) および DRD2-like (NM_001305417)]、1 種類の ADRB1 (XM_004080245)、1 種類の CHRM1-like (XM_023949805) が登録されていた。しかし、ヒト CHRM1 と一番類似性が高いメダカの CHRM サブタイプは、CHRM1-like ではなく CHRM5a (XM_023952900) であった。

一方、上記配列をアユの遺伝子モデルにおいて BLAST 検索すると、ヒト HRH1 に最も類似性が高い遺伝子アユの HRH は HRH3 であった。また、DRD2 は、メダカでは 2 つのサブタイプ (DRD2 と DRD2-like) があつたがアユには 1 種類 (DRD2) しか予測されていないかつた。ADRB1 は 1 種類予測されていた。ヒト CHRM1 と一番類似性が高いメダカの CHRM サブタイプは CHRM5b であった。しかしアユの CHRM5b は、遺伝子モデルによる遺伝子配列予測が不十分であるため全長の情報を取得することはできなかった。

トランスポーター遺伝子同様に、メダカから HRH1、DRD2、DRD2-like、ADRB1、CHRM5a 遺伝子およびアユから HRH3、ADRB1、DRD2 をクローニングし、配列を決定した。これらの情報をもとに、GPCR 遺伝子の分子系統樹を作成した (図 3.5)。今回クローニングした遺伝子はすべてヒトの HRH1、DRD2L、ADRB1、CHRM5 と同じクレードに属していた。また、すべての遺伝子において内在性リガンドの結合部位が保存されていたことから、これらの GPCR は魚類においてもヒトと類似の受容体として働いている可能性が高いと考えられる。一方で、GPCR 遺伝子はモノアミントランスポーター遺伝子と比べて、魚種間で遺伝子の構成が変わっているものが多い。例えばアレルギー治療薬の主要な標的となるヒトの HRH1 は、メダカにはオルソログが存在するが、アユでは見つかっていない (我々が作成した遺伝子モデルが不十分である可能性もある)。また、今回調べた GPCR の多くは、真骨魚類特異的全ゲノム重複によって生じたと見られる遺伝子が失われずに、2 つのパラログとして存在しているものも多い。これらのパラログ間では、機能分化が大きく進んでいることが予想される。これらのことが魚類の GPCR の研究を複雑化させている。いずれにしてもメダカやアユの HRH (アユでは HRH1 に配列に近い HRH3 を使用した) は、GPCR 阻害薬により活性が阻害されるが (サブグループ 2 の項を参照)、生体内での役割については今後さらに解析が必要である。

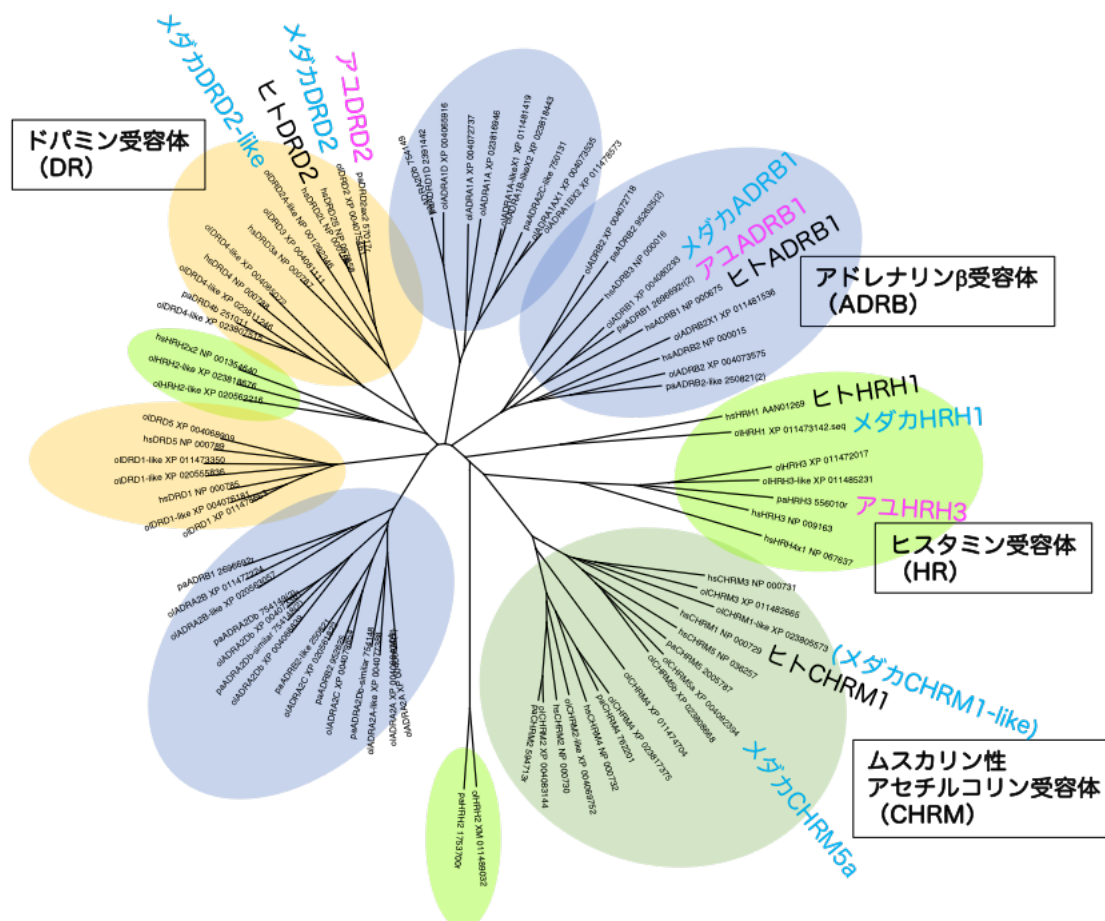


図3.5 魚類GPCR遺伝子の分子系統樹

GPCRのアドレナリン受容体、ヒスタミン受容体、ドーパミン受容体、ムスカリン性アセチルコリン受容体の系統樹を示す。分子系統樹の作成方法は図3.1と同じである。ヒト、メダカ、アユの遺伝子を用いて作成した。

2) 環境医薬品に応答する遺伝子の同定と評価

サブグループ1により、環境中に実際に検出される医薬品成分を実験的にメダカやアユに曝露すると、表層遊泳などの行動異常が引き起こされることがわかった(サブグループ1の項を参照)。そこでサブグループ3では、医薬品によって引き起こされる魚類の行動異常の作用機序解明のために、メダカ(*Oryzias latipes*, NIES系統)とアユの雌雄それぞれの全脳における遺伝子発現プロファイルを解析した。曝露実験は、メダカあるいはアユにおいて行動異常を顕著に示す条件でおこなった。具体的には、メダカ(*Oryzias latipes*, NIES系統)を4日間、NaSSA(Noradrenergic and specific serotonergic antidepressant)であるミルタザピン1mg/L、三環系抗うつ薬であるアミトリプチン0.1mg/L、抗精神病薬であるクロルプロマジン0.1mg/Lに曝露し、オスとメスの脳各群3個体分から抽出したRNA、およびアユをミルタザピン1mg/Lを曝露(3.5日間、水流式で1日1回、50%換水)し、脳と生殖腺から抽出したRNAを用いてRNAシーケンス解析をおこなった(シーケンスはNovaSeq6000、1サンプルあたり100bpのpair end、4Gb=2000万リードの条件で、マクロジェンジャパン社でおこなわれた)。

