

課題番号：【5-1952】

研究課題名：環境医薬品の魚類次世代生産への影響解析

重点課題：

主 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 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

研究代表機関名：長崎大学

研究課題代表者：征矢野 清

研究実施期間： R1年4月～R4年3月

研究分担機関 長崎大学海洋未来イノベーション機構

大学院水産・環境化学総合研究科

高知大学農林海洋科学部

京都大学大学院工学研究科

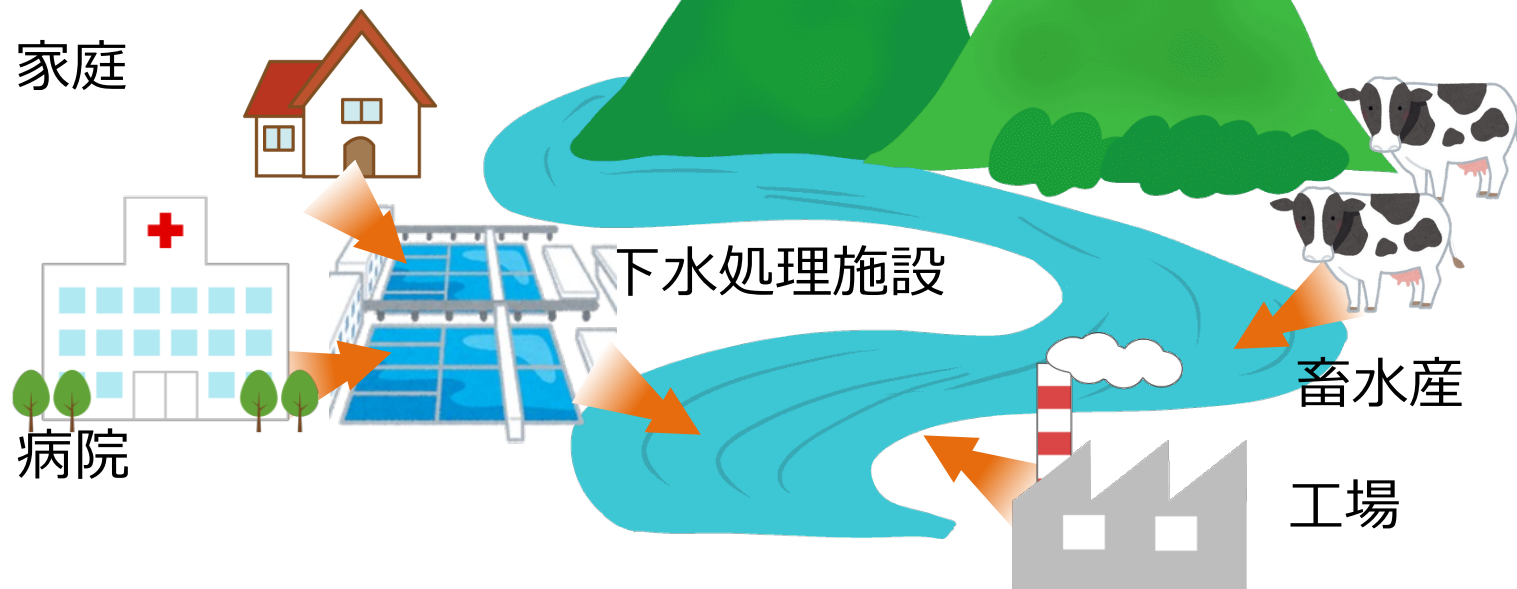
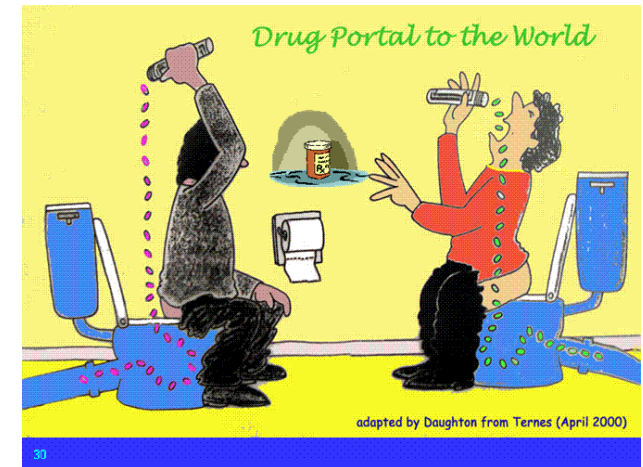
東京理科大学先進工学部生命システム工学科

環境医薬品の魚類次世代生産への影響解析

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

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



日本における医薬品処方（使用金額）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

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

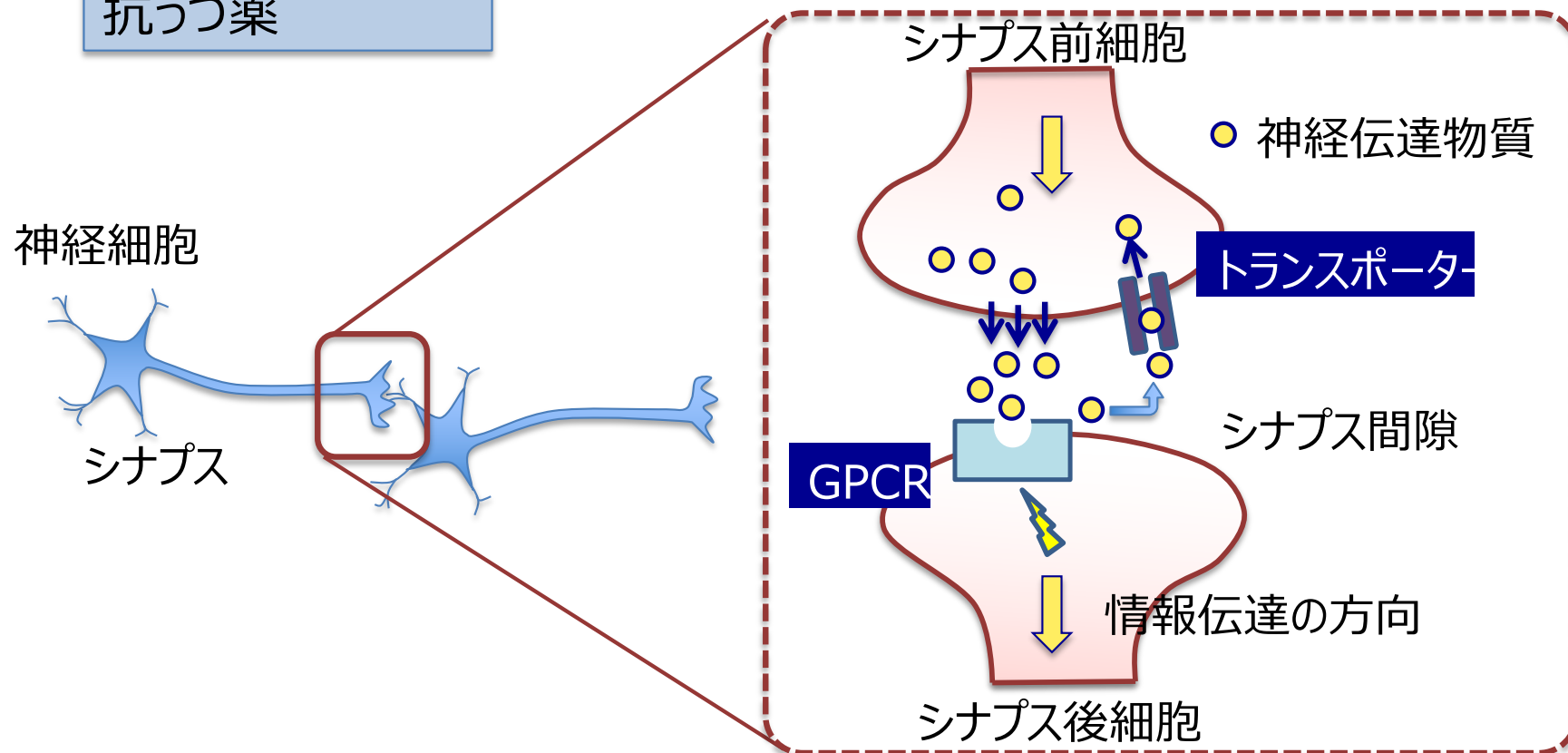
医薬品の作用機序

◆ GPCR阻害薬/抗うつ薬は脳を中心とした中枢神経に作用

消化性潰瘍用剤
循環器官用剤
アレルギー用薬
抗うつ薬

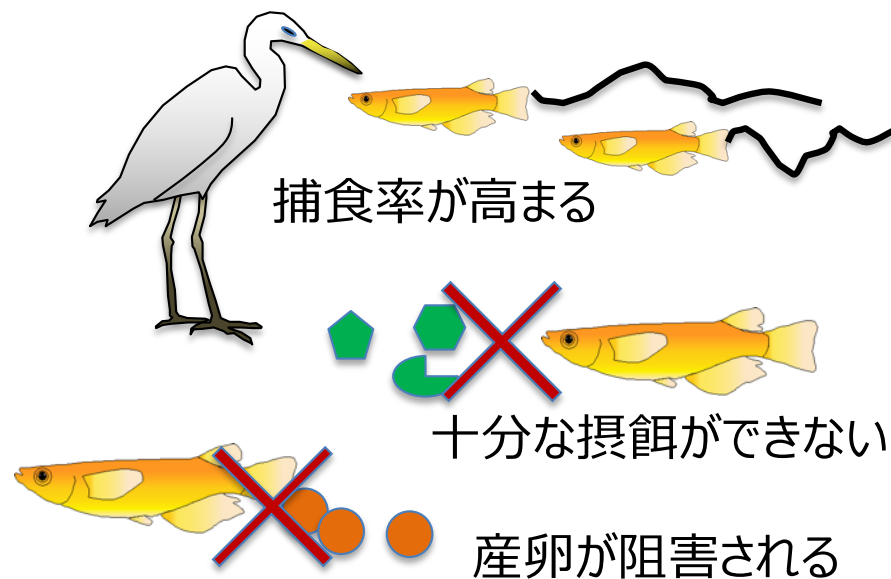
細胞内の標的分子

- ✓ 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



環境医薬品の生物影響は・・・

- ◆ 異常な行動は、捕食されるリスクを高め、生残率の低下を引き起こす。



GPCR阻害薬/抗うつ薬

脳を中心とした中枢神経、
神経内分泌へ影響

行動/生理機能を阻害

特に次世代生産(繁殖)阻害

個体群の減少、生態系の破壊

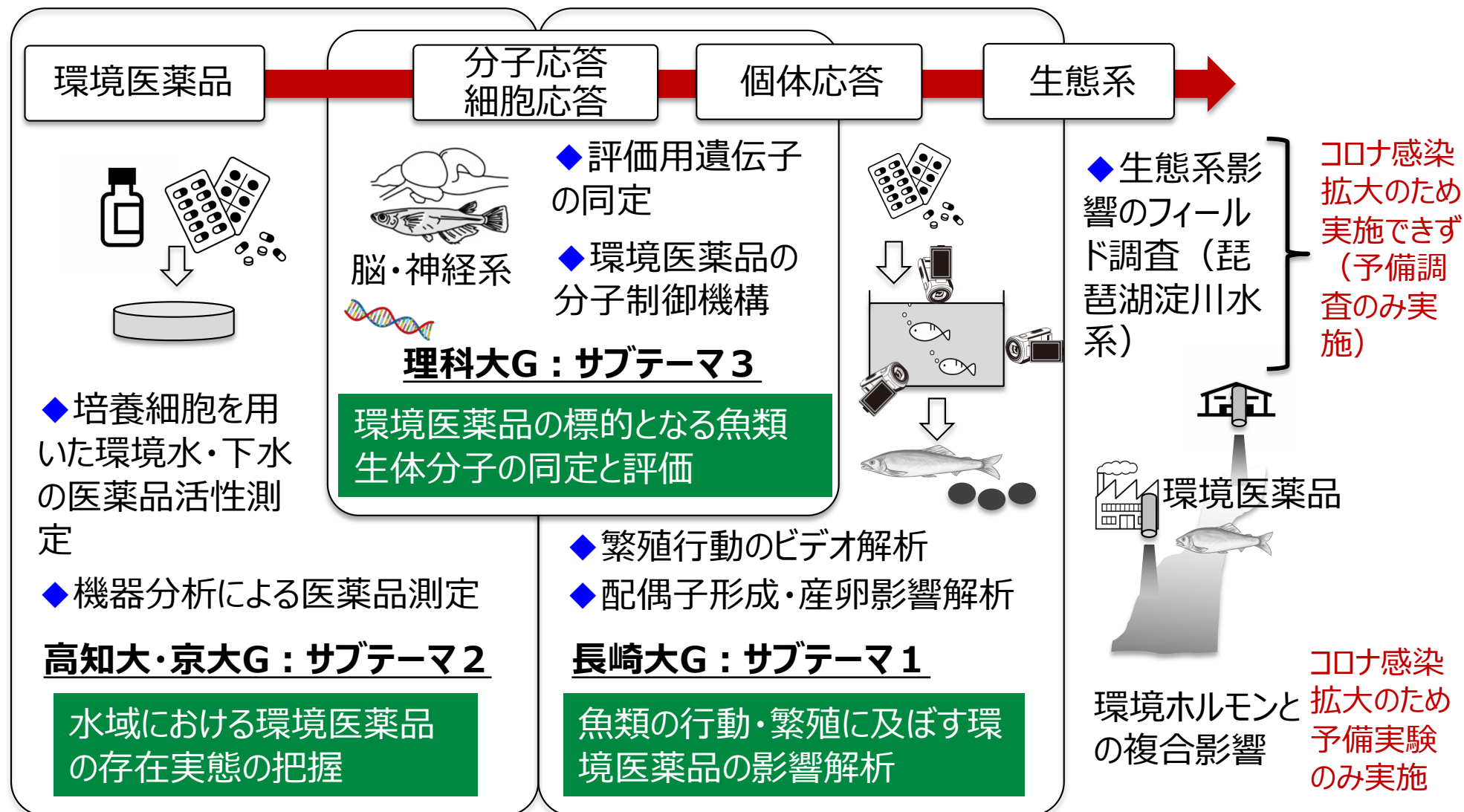
環境医薬品

分子応答
細胞応答

個体応答

生態系

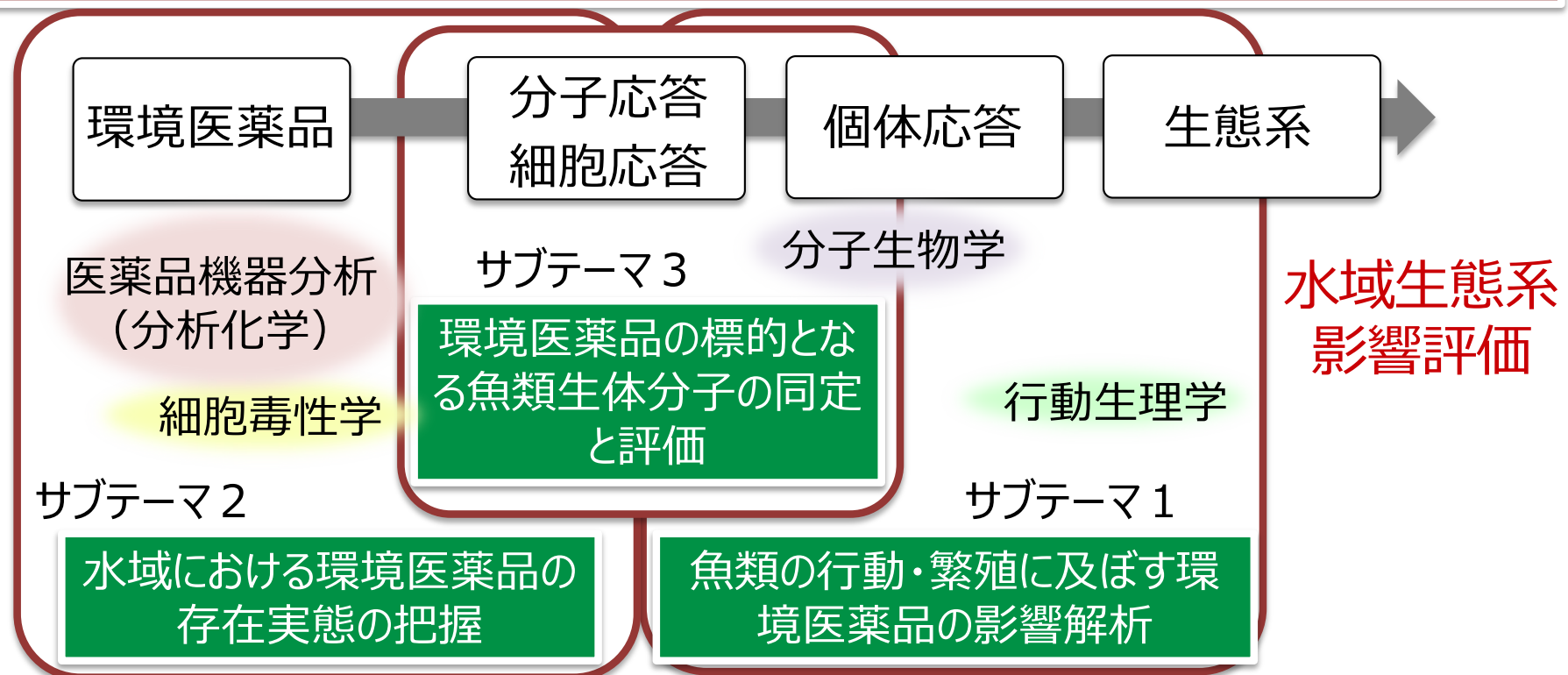
研究体制



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

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

- 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