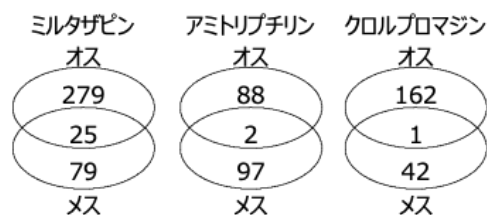
メダカにミルタザピン、アミトリプチン、クロルプロマジンを表層遊泳する条件で曝露した群と、溶媒として使用したDMSOのみを曝露したコントロール群と比べ、ミルタザピン曝露群で発現が上昇した遺伝子数は、オスとメスそれぞれ304個と104個(そのうち共通するのは25個)、アミトリプチン曝露群では90個と99個(そのうち共通するのは2個)、クロルプロマジン曝露群では163個と43個(そのうち共通するのは1個)であった(図3.6a)。一方、発現が減少する遺伝子は、ミルタザピン曝露群では283個と

68個（そのうち共通するのは7個）、アミトリプチン曝露群では161個と158個（そのうち共通するのは39個）、クロロプロマジン曝露群では320個と60個（そのうち共通するのは13個）であった（図3.6a）。また、メスとオスで発現量の増減が反対になっていた遺伝子は、ミルタザピン曝露群では2個、アミトリプチン曝露群では1個、クロロプロマジン曝露群では2個あった。

また、3つの医薬品で共通して発現変動する遺伝子を調べたところ、発現が上昇する遺伝子はオスとメスでそれぞれ6個と5個、発現が減少する遺伝子はオスとメスでそれぞれ2個と3個であり、いずれも雌雄で共通して発現変動する遺伝子はなかった（図3.6b）。これらの遺伝子を表3.1に示した。雌雄を分けずに医薬品の違いのみで遺伝子の発現変動を整理すると、発現が上昇した遺伝子数は、ミルタザピン曝露群では383個、アミトリプチン曝露群では187個、クロロプロマジン曝露群では205個であり、3つの医薬品で共通して発現変動する遺伝子は12個であった。一方、発現が減少する遺伝子は、ミルタザピン曝露群では344個、アミトリプチン曝露群では279個、クロロプロマジン曝露群では367個であり、3つの医薬品で共通して発現変動している遺伝子は6個であった（図3.6b）。

アユにおいて遊泳行動の低下がみられた濃度でミルタザピンを曝露した群において、コントロール（DMSO）群と比べ、ミルタザピン曝露群で発現が上昇した遺伝子数は、オスとメスそれぞれ306個と976個（そのうち共通する遺伝子は155個）、減少した遺伝子数は、232個と3147個（そのうち共通する遺伝子は167個）であった（図3.7）。また、メスとオスで発現の増減が反対になっていた遺伝子は、2個であった。メスのアユは、解剖時の卵巣の観察から、排卵前（1個体）、排卵前後（1個体）、産卵後（2個体）の個体であった。したがってメスで発現変動遺伝子が多いのは、繁殖段階の異なる個体を使用したことによる可能性がある。

医薬品で発現が増加する遺伝子数



医薬品で発現が減少する遺伝子数

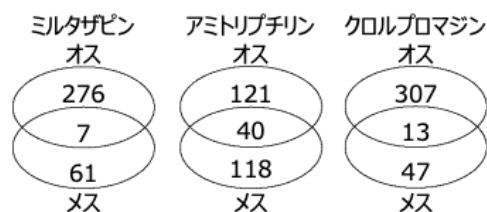


図3.6a 医薬品曝露によってメダカ脳で発現変動する遺伝子数
メダカ（NIES系統）への医薬品曝露はサブグループ1で実施された。メダカ（NIES系統）を各処理ごとにメス3匹、オス3匹ずつ4日間医薬品に曝露し、コントロールには溶媒として用いたDMSOを0.01%になるように飼育水に添加している。発現変動した遺伝子は、 $p\text{-adj} < 0.05$ を指標としている。

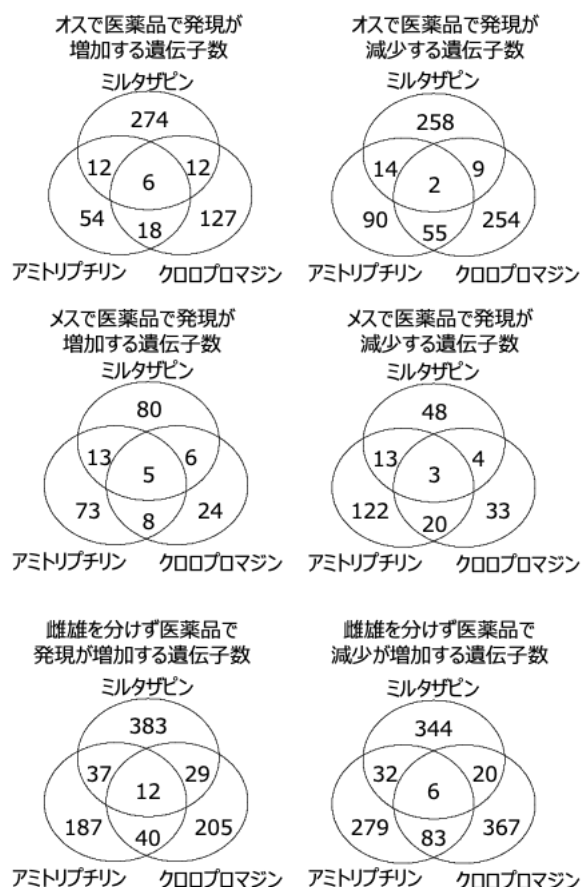
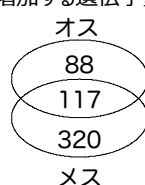