- 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。

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

- 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。

サブテーマ1

環境医薬品

分子応答
細胞応答

個体応答

生態系

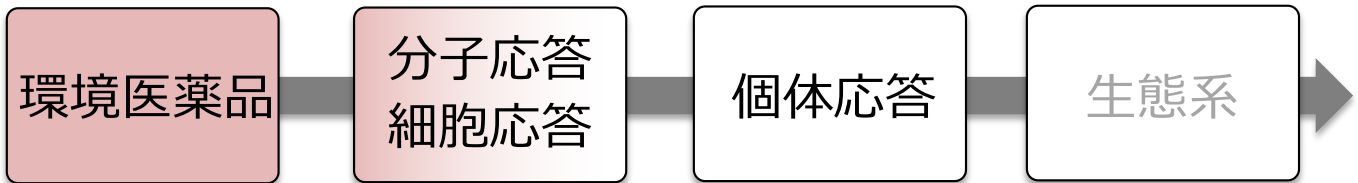
① 医薬品曝露による行動影響解析

- 1) 曝露試験における試験条件検討およびビデオと行動解析ソフトを用いた行動解析の評価基準整備
- 2) 医薬品曝露による異常繁殖行動の抽出と医薬品毎の評価
- 3) 行動と医薬品応答遺伝子の関連性解析 →サブテーマ3と連携

② 医薬品の生殖腺発達・産卵への影響解析

- 1) 医薬品の配偶子形成および産卵量への影響解析
- 2) 配偶子形成および産卵量・孵化率等を基準としたときの次世代生産への影響評価
- 3) 個体応答と標的分子の関係性・作用機序の解明 →サブテーマ3と連携

サブテーマ2



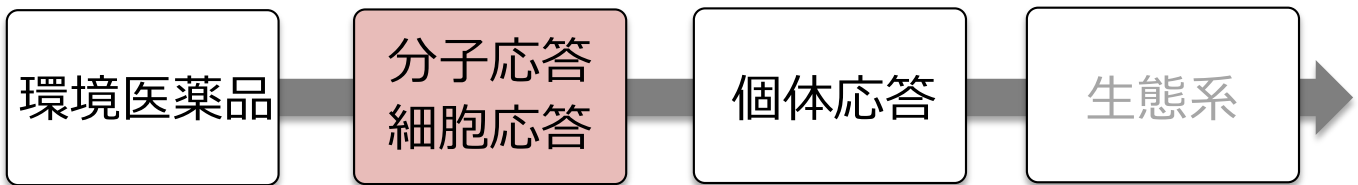
①培養細胞試験による環境水・下水の医薬品活性測定

- 1) 使用量の多い抗うつ薬/GPCR 阻害薬の薬理活性の把握
- 2) 魚類受容体を用いた培養細胞試験の確立
- 3) 水系調査により薬理活性を測定
→これらの成果は全てサブテーマ1での曝露試験へ反映

②機器分析による環境医薬品の汚染実態の把握

- 1) 抗うつ薬、GPCR 阻害薬の分析法開発
- 2) 水系調査・曝露試験水の医薬品濃度を測定 →サブテーマ1へ
成果を提供

サブテーマ3



①環境医薬品の標的となる生体分子の同定

- 1) 医薬品の標的となる**魚類生体分子**（トランスポーターやGPCR 等）
の遺伝子クローニング → サブテーマ2へ成果を提供
- 2) それらの**脳内での局在**や、**遺伝子発現量**の同定

②環境医薬品に応答する遺伝子の同定と評価

- 1) 環境医薬品に**応答する遺伝子**の発現解析と同定 → サブテーマ1より曝露個体の資料提供
- 2) **バイオマーカー遺伝子**の評価と検証

メダカの行動に及ぼす環境医薬品の影響解析

種医薬品の行動影響（表層遊泳性）試験

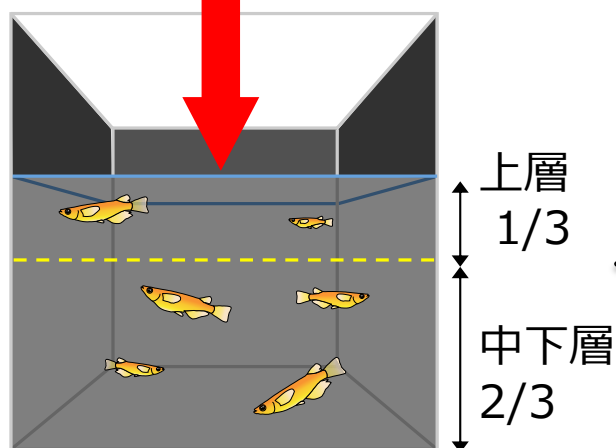
行動ビデオ撮影

毎日2回
（朝・夕）撮影



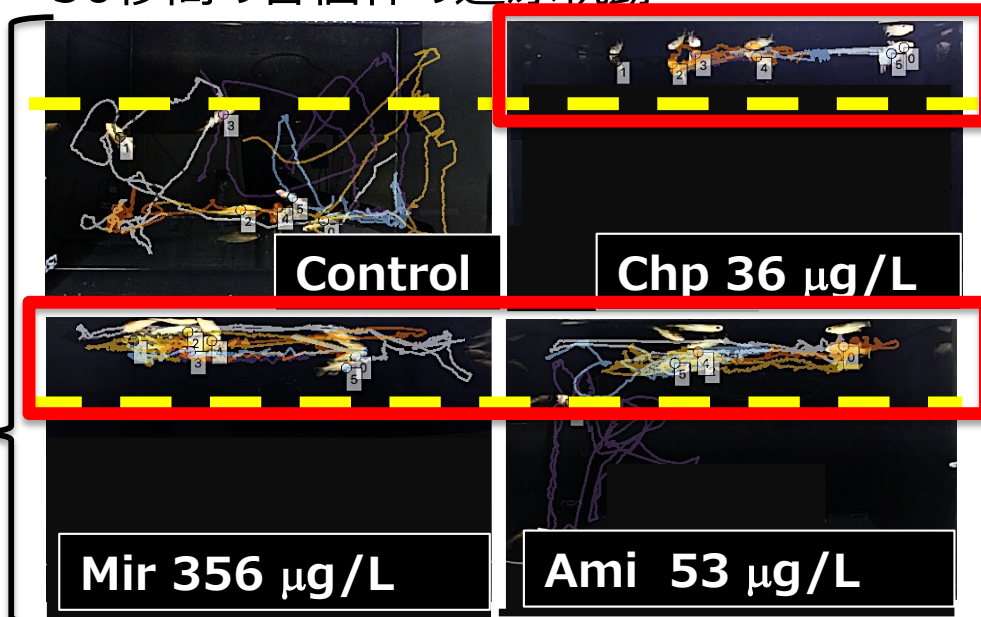
曝露期間4日
間で合計8動
画撮影。

医薬品曝露



トラッキング解析

30秒間の各個体の遊泳軌跡

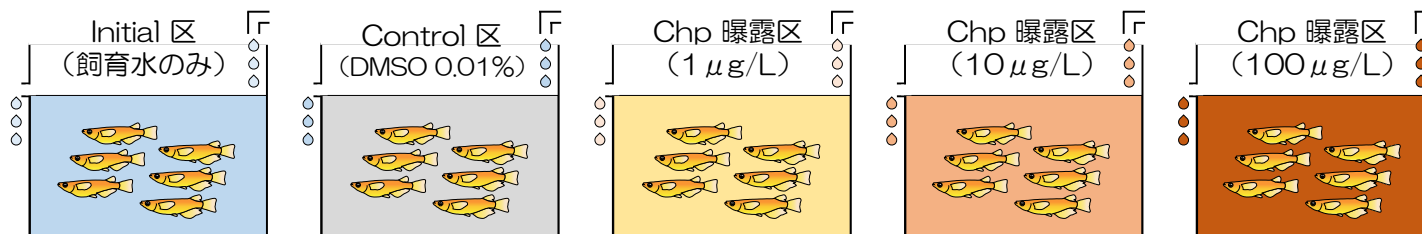


- ・抗うつ薬および抗精神病薬は、魚類の中枢神経系に作用し、行動影響（表層遊泳性）を誘起した。
- ・抗アレルギー薬など中枢神経系を主標的としない医薬品は影響しない。
- ・アユにおいても、同様の行動影響（走流性の変化）を示した。

- ✓ トランスポーターへの作用を有する中枢神経系に作用する医薬品は、表層遊泳を誘導。
- ✓ 実環境にも異常な行動を誘導する医薬品濃度（薬理活性）は存在（サブテーマ2）。

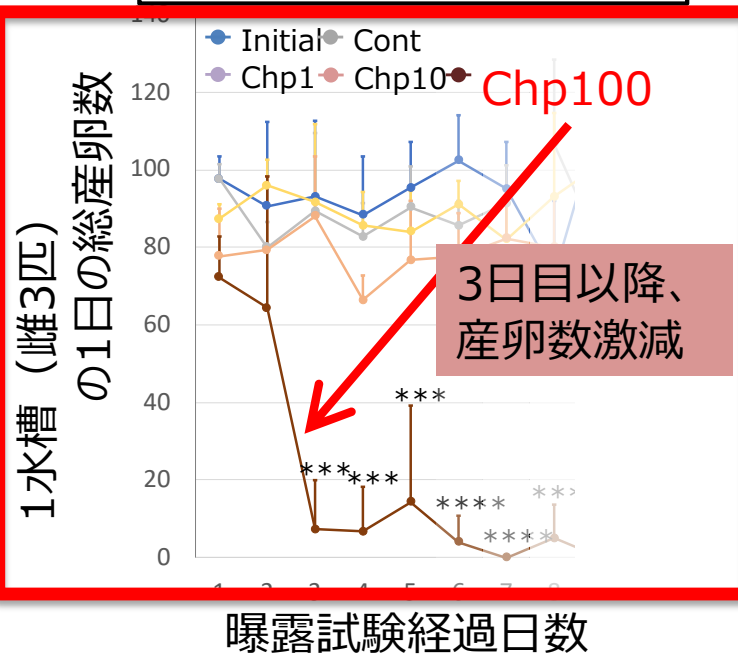
メダカの繁殖に及ぼす環境医薬品の影響解析

抗精神病薬のクロルプロマジン（Chp）曝露試験の例



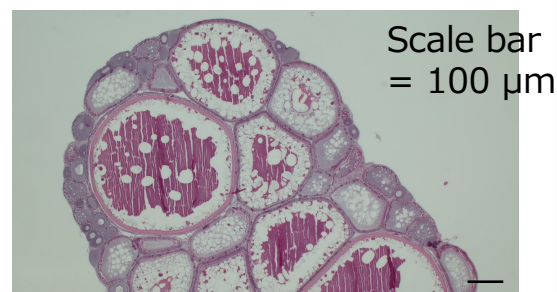
- ・ 21日間の流水式曝露
- ・ 産卵数, 受精卵数カウント
- ・ 卵巣の卵形成状態観察
- ・ 曝露水中の被験物質濃度