図3.6b 医薬品曝露によって共通してメダカ脳で発現変動する遺伝子数
発現変動した遺伝子は、 $p\text{-adj} < 0.05$ を指標としている。

表3.1 メダカ脳における3医薬品共通薬剤変動遺伝子

Id	group	Gene name	Gene description
ENSORLT00000029669.1	メスで増加	-	uncharacterized LOC101168761 [Source:NCBI gene;Acc:101168761]
ENSORLT00000029203.1	メスで増加	-	uncharacterized LOC101168761 [Source:NCBI gene;Acc:101168761]
ENSORLT00000038742.1	メスで増加	-	uncharacterized LOC101168761 [Source:NCBI gene;Acc:101168761]
ENSORLT00000025306.2	メスで増加	srp72	signal recognition particle 72 [Source:NCBI gene;Acc:101159318]
ENSORLT00000042595.1	メスで増加	-	basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein [Source:NCBI gene;Acc:101156714]
ENSORLT00000004704.2	メスで減少	-	T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1 homolog [Source:NCBI gene;Acc:101175459]
ENSORLT00000036583.1	メスで減少	-	zinc finger and SCAN domain-containing protein 2 [Source:NCBI gene;Acc:101162247]
ENSORLT00000015508.2	メスで減少	-	zinc finger protein 709 [Source:NCBI gene;Acc:101159715]
ENSORLT00000027574.1	オスで増加	-	liprin-alpha-1 [Source:NCBI gene;Acc:101157600]
ENSORLT00000017440.2	オスで増加	zgc:91860	KIAA0513 ortholog [Source:NCBI gene;Acc:101158761]
ENSORLT00000019644.2	オスで増加	smad2	mothers against decapentaplegic homolog 2 [Source:NCBI gene;Acc:101159109]
ENSORLT00000029189.1	オスで増加	cdh26.1	cadherin-like protein 26 [Source:NCBI gene;Acc:101174102]
ENSORLT00000010775.2	オスで増加	RFX7	regulatory factor X7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:25777]
ENSORLT00000020992.2	オスで増加	tanc1b	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1 [Source:NCBI gene;Acc:101174235]
ENSORLT00000029300.1	オスで減少	zgc:153901	formimidoyltransferase-cyclodeaminase [Source:NCBI gene;Acc:101162880]
ENSORLT00000043828.1	オスで減少	cry3a	cryptochrome-1 [Source:NCBI gene;Acc:101164536]

ミルタザピンで発現が増加する遺伝子数



ミルタザピンで発現が減少する遺伝子数

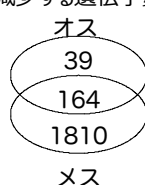
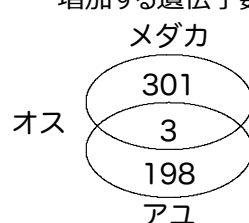


図3.7 ミルタザピン曝露によってアユ脳で発現変動する遺伝子数
アユの医薬品曝露は、サブグループ1で実施された。性成熟に達していると推察される体長15 cm以上のアユのオス4匹・メス4匹を3.5日間ミルタザピンを曝露した。ミルタザピン曝露個体のメスのアユは1個体が排卵前、1個体がアユは排卵途上、2個体が産卵後であった。発現変動した遺伝子は、 $p\text{-adj} < 0.05$ を指標としている。

ミルタザピンを曝露したメダカとアユの全脳で共通して発現変動した遺伝子を探索した。その結果、コントロール群と比べ、ミルタザピン曝露群でメダカ及びアユともに発現が上昇した遺伝子は、オスとメスそれぞれ3個と2個、減少した遺伝子は、11個と7個であった(図3.8, 表3.2)。オスとメスで共通して発現変動した遺伝子はなかった。

メスのミルタザピン曝露群で発現が減少する遺伝子として、生体の概日リズムを制御する時計遺伝子の中心の一つであるAryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1a (Arntla)

ミルタザピンで発現が増加する遺伝子数



ミルタザピンで発現が減少する遺伝子数

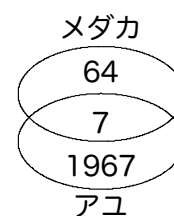
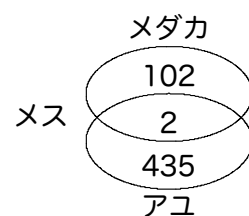
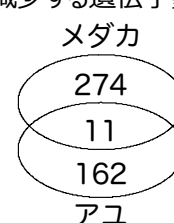


図3.8 ミルタザピン曝露によってアユとメダカの脳で共通して発現変動する遺伝子数

ミルタザピンを曝露したメダカとアユの脳で発現変動した遺伝子数を示す。表3.2と遺伝子の数が異なるのは、一つの遺伝子に複数のidがついていることがあるためである。

(Brain and muscle Arnt-like 1 ; Bmal1とも呼ばれる) が含まれていた (表3.2)。そこで、時計遺伝子あるいは概日リズムに関連する遺伝子群に注目した。メダカではミルタザピンで27個、アミトリプチンで20個、クロルプロマジンで23個の概日リズム関連遺伝子が発現変化していた (表3.3)。このうち3つの医薬品で共通して発現変動していた遺伝子は3個であった (表3.4)。またアユで発現変動していた遺伝子を調べたところ、25個の概日リズム関連遺伝子が発現変動していた。このなかで、発現が増加していたのは4個のみで、他の遺伝子は発現が減少していた (表3.5)。また、雌雄で共通して発現変動していた遺伝子は3個であった (表3.6)。なお、これらの概日リズム関連遺伝子はKyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) のcircadian rhythmとして記載されている遺伝子、あるいはGene Cards (<https://www.genecards.org/>) でcircadian geneとしてヒットした遺伝子である。

表3.2 メダカとアユの脳でミルタザピン曝露に対して共通して発現変動する遺伝子

Id	group	Gene name	Gene description
ENSORLT00000003085.2	オスで増加	mibp2	nicotinamide riboside kinase 2 [Source:NCBI gene;Acc:101172800]
ENSORLT00000005219.2	オスで増加	tfpi2	tissue factor pathway inhibitor 2 [Source:NCBI gene;Acc:101174930]
ENSORLT00000013491.2	オスで増加	ccn1	cellular communication network factor 1 [Source:NCBI gene;Acc:101157527]
ENSORLT00000021655.2	オスで減少	hmgcra	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase [Source:NCBI gene;Acc:100125499]
ENSORLT00000003981.2	オスで減少	splea	squalene epoxidase [Source:NCBI gene;Acc:101165835]
ENSORLT00000007527.2	オスで減少	ugt8	UDP glycosyltransferase 8 [Source:NCBI gene;Acc:101156303]
ENSORLT00000044358.1	オスで減少	jarid2b	jumonji and AT-rich interaction domain containing 2 [Source:NCBI gene;Acc:101164075]
ENSORLT00000006190.2	オスで減少	pcdh7a	protocadherin-7-like [Source:NCBI gene;Acc:101167176]
ENSORLT00000047079.1	オスで減少	-	scratch family transcriptional repressor 1 [Source:NCBI gene;Acc:101167481]
ENSORLT00000043300.1	オスで減少	apbb1	amyloid beta precursor protein binding family B member 1 [Source:NCBI gene;Acc:101159765]
ENSORLT00000012106.2	オスで減少	PLCB4	phospholipase C beta 4 [Source:NCBI gene;Acc:100049535]
ENSORLT00000032233.1	オスで減少	-	calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3 [Source:NCBI gene;Acc:101159169]
ENSORLT00000017736.2	メスで増加	tefb	thyrotroph embryonic factor [Source:NCBI gene;Acc:101172818]
ENSORLT00000037431.1	メスで増加	ralyl	[Source:NCBI gene;Acc:101165260]
ENSORLT00000010007.2	メスで減少	msmo1	methylsterol monooxygenase 1 [Source:NCBI gene;Acc:105354476]
ENSORLT00000015112.2	メスで減少	slc1a2b	solute carrier family 1 member 2 [Source:NCBI gene;Acc:101170755]
ENSORLT00000030959.1	メスで減少	dis3l2	DIS3 like 3'-5' exoribonuclease 2 [Source:NCBI gene;Acc:101169734]
ENSORLT00000024121.2	メスで減少	arntl1a	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1 [Source:NCBI gene;Acc:101159313]