毎日の産卵数の経時変化



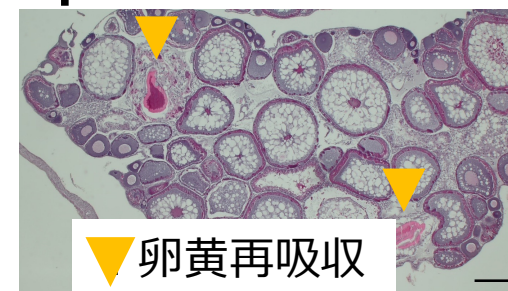
卵巣内の卵母細胞発達状況

Control



正常な卵巣

Chp 100

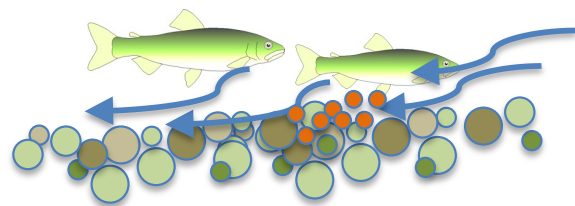


退行した卵巣

・抗うつ薬・抗精神病薬は産卵数・受精率を有意に低下。

✓ 抗うつ薬・抗精神病薬は、行動のみならず、産卵数・卵母細胞発達・受精率に影響。

アユの行動と繁殖に及ぼす環境医薬品の影響解析

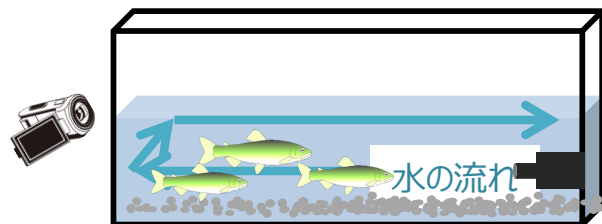


アユの産卵の特徴

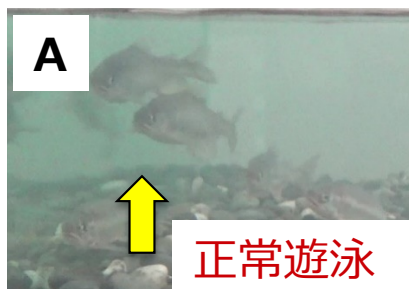
- 小砂利が浮き石状態の「瀬」
- 流れに逆らいながら、雌雄が寄り添って遊泳し、放卵・放精
- 小砂利に産卵

産卵場を再現し、医薬品を暴露

- ミルタザピンを1000 $\mu\text{g/L}$ の濃度で添加
- ビデオによる行動観察、産卵の確認



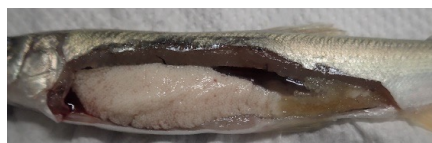
・ミルタザピン（1000 $\mu\text{g/L}$ ）をアユに曝露すると、群れを作れない、流されるなどの遊泳行動異常が誘起。



対照群の正常は遊泳 (A)

医薬品曝露個体 (B, C)

正常は産卵行動・遊泳が阻害



排卵した卵は残っていない



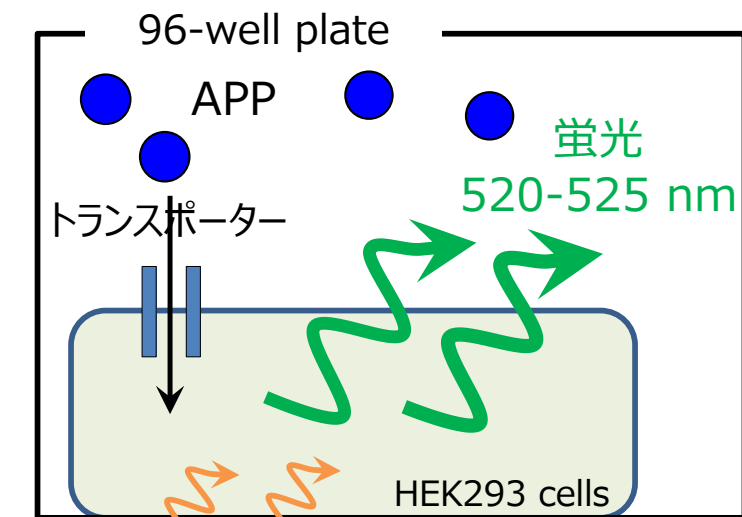
排卵したものの、産み出せなかった卵
(放卵できなかった卵) が残存

✓ 抗うつ薬は、アユの産卵行動を阻害することによって産卵に影響

抗うつ剤の薬理活性の測定

メダカ、アユの受容体の世界初のクローニング

抗うつ薬活性測定の培養細胞試験を開発¹⁾

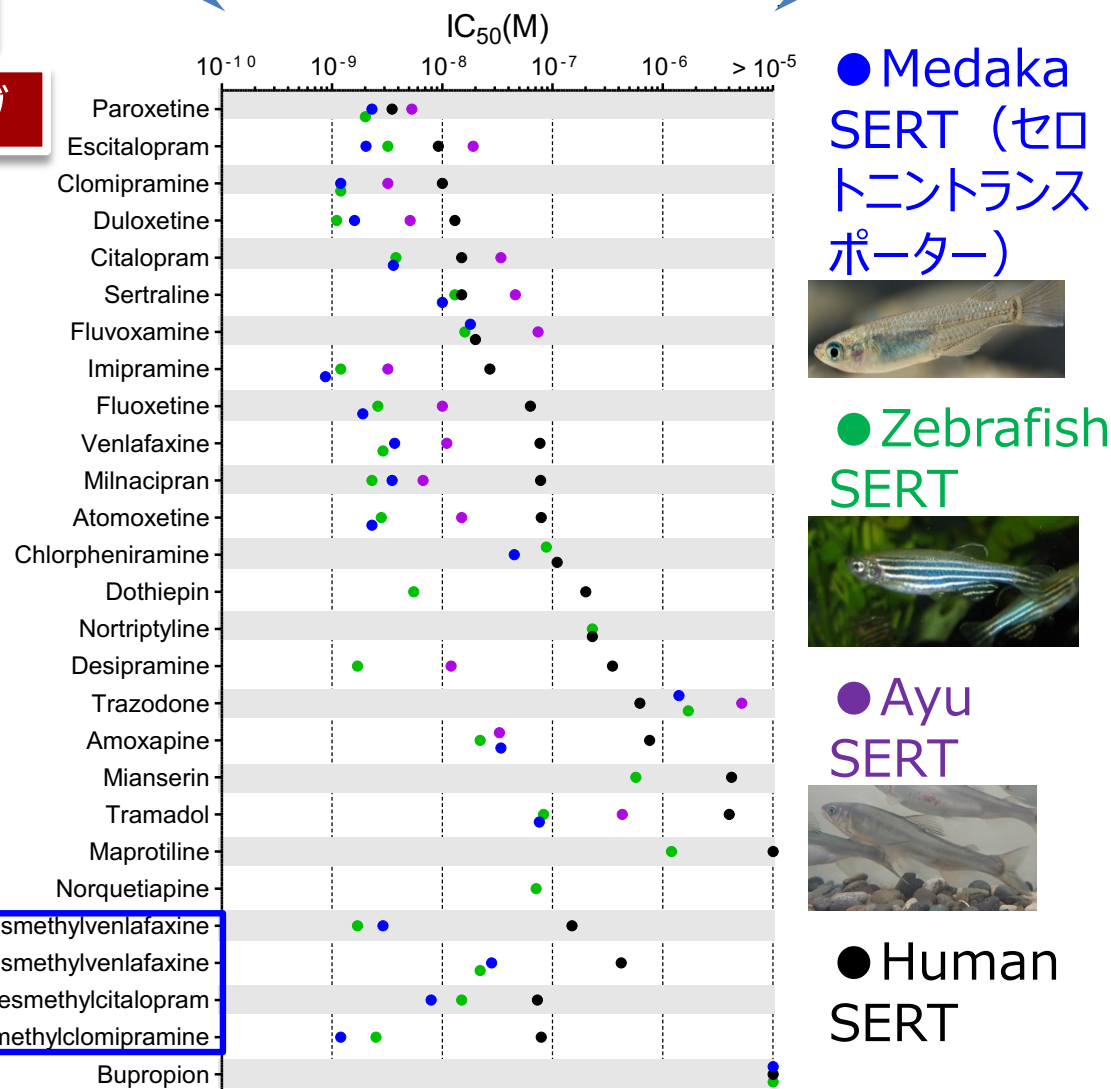


Excitation, $\lambda = 485 \text{ nm}$

1) Ihara et al., STOTEN 2021 代謝物

強い活性

弱い活性



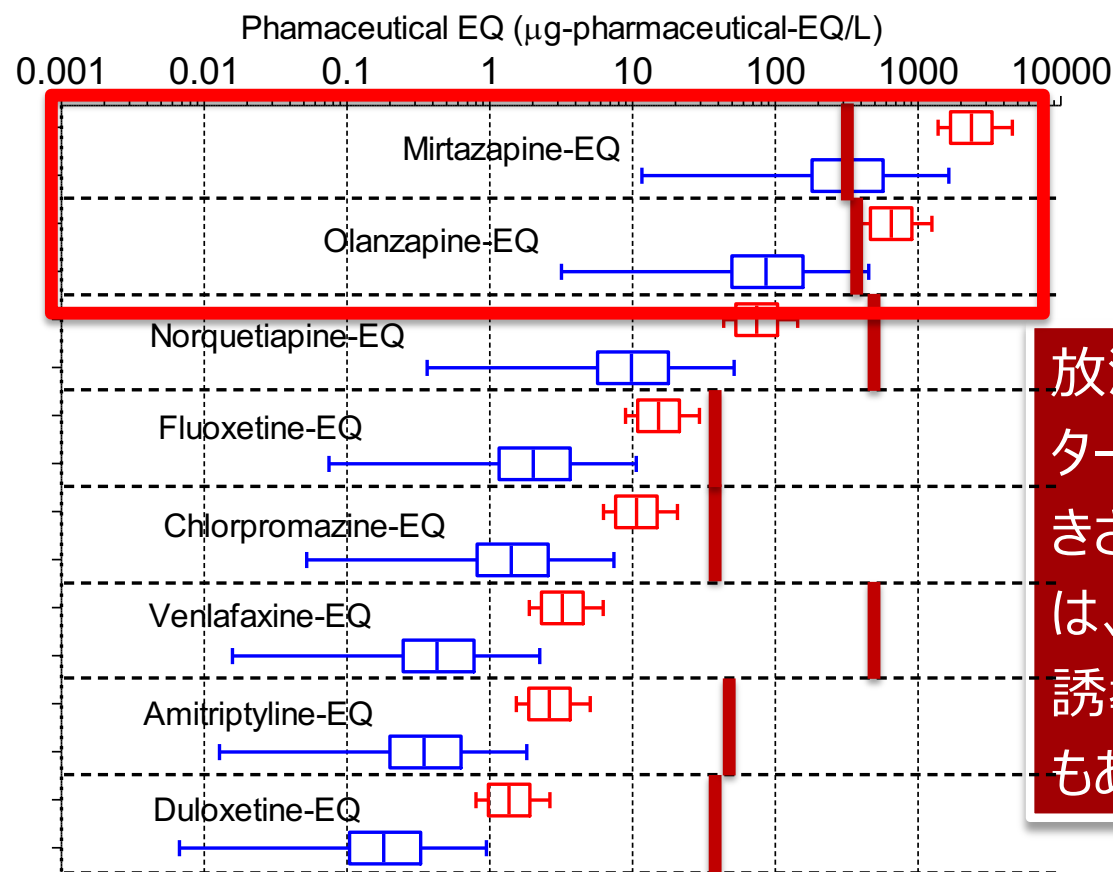
✓ 魚のモノアミントランスポーターはヒトより強く阻害されることを初めて実証。

✓ 環境医薬品には、ヒトよりも魚類への影響が大きい物がある。

メダカの実験結果に対する下水処理場放流水中の抗うつ薬活性を実測

医薬品（抗うつ薬）の薬理活性

□ STPs in UK (n=6) □ STPs in Japan (n=27)