時計遺伝子は階層的な構造を持ち、中枢時計遺伝子と末梢時計遺伝子に分類される。中枢時計遺伝子は脳の視床下部にある視交叉上核で生物の概日リズムを制御している。メダカで発現変動した42個の概日リズム関連遺伝子のうち、23個が中枢時計遺伝子に関連する遺伝子であり、これは医薬品に応答して発現変動した遺伝子の半数にあたる。特に本解析では、概日リズムの開始及び維持の中心であるClockおよびArntl1aが医薬品曝露の影響を受けて発現変動する遺伝子として得られた。哺乳類では、BMAL1はPASドメインを介してCLOCK (もしくはCLOCKのパラログのであるNeuronal PAS domain protein 2 ; NPAS2、本研究ではNpas2もミルタザピンを曝露したアユのメスで顕著に発現量が減少していた) とヘテロ二量体を形成し、Period (per) およびCryptochrome (Cry) 遺伝子の転写を活性化する。PERとCRYタンパク質はPASモチーフを介して相互作用し、核内に移行してCLOCK-BMAL1ヘテロ二量体の転写活性を阻害する。その後、PERとCRYタンパク質は分解され、再びCLOCK-BMAL1の転写が再開される。このような転写翻訳の

ネガティブフィードバックが生物の概日リズムを形成し、正常な分子リズムを生成する。ノックアウトマウスの研究では、Bmal1遺伝子はそのパラログであるBmal2遺伝子との機能的な冗長性があるものの、体内時計の異常のみならず運動量の低下や生殖異常が報告されている^{6), 7)}。ヒトのうつ病では、症状の日内変動や睡眠-覚醒サイクルの障害など、概日リズムと関連した症状がみられることから、概日リズムの不全がその病因や症状の発現に関連していることが指摘される。

以上のことから、魚類では医薬品曝露により中心神経系における概日リズムがかく乱されることにより、行動異常などが顕れた可能性が考えられる。

表3.3 発現変化した時計遺伝子の各医薬品の発現増減の比較

transcript stable ID	Gene name	Mirtazapine				Amitriptyline				Chlorpromazine			
		Male		Female		Male		Female		Male		Female	
		log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj
ENSORLT00000032742	-	1.11	3.5E-10	1.23	8.0E-05	-1.23	8.3E-09	-1.05	4.5E-02	-0.63	1.7E-04		
ENSORLT00000046535	-	0.75	2.2E-05	0.62	9.0E-08			-0.73	1.9E-06	-0.44	2.3E-02		
ENSORLT00000022795	-	-2.72	3.5E-02										
ENSORLT00000024121	<i>arntl1a</i>	-0.80	2.5E-03	-0.78	7.8E-03								
ENSORLT00000014278	<i>bhlhe41</i>	0.96	3.8E-12	0.79	3.2E-11	-0.69	2.9E-05	-0.98	6.4E-09	-0.34	3.5E-03	-0.70	1.5E-02
ENSORLT00000029641	<i>carm1</i>									-0.39	3.5E-03		
ENSORLT00000003302	<i>ciarta</i>	1.57	6.1E-11	0.91	8.5E-19	-1.02	6.6E-05	-1.93	1.7E-17	-0.71	8.6E-05	-1.03	6.9E-11
ENSORLT00000031388	<i>cipcb</i>	0.46	2.2E-02	0.52	2.0E-02								
ENSORLT00000005660	<i>clockb</i>	-0.28	2.3E-03										
ENSORLT00000043215	<i>cry1a</i>					-0.37	3.6E-06	-0.61	2.8E-05	-0.35	2.3E-03		
ENSORLT00000020543	<i>cry1a</i>					-0.48	1.3E-08			-0.42	2.1E-02		
ENSORLT00000020515	<i>cry1b</i>	0.83	2.8E-03	1.03	3.2E-08			-0.70	3.6E-02	-0.62	1.4E-02		
ENSORLT00000018431	<i>cry2</i>									-0.23	3.6E-03		
ENSORLT00000035456	<i>cry3a</i>			-0.42	4.6E-02								
ENSORLT00000043828	<i>cry3a</i>	-1.43	2.0E-03			-0.62	3.2E-02			-1.13	3.6E-04		
ENSORLT00000021578	<i>csnk1db</i>									-0.22	8.9E-03		
ENSORLT00000019707	<i>ctss2.1</i>	1.08	1.5E-07	1.06	2.7E-03								
ENSORLT00000021716	<i>fdft1</i>	-0.89	4.4E-02										
ENSORLT00000019408	<i>hsf2</i>	0.67	2.3E-07	0.50	2.0E-04	-0.78	8.5E-09	-1.05	2.0E-11	-0.56	1.4E-05		
ENSORLT00000013401	<i>klf9</i>	1.35	4.6E-04										
ENSORLT00000012901	<i>LOC101157319</i>	1.12	1.1E-27	1.02	9.4E-06	-1.00	5.5E-12	-1.28	2.0E-17	-0.41	7.4E-04	-0.75	6.7E-05
ENSORLT00000027108	<i>MEF2D</i>	0.34	2.1E-02										
ENSORLT00000037268	<i>mef2d</i>							0.53	1.8E-02				
ENSORLT00000010165	<i>ncoa2</i>									-0.30	1.8E-03		
ENSORLT00000034662	<i>ncoa6</i>	-0.67	3.0E-02										
ENSORLT00000020639	<i>nfil3-6</i>					-0.85	2.5E-10	-0.93	3.4E-17	-0.68	2.6E-07	-0.50	2.5E-02
ENSORLT00000027644	<i>npas2</i>			-0.72	3.5E-02								
ENSORLT00000002492	<i>npas4a</i>					-0.76	3.8E-18	-1.32	8.4E-20	-0.50	1.1E-03	-0.77	2.7E-02
ENSORLT00000020575	<i>nr1d2a</i>	0.77	1.7E-07	0.49	2.2E-03	-1.37	3.6E-11	-1.47	2.1E-20	-1.03	1.7E-13		
ENSORLT00000019275	<i>nr1d4b</i>	0.54	8.0E-03										
ENSORLT00000008704	<i>per1</i>	0.97	4.5E-12	0.82	7.4E-03	-0.58	2.4E-04			-0.32	8.8E-03		
ENSORLT00000019353	<i>PER2</i>					-0.93	1.4E-13			-0.62	6.0E-10		
ENSORLT00000035331	<i>per2</i>	10.50	5.8E-13			9.42	9.7E-11						
ENSORLT00000020794	<i>per2</i>					-1.28	3.7E-09	-1.67	9.6E-08	-1.04	1.2E-21	-1.21	3.3E-02
ENSORLT00000033367	<i>per2</i>					-4.10	1.3E-17			-1.20	4.9E-02		
ENSORLT00000040967	<i>per3</i>											-2.60	1.8E-03
ENSORLT00000019969	<i>per3</i>					-0.52	3.1E-05	-0.71	4.2E-02				
ENSORLT00000012106	<i>PLCB4</i>	-0.37	3.5E-02										
ENSORLT00000016747	<i>PPP1CB</i>	0.14	2.3E-02										
ENSORLT00000043073	<i>ptprea</i>	1.13	1.3E-02										
ENSORLT00000017736	<i>tefb</i>	1.08	1.5E-07	1.06	2.7E-03								
ENSORLT00000018615	<i>ywhae2</i>									-0.29	1.2E-03		