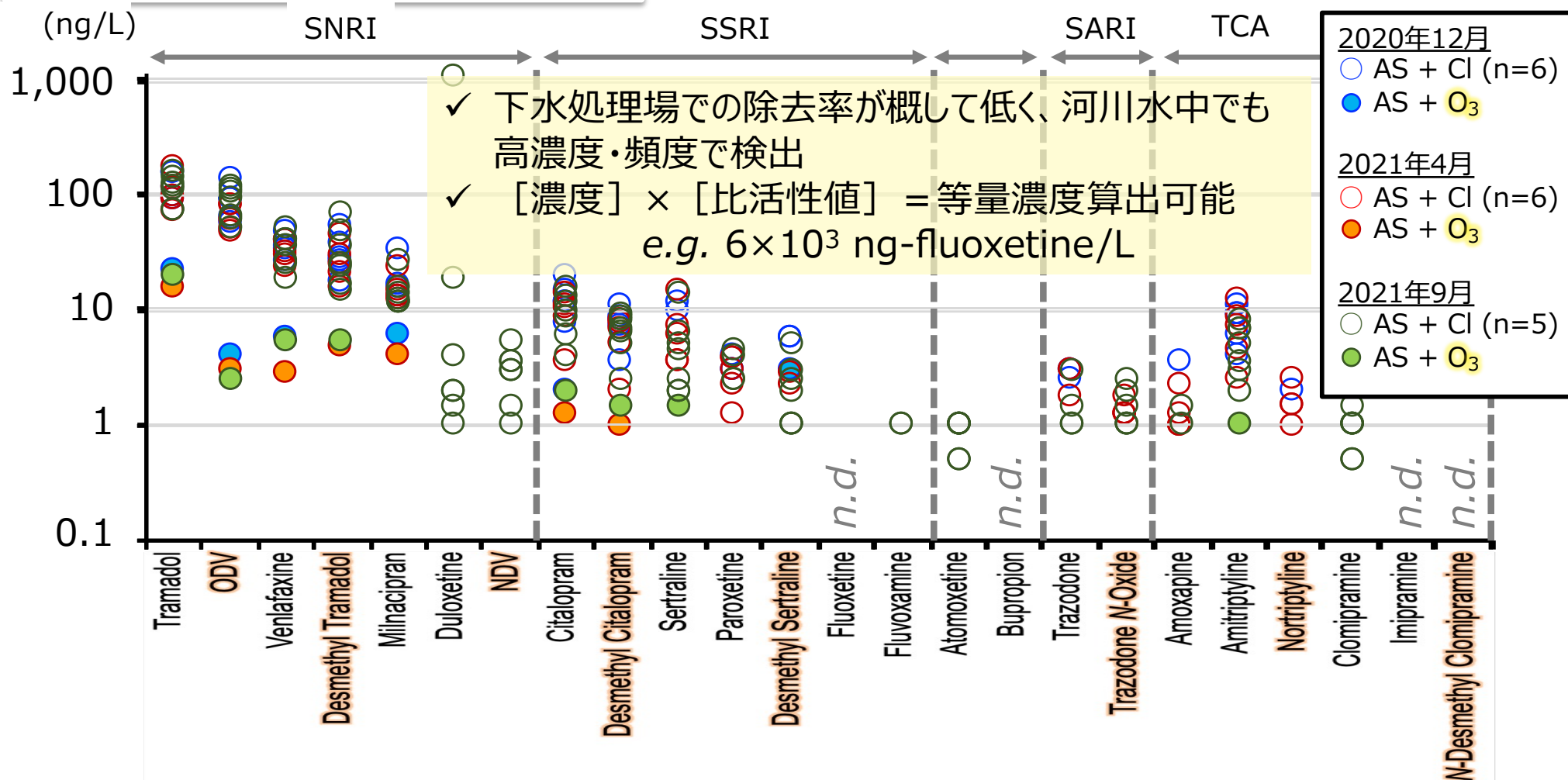
メダカの曝露試験による最小影響濃度（長崎大G）を示す

放流水のメダカセロトントランスポーター（SERT）に対する阻害活性の大きさ(抗うつ薬等量値で $\text{ng/L} \sim \text{mg/L}$)は、メダカへの曝露試験で表層遊泳を誘導する医薬品濃度を超過する場合もあった。

✓ 医薬品によっては、魚類の行動異常を引き起こす濃度に匹敵する薬理活性を、実環境中において確認。

下水処理水中濃度の把握

抗うつ薬成分の代謝物11種を含む合計68成分の同時分析

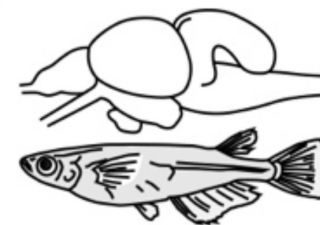


✓ 68成分を同時分析する方法確立。

✓ オゾン・塩素処理でも除去率が低く、環境中へ放出される物質あり。

※溶存相中濃度 AS: 活性汚泥処理 Cl: 塩素処理 (消毒工程) O₃: オゾン処理 (消毒工程) n.d.: 検出下限値未満

環境医薬品の標的となる魚類生体分子の同定と評価



① 環境医薬品の標的となる生体分子の同定

1) 医薬品の標的となる魚類生体分子（GPCRやトランスポーター）の遺伝子クローニング

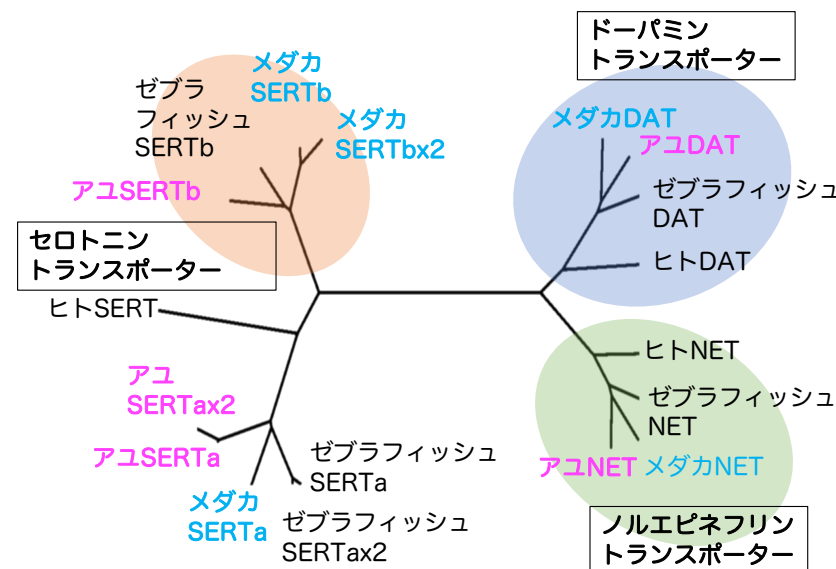
魚類に対する環境医薬品の作用を解析するための分子基盤を整備した。

② 環境医薬品に応答する遺伝子の同定と評価

1) 環境医薬品に応答する遺伝子の発現解析から、概日リズムに関連する遺伝子発現の変動を確認

2) メダカ・アユの両方で発現変動する遺伝子をリスト化

環境医薬品の標的分子への作用と、初期応答の分子イベントを同定し、AOP構築へのあしがりとなる。



- ✓ メダカ・アユのセロトニントランスポーターのクローニングにより、魚類の受容体を用いた薬理活性評価が可能になった（サブテーマ2）。
- ✓ 概日リズムに関係する応答遺伝子確認。

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

1. 水環境中の医薬品評価と検出

優先して調査・試験すべき水環境中の医薬品選定

- 1) 薬理活性のデータをもとに、生態系への影響が懸念される物質が明らかとなり、日本の水環境中において優先して調査・試験すべき候補物質の提案が可能となった。
- 2) 新たな抗うつ薬及びGPCR阻害薬にも対応できる評価技術の基盤が整った。

→医薬品調査・試験の対象物質選定とその影響評価の把握大きく貢献。

医薬品の検出・定量方法

- 1) 抗うつ薬及びGPCR阻害薬の濃度の機器分析の測定法を確立し、曝露試験における実験精度の評価等に利用できることがわかった。
- 2) 水環境中に存在する代謝物11物質を含む複数医薬品（68成分）の同時（一斉）分析が可能となった。

→環境省が実施している医薬品等の環境水中濃度の把握に大きく貢献。

2. 魚類の行動と産卵の異常による医薬品の環境リスク評価

- 1) メダカを用いた試験評価法の基盤が整備された。
- 2) 中枢神経系に作用する医薬品による魚類の行動と産卵の異常をエンドポイントとした医薬品の環境リスク評価が可能であることが分かった。
- 3) メダカ及びアユの次世代生産に及ぼす医薬品の影響が明らかとなり、環境医薬品の生態系への影響の有無を検討する基盤が整備された。