ミルタザピン・アミトリプチン・クロルプロマジンが曝露された個体で発現変動していた時計遺伝子のTranscript ID、Gene name、log2FoldChange、padjを示した。行が同一の遺伝子は共通の遺伝子である。また、赤で示した遺伝子は発現が増加し、青で示した遺伝子は発現が減少していた。なお、遺伝子名が重複している遺伝子は、Transcript stable IDが異なるものである。

表3.4メダカにおいて3つの医薬品共通で発現変動した時計遺伝子

transcript stable ID	Gene name	Mirtazapine				Amitriptyline				Chlorpromazine			
		Male		Female		Male		Female		Male		Female	
		log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj
ENSORLT00000012901	<i>LOC101157319</i>	1.12	1.1E-27	1.02	9.4E-06	-1.00	5.5E-12	-1.28	2.0E-17	-0.41	7.4E-04	-0.75	6.7E-05
ENSORLT00000014278	<i>bhlhe41</i>	0.96	3.8E-12	0.79	3.2E-11	-0.69	2.9E-05	-0.98	6.4E-09	-0.34	3.5E-03	-0.70	1.5E-02
ENSORLT00000003302	<i>ciarta</i>	1.57	6.1E-11	0.91	8.5E-19	-1.02	6.6E-05	-1.93	1.7E-17	-0.71	8.6E-05	-1.03	6.9E-11

表3.5アユのミルタザピン曝露個体で発現変化した時計遺伝子の発現増減の比較

transcript stable ID	Gene name	Male		Female	
		log2FC	padj	log2FC	padj
ENSORLT00000018110	-	-0.548	0.003642		
ENSORLT00000001355	<i>acads</i>	-0.467	0.0262807		
ENSORLT00000002027	<i>ARHGD1A</i>			1.018	0.0363098
ENSORLT000000024121	<i>arntl1a</i>	-0.478	0.0350403		
ENSORLT000000044834	<i>bag5</i>	-0.508	0.0231959		
ENSORLT000000031190	<i>cry5</i>	-0.567	0.0124419		
ENSORLT000000027476	<i>csnk1a1</i>	-0.392	0.0271715		
ENSORLT000000020806	<i>dlst</i>	-0.436	0.041469		
ENSORLT000000021715	<i>fdft1</i>	-1.41	3.627E-10	-0.862	0.0084039
ENSORLT000000002492	<i>npas4a</i>	-0.919	0.0475562		
ENSORLT000000041753	<i>opn4xb</i>			-2.048	0.0400228
ENSORLT000000012106	<i>PLCB4</i>			-0.595	0.0484267
ENSORLT000000016747	<i>PPP1CB</i>	-0.498	0.007636		
ENSORLT000000022596	<i>ppp2r5ea</i>	-0.373	0.0417589		
ENSORLT000000004397	<i>prkceb</i>	-0.476	0.0417656		
ENSORLT000000040824	<i>rps6kl1</i>	-0.476	0.0079775	-0.705	0.0279655
ENSORLT000000013134	<i>serpine1</i>	3.258	0.0156382	3.202	0.0259365
ENSORLT000000046654	<i>slc41a1</i>	-0.519	0.0062454		
ENSORLT000000012112	<i>sppl3</i>	-0.448	0.0406234		
ENSORLT000000011833	<i>srebfl</i>	-0.755	4.295E-06		
ENSORLT000000017736	<i>tefb</i>	0.873	0.0381511		
ENSORLT000000041306	<i>tfap2e</i>	-0.921	0.0097192		
ENSORLT000000019872	<i>tfef</i>	-0.555	0.0090329		
ENSORLT000000003378	<i>yap1</i>	0.861	0.0484326		
ENSORLT000000018615	<i>ywhae2</i>	-0.504	0.0049053		

表3.6アユにおいて雌雄共通で発現変動した時計遺伝子

transcript stable ID	Gene name	Male		Female	
		log2FC	padj	log2FC	padj
ENSORLT000000021715	<i>fdft1</i>	-1.41	3.6267E-10	-0.862	0.008403904
ENSORLT000000040824	<i>rps6kl1</i>	-0.476	0.0079775	-0.705	0.027965461
ENSORLT000000013134	<i>serpine1</i>	3.258	0.01563821	3.202	0.025936453

メダカにおいて、3種類の医薬品間で共通して発現変動している遺伝子の探索をおこなったところ、ミルタザピン・アミトリプチン・クロルプロマジン曝露で共通して発現量が増加あるいは減少していた

概日リズム関連遺伝子は見出せなかった。すなわち、ミルタザピン、アミトリプチン、クロルプロマジン
の3つの医薬品それぞれで発現プロファイルは異なっていた。興味深いことに、ミルタザピンと、アミ
トリプチンあるいはクロルプロマジンでは発現の増減が逆になっている遺伝子が多くみられた。遺伝子
発現レベルでは概日リズムのかく乱がおきていることが推測されるが、“どのようにかく乱されてい
るか”を今後調べる必要がある。一方で、発現変化の増減パターンを考慮せずに3つの医薬品で共通して
顕著に発現変化していた概日リズム関連遺伝子を探索したところ、3個の遺伝子を見出した。これらは、
医薬品曝露のマーカー遺伝子の候補となる可能性がある。なお、マウスでも向精神薬（抗うつ薬や精神
刺激薬）を投与すると時計遺伝子の発現が変化し、その発現パターンは、医薬品の種類や投与の頻度、
供試した脳領域により異なる⁸⁾。

アユでもミルタザピン曝露により多くの概日リズム関連遺伝子の発現が変化した。特に、雌雄で共通
して発現変化していた3個の概日リズム関連遺伝子のひとつであるSerppine1遺伝子はReactomeデータベ
ースの”BMAL1:CLOCK,NPAS2 activates circadian gene expression”の反応経路の構成因子であること
から、中枢時計遺伝子の影響がみてとれる。アユに加え、マウス、ゴールデンハムスターやゼブラフ
ィッシュでも医薬品成分である化学物質曝露によって時計関連遺伝子の発現変化が報告されている<sup>9)・
10)・11)</sup>。そのため、医薬品の影響で時計関連遺伝子の発現がかく乱されることは脊椎動物で共通している
可能性がある。環境医薬品の影響を迅速に評価するマーカー遺伝子としては、医薬品による概日リズム
関連遺伝子の発現変化が、行動異常の検出よりも低濃度の医薬品曝露によって誘導される必要がある。
そのため、今後遺伝子発現と行動異常に関連する曝露濃度を調べる必要がある。

5. 研究目標の達成状況

目標1：環境医薬品の存在実態把握や作用機構解明に向け、魚類における医薬品応答遺伝子に関する
分子基盤を整備する。

- メダカおよびアユから環境医薬品の標的となるモノアミントランスポーターおよびGPCRの遺伝子情報
を整理するとともに、遺伝子をクローニングしてその活性を評価する系を構築した（サブグループ2と
の共同研究）。その結果、魚類にもヒトの医薬品標的遺伝子に相同な遺伝子が存在し、さらに医薬品に
対してヒトのタンパク質と同程度に応答することがわかった。すなわち、魚類は環境医薬品に対して
ヒトと同じ分子応答を示すことが示唆された。（図3.2、図3.3、図3.4）
- 幅広い動物種に対する環境医薬品の影響評価することが生態系の保全のために重要である。アユの遺
伝子モデルを作成したことにより、任意の遺伝子を迅速にクローニングし、評価系を構築することが
できるようになった。また、他の魚種と遺伝子構成を比較することで、医薬品応答に対する種間差を議
論することができるようになった。（図3.1、図3.5）

目標2：医薬品応答遺伝子を取得し、魚類の行動・繁殖への影響を遺伝子発現の面から評価する。

- 医薬品を曝露したメダカおよびアユの遺伝子発現解析をおこなった。メダカにおいて、ミルタザピン、
アミトリプチン、クロルプロマジンのすべての薬剤に共通して応答する遺伝子として16遺伝子取得
できた。また、曝露方法は異なるものの、メダカとアユで両方の魚種でミルタザピンに応答して発現が
変動する遺伝子として23遺伝子取得した。これらはそれぞれ、薬剤の種類によらず行動異常時に誘導
される遺伝子、種をこえてミルタザピンに共通して発現が変動する遺伝子である。魚種を問わず、医薬
品曝露によって特徴的に発現変動する遺伝子が特定できれば、その遺伝子の発現を調べるだけで、悪
影響が見え始める前に医薬品曝露が起きているかどうかわかる可能性があるため、医薬品曝露の遺伝
子マーカーとしても期待できる（図3.6a、図3.6b、図3.7、図3.8、表3.1、表3.2）。また、中枢時計分
子のひとつであるArntl/Bmal1を含んだ概日リズム関連遺伝子の発現が数多く変動することを見いだ
した。すなわち、医薬品曝露による表現型と概日リズム関連遺伝子の発現変動との関連を示唆する結
果であり、医薬品曝露による行動異常と分子・細胞・個体応答をつなぐキーイベントの一つであると推
測される（表3.3、表3.4、表3.5、表3.6）。

以上のように本研究により、環境医薬品が水生動物に作用したときに、どのような経路によって影響が顕れるのか、すなわち分子応答メカニズムおよびAOPを明らかにするための基盤構築に貢献する成果が得られた。

6. 引用文献

- 1) Valenti TW, Gould GG, Berninger JP, Connors KA, Keele NB, Prosser KN, Brooks BW. Environ Sci Technol. 46:2427-3245, 2012.
- 2) Berninger JP, Du B, Connors KA, Eytcheson SA, Kolkmeier MA, Prosser KN, Valenti TW Jr, Chambliss CK, Brooks BW. Environ Toxicol Chem. 30:2065-2072, 2011
- 3) Fong PP, Huminski PT, D'Urso LM. J Exp Zool. 280:260-264, 1998.
- 4) Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG. Nat Rev Neurosci. 4:13-25, 2003.
- 5) Ihara M, Hanamoto S, Ihara MO, Zhang H, Tanaka H. J Appl Toxicol. 40:908-917, 2020.
- 6) Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA. Cell. 103:1009-1017, 2000.
- 7) Boden MJ, Kennaway DJ. Circadian rhyth Boden MJ, Kennaway DJ.Reproduction. 132:379-392, 2006.
- 8) Uz T, Ahmed R, Akhisaroglu M, Kurtuncu M, Imbesi M, Dirim Arslan A, Manev H. Neuroscience. 134:1309-1316, 2005
- 9) Bao M, Huang W, Au WW, Zheng S, Liu C, Huang Y, Wu K. Toxicol Appl Pharmacol. 381:114715, 2019.
- 10) Turek FW. Psychoneuroendocrinology. 13:217-232, 1988.
- 11) Akiyama M, Kirihara T, Takahashi S, Minami Y, Yoshinobu Y, Moriya T, Shibata S. Br J Pharmacol. 128:1616-1622, 1999.

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ 1】

特に記載すべき事項はない。

注) 現在投稿準備中

【サブテーマ 2】

- 1) H. Zhang, M.O. Ihara, N. Nakada, H. Tanaka, and M. Ihara: Environmental Science & Technology, 54, 3, 1720-1729 (2020) (IF : 9.0)
Biological-activity-based prioritization of pharmaceuticals in wastewater for environmental monitoring: G protein-coupled receptor inhibitors.
- 2) M. Ihara, S. Hanamoto, M.O. Ihara, H. Zhang, and H. Tanaka: Journal of Applied Toxicology, 40 (7), 908-917 (2020) (IF : 2.9)
Wastewater-derived antagonistic activities of GPCR-acting pharmaceuticals in river water.
- 3) A.C. Johnson, Z. Jin, N. Nakada, and J.P. Sumpter: Science, 367, 6476, 384-387 (2020) (IF : 41)
Learning from the past and considering the future of chemicals in the environment.
- 4) H. Zhang, Y. Lin, Z. Men, M. Ihara, W. Li, K. He: Chinese Chemical Letters, 31 (10), 2859-2863 (2020)
Evaluation of pharmaceutical activities of G-protein coupled receptor targeted pharmaceuticals in Chinese wastewater effluent
- 5) M. Ihara, H. Zhang, M.O. Ihara, D. Kato, H. Tanaka: Science of the Total Environment, 770, 144665 (2021) (IF : 7.9)
Proposal for fluorescence-based in vitro assay using human and zebrafish monoamine transporters to detect biological activities of antidepressants in wastewater

【サブテーマ 3】

- 1) K. Miyaoku, Y. Ogino, A. Lange, A. Ono, T. Kobayashi, M. Ihara, H. Tanaka, K. Toyota, H. Akashi, G. Yamagishi, T. Sato, C.R. Tyler, T. Iguchi, S. Miyagawa: Journal of Applied Toxicology, 41, 1390-1399 (2021) (IF : 3.4)
Characterization of G protein-coupled estrogen receptors in Japanese medaka, *Oryzias latipes*.

<その他誌上発表 (査読なし) >

【サブテーマ 1】

- 1) 長江真樹: 環境ホルモン学会ニュースレター、24巻, 1号, 6 (2021)
「抗うつ薬および抗精神病薬がメダカの行動に及ぼす影響について」
- 2) 筈平裕次: 環境ホルモン学会ニュースレター、24巻, 1号, 7 (2021)
「抗うつ薬のミルタザピンがアユに及ぼす影響について」

【サブテーマ 2】

- 1) 井原賢: 環境ホルモン学会 ニュースレター、Vol122, No2, 3 (2019)

PPCPsの水生生物への影響：神経系薬を中心に

- 2) 井原賢：日本病院薬剤師会雑誌、56巻、6月号、633-637（2020）
総説 医薬品による水環境への影響について
- 3) 中田典秀：エコケミストリー研究会機関紙『化学物質と環境』、特集号『医薬品の環境リスク
評価の最新動向と今後の課題』、No. 161、4-6（2020）、総説 水環境中の医薬品の存在実態
- 4) 井原賢、筈平裕次：エコケミストリー研究会機関紙『化学物質と環境』、特集号『「水環境の評
価・管理でのバイオアッセイ利用の現状と今後』、No. 168、4-6（2021）、総説 下水・河川水
中の医薬品による生物影響評価の現状と今後
- 5) 井原賢、環境衛生工学研究、35、2、8-14（2021）
医薬品の水生生物影響
- 6) 中田典秀：環境ホルモン学会ニュースレター、24巻、1号、2（2021）
「PPCPsの薬理活性に注目した水環境モニタリング」
- 7) 井原賢：環境ホルモン学会ニュースレター、24巻、1号、3（2021）
「In vitroアッセイによる医薬品の生物影響評価」

【サブテーマ3】

- 1) 宮川信一：大科学フォーラム、36巻、4号、36-41（2019）
「温度で決まる動物のオスとメスの研究」
- 2) 荻野由紀子、宮川信一：遺伝子医学、9巻、3号、160-166（2019）
「魚類と特性を活かした遺伝子研究」
- 3) T. Iguchi, Y. Ogino, S. Miyagawa, R. Yatsu, N. Tatarazako: Medaka Book, J Wiley &
Blackwell, 271-274（2020）
“Applied toxicity tests for endocrine disruptors.”
- 4) Y. Ogino, A. Sébillot, S. Miyagawa, N. Tatarazako, T. Iguchi: Medaka Book, J Wiley &
Blackwell, 275-279（2020）
“Detection of androgenic and anti-androgenic chemicals using medaka”
- 5) 宮奥香理、宮川信一：環境ホルモン学会ニュースレター、24巻、1号、4-5（2021）
「環境医薬品の標的となる魚類のモノアミントランスポーターとGPCR遺伝子」
- 6) 宮川信一：理大科学フォーラム、38巻、6号、21-23（2021）
「環境中の化学物質と生物の研究」
- 7) 宮川信一：ファルマシア、58巻、1号、39-43（2022）
「環境要因による性決定」
- 8) G. Yamagishi, T. Iguchi, S. Miyagawa: Genomic and Epigenomic Biomarkers of Toxicology
and Disease, J Wiley & Blackwell, in press（2022）
“Epigenetic regulation of sex determination and toxicity in non-mammalian
vertebrates.”

（2）口頭発表（学会等）

【サブテーマ1】

- 1) K. Soyano, and M. Nagae: The 21th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research
into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Otsu, Japan（2019）
Influence of environmental estrogens on fish reproduction in Japanese coastal waters.
- 2) 征矢野清、長江真樹、筈平裕次、村田良介、井原賢、中田典秀、張晗、宮川信一、宮奥香理：
第22回環境ホルモン学会研究発表会（2019）
水圏生態系に及ぼす環境医薬品の影響評価
- 3) K. Soyano, and M. Nagae: The 22th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research

into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Online (2020)

Continuous field survey of environmental estrogens (EEs) pollution and study on combined effects of EEs and pharmaceuticals on fish reproduction.

- 4) 長江真樹, 富田将基, 飯野大輔, 薙平裕次, 村田良介, 井原賢, 中田典秀, 宮川信一, 宮奥香理, 征矢野清: 第29回環境化学討論会 (2021), 大阪・千里ライフサイエンスセンター&Webハイブリッド開催, ヒト医薬品のメダカの行動および繁殖能に及ぼす影響
- 5) K. Soyano, M. Nagae M and Y. Mushiobira: The 23th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Online (2021)
Continuous field survey of environmental estrogens (EEs) pollution and study on combined effects of EEs and pharmaceuticals on fish reproduction.

【サブテーマ2】

- 1) H. Tanaka, M. Ihara, N. Nakada, H. Zhagn, H. Yamashita, and S. Hanamoto: The 21th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Otsu, Japan (2019)
Prediction and management of emerging chemicals in the water environment.
- 2) H. Zhang, H. Tanaka, and M. Ihara: 11th Micropol and Ecohazard Conference, Seoul, Korea (2019)
Investigation of G protein-coupled receptor-acting pharmaceuticals responsible for biological activities in wastewater in England.
- 3) M. Ihara, H. Zhang, M.O. Ihara, D. Kato, and H. Tanaka: The 5th Asian Symposium on Water Reuse -Technology Renovation and Risk Management, Yokohama, Japan (2019)
Novel in vitro assays to investigate adverse effects of environmental pharmaceuticals on aquatic species.
- 4) H. Tanaka, M. Ihara, N. Nakada, H. Zhang, H. Yamashita, S. Hanamoto: The 22nd UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, On-line (2020)
Prediction and management of emerging chemicals in the water environment.
- 5) 井原賢: 第23回日本水環境学会シンポジウム (2020)
バイオアッセイの未来～ in vitroアッセイを用いた神経系医薬品の水生生物影響評価の取り組みとその可能性の観点から
- 6) H. TANAKA, M. IHARA, N. NAKADA, H. ZHANG, H. YAMASHITA, S. HANAMOTO, The 23rd UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals (2021), オンライン、Prediction and management of emerging chemicals in the water environment.
- 7) 井原賢、韓旻光、宮川信一、豊田賢治、征矢野清、長江真樹、薙平裕次、田中宏明、第56回日本水環境学会年会 (2022), 富山大学 オンライン、GPCR阻害薬および抗うつ薬の水生生物受容体に対する薬理活性
- 8) 中田典秀、周嘉俊、韓旻光、井原賢、第29回環境化学討論会 (2021年)、オンライン、GPCR阻害薬および抗うつ薬成分の下水処理における除去率と放流水中濃度、
- 9) Norihide NAKADA, The 23rd UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals (2021), オンライン、Overview of research on pharmaceuticals in the aquatic environment of Japan.

【サブテーマ3】

- 1) 宮川信一: 東京理科大学第5回医学研究シンポジウム、千葉県野田市 (2019)

「環境で決まる動物の性」

- 2) 宮川信一：2019年度第2回母と子のすこやか基金セミナー、大阪府和泉市（2019）
「環境に依存する動物の性決定」
- 3) S. Miyagawa, T. Iguchi, A. Lange, C.R. Tyler: The 21th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Otsu, Japan (2019)
“Approaches for studying endocrine disruption and estrogen receptor subtypes in fish.”
- 4) S. Miyagawa, T. Iguchi, A. Lange, C.R. Tyler: The 22th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, On-line (2020)
“Approaches for studying endocrine disruption and estrogen receptor subtypes in fish.”
- 5) 宮川信一：第60回環日本海域環境研究センターセミナー、オンライン（2021）
「環境に依存する動物の性の研究」
- 6) S. Miyagawa, T. Iguchi, A. Lange, C.R. Tyler: The 23th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, On-line (2021)
“Approaches for studying endocrine disruptors acting through nuclear receptors in fish, Japanese medaka (*Oryzias latipes*).”

（３）「国民との科学・技術対話」の実施

【共通】

- 1) 特別企画「環境医薬品研究の最新動向に関するシンポジウム」、環境化学物質3学会 合同大会、（2022年6月15日、富山国際会議場にて開催予定）において本研究プログラムの研究を紹介するシンポジウムを主催する。本研究プロジェクトのメンバーがそれぞれ研究成果を講演する。

【サブテーマ１】

- 1) 長江真樹：排水中の化学物質と生物影響～特に医薬品と環境ホルモンについて～、令和元年度長崎大学高大連携公開講座（2019年7月30日、長崎大学環境科学部、長崎県内高校生7名）にて、環境医薬品に関する研究取り組みを紹介。
- 2) 征矢野清、長江真樹、村田良介、薙平裕次、井原賢、中田典秀、宮川信一、宮奥香理：「環境医薬品の魚類次世代生産への影響解析」（5-1952）情報発信セミナーおよび長崎大学海洋未来イノベーション機構(OMST)セミナー&シンポジウム「海と地球と人と」第8回東京セミナー「川や湖に流れ込んだ医薬品は魚にどんな影響をあたえるのか」（主催：長崎大学、京都大学、東京理科大学、共催：OMST、2020年12月21日、オンラインシンポジウム、参加者123名）にて、本事業の活動と環境医薬品問題を紹介。
- 3) 長江真樹：環境問題を考える～水と生物の視点から～、令和3年度長崎大学高大連携公開講座（2021年8月4日～5日、長崎大学環境科学部、長崎県内高校生14名）にて、環境医薬品の生物影響評価に関する研究取り組みを紹介。

【サブテーマ2】

- 1) 井原賢：PPCPsの水生生物への影響：神経系薬を中心に、環境ホルモン学会第33回講演会「水環境における医薬品及びパーソナルケア製品(PPCPs)に関する最近の動向について」（主催：環境ホルモン学会、2019年6月15日、東京 食品衛生センター、観客約100名）にて講演

- 2) 中田典秀：PPCPsの環境中での存在状況、環境ホルモン学会第33回講演会「水環境中における医薬品及びパーソナルケア製品(PPCPs)に関する最近の動向について」（主催：環境ホルモン学会、2019年6月15日、東京 食品衛生センター、観客約100名）にて講演
- 3) 井原賢、下水由来の医薬品の水生生物への影響(主催：国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所、2021年11月17日「令和3年度漁場環境保全関係研究開発推進会議有害物質研究会」、オンライン、参加者約50名)にて研究成果を招待講演した。
- 4) 中田典秀、環境省令和3年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー、オンライン、2022、日本の水環境における医薬品成分の存在実態について

【サブテーマ3】

- 1) 宮川信一：東京理科大学オープンキャンパス（2019年8月11日、来場者947名）にて成果紹介
- 2) 宮川信一：東京理科大学・高校生のためのサイエンスプログラム（2019年8月31日、参加者20名）にて特別授業の実施
- 3) 宮川信一：大学生および一般参加者を対象とした東京理科大学総合研究院生物環境イノベーション研究部門・公開シンポジウム～わたしたちの生活と生物環境を考える～（2021年11月18日、参加者約150名）を主催し、「独立行政法人環境再生保全機構 環境研究総合推進費「環境医療品の魚類次世代生産への影響解析」5-1952」研究プロジェクトを紹介し、本メンバーが研究成果を発表した。「環境医薬品の標的分子と生物応答」（宮川）、「環境化学物質のメダカに対する甲状腺系かく乱作用の影響解析」（國行亜紀、小野純佳、豊田賢治、荻野由紀子、堀江好文、井口泰泉、宮川信一）、「ゲノム編集メダカを用いたエストロゲン受容体の機能解析」（室田修平、中島啓、藤井英里、宮奥香理、荻野由紀子、宮川信一）が講演をおこなった。

（4）マスコミ等への公表・報道等＞

【サブテーマ1】

一部サブテーマ2と共通

【サブテーマ2】

- 1) 井原賢、京都大学図書館での研究紹介の展示、Website 桂の庭 <https://seeds.t.kyoto-u.ac.jp/seeds/ihara/> 2021年1月18日、受容体を用いた培養細胞試験による下水中の医薬品活性検出の研究が紹介された。サブテーマ1)によるメダカ曝露試験の動画も公開された。
- 2) 中田典秀、*Science -Japanese Scientists in Science 2020*, American Association for the Advancement of Science (AAAS), 2020年に出版された*Science*誌に掲載され日本人著者の紹介冊子にて紹介された。2021年3月、24頁
- 3) 中田典秀、水道産業新聞（2021年1月1日全国版、8頁）、『次代を担う学識者からの上下水道未来への提言』という特集にて研究内容が紹介された。

【サブテーマ3】

特に記載すべき事項はない。

（5）本研究費の研究成果による受賞

特に記載すべき事項はない。

IV. 英文Abstract

Evaluation of Effects of Environmental Pharmaceuticals on Fish Reproduction

Principal Investigator: Kiyoshi SOYANO

Institution: Organization for Marine Science and Technology, Nagasaki

University, 1551-7 Taira-machi, Nagasaki City, 851-2213, JAPAN

Tel: +81-95-850-7701 / Fax: +81-95-840-1881

E-mail: soyano@nagasaki-u.ac.jp

Cooperated by: Kochi University, Kyoto University, Tokyo University of Science

[Abstract]

Key Words: Pharmaceuticals, Antidepressant, G protein-coupled receptor inhibitor, Fish, Reproductive behavior, Next generation production, Response gene, Aquatic pollution

The environmental pharmaceuticals that are prescribed in Japan and expected to be detected at high concentrations in environmental water are G-protein coupled receptor inhibitors (GPCR inhibitors) and antidepressants. Since these pharmaceuticals act on nerve cells, it is highly likely that they will affect the central nervous system and neuroendocrine system, especially the brain, thereby interfering with normal behavior and physiological functions of fish. Therefore, a study was conducted to understand the dynamics of environmental pharmaceuticals in bodies of water and relate these chemicals to cellular, molecular, and individual responses, as well as to evaluate their effects on the ecosystem. This research was conducted from the perspectives of sub-theme 1, "Analysis of the effects of environmental pharmaceuticals on fish behavior and reproduction," sub-theme 2, "Understanding the actual presence of environmental pharmaceuticals in aquatic environments," and sub-theme 3, "Identification and evaluation of fish biomolecules that are targets of environmental pharmaceuticals.

As a result, 1) an in vitro assay for quantifying the concentration of environmental pharmaceuticals in bodies of water (equivalent quantity) was made possible by using a cell line expressing fish receptors that are a target of pharmaceuticals, and 2) the development of simultaneous analysis using a mass spectrometer, which made it possible to measure the concentrations of environmental pharmaceuticals and some metabolites in bodies of water. This enables efficient analysis of the actual state of environmental pharmaceuticals present in bodies of water. In addition, as a result of analyzing the effects of environmental pharmaceuticals on fish behavior and reproduction, it became clear that 3) swimming and spawning behavior were inhibited by pharmaceuticals targeting monoamine transporters, and 4) reproduction (next-generation production) was affected through a reduction in the number of spawned eggs. In addition, a comprehensive analysis of response genes using pharmaceutical-exposed individuals revealed that 5) some genes increased or decreased by exposure to pharmaceuticals, and that circadian rhythm-related genes, including central clock molecules, in particular may be affected. These results are indispensable for understanding the extent of contamination of environmental pharmaceuticals in rivers, treated wastewater, etc. and the biological effects caused by them, including their mechanisms of action, and have completed the foundation for establishing an Adverse Outcome Pathway (AOP) that includes

effects on the ecosystem.