→未だ未整備の医薬品の試験評価系の確立に大きく貢献。

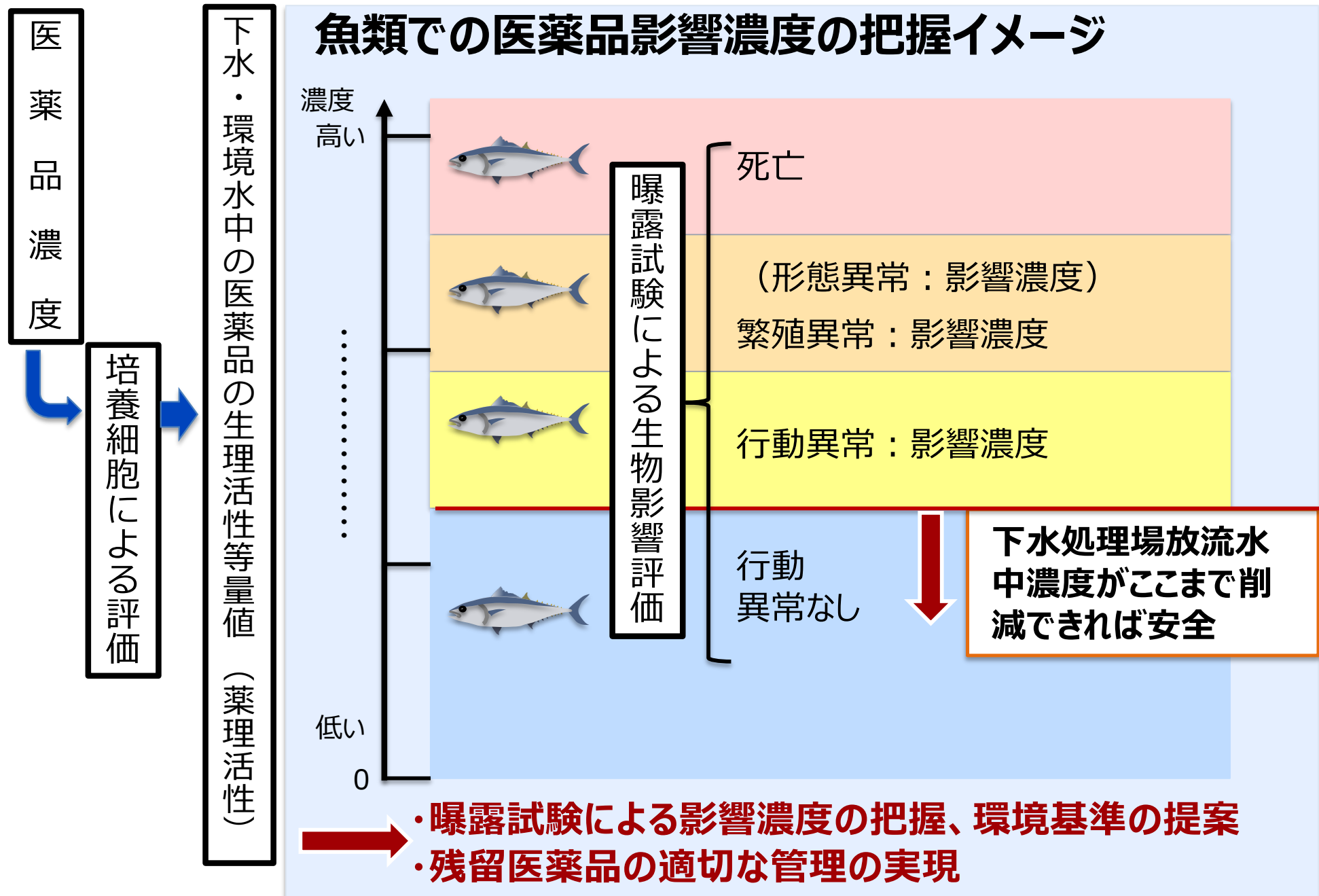
→野生生物における環境医薬品評価手法の確立に大きく貢献。

3. 魚類における環境医薬品の作用機序

- 1) 分子機構の解明により、医薬品の特性を作用機序の共通性でクラスター化するための基盤が整備できた。
- 2) 環境医薬品のAdverse Outcome Pathway (AOP) 構築ならびに新たなリスク管理を可能とする分子応答情報の一部を明らかにした。

→AOP構築による環境医薬品の生態系全体を俯瞰した影響評価とその対策に大きく貢献。

→作用機序クラスターによる医薬品の評価系整備に貢献



本研究の成果・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*.

本研究の成果・学会発表他

雑誌発表 : 17件

学会口頭発表 : 20件

マスコミ等への公表・報道等 : 3件

国民との科学・技術対話

- オンラインシンポジウム「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、2020年12月21日）
- 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」（主催：東京理科大学総合研究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（2021年11月18日）

その他の国民との対話

高校生向け公開講座、2回（2019年7月30日、2021年8月4-5日）長崎大学
 高校生向けオープンキャンパス（2019年8月11日）サイエンスプログラム（2019年8月31日）
 東京理科大学
 環境ホルモン学会講演会2回（2019年）
 国立水産研究開発法人 水産技術研究所 1回（2021年）
 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 1回（2022年）

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

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」第8回セミナー オンライン (ZOOM) セミナー

主催：環境医薬品の魚類次世代生産への影響解析プロジェクトチーム（長崎大学・京都大学・東京理科大学）
 共催：国立大学法人長崎大学海洋未来イノベーション機構 (OMST)
 日時：2020年12月21日（月）13:30～16:45（予定）

方法：ZOOMによるオンラインセミナー
 募集人数：50名（事前申し込み制） お申し込みは以下のHPより
https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQL5db89exE-An1s4m2Bbl_OEDWkog8nuGvYv78x7jPxMD-dTVHg/viewform?vc=0&c=0&w=1&flr=0&gxids=7628
 募集期間：2020年12月11日（金）まで
 参加費：無料

我々が使用した医薬品は環境中、特に水域に放出されます。これらを環境医薬品と呼びますが、いったい魚類にどのような影響を与えるのでしょうか。新たな環境問題「環境医薬品」に焦点を当てた研究を紹介します。

【プログラム】
 13:20～ ZOOMアクセス開始
 13:30～13:50 開会挨拶・研究概要説明 征矢野清（長崎大学 プロジェクトリーダー）
 13:50～14:10 医薬品は体の中でどのように働くか？ 宮典香理・宮川信一（東京理科大学）
 14:10～14:30 医薬品の水環境における存在実態 中田典秀（京都大学）
 14:30～14:50 医薬品の魚に対する薬理活性 井原賢（京都大学）
 14:50～15:05 休憩(15分)
 15:05～15:25 メダカの行動・繁殖に及ぼす環境医薬品の影響解析 長江真樹（長崎大学）
 15:25～15:45 アユの行動・繁殖に及ぼす環境医薬品の影響解析 延平裕次（長崎大学）
 15:45～16:15 話題提供：環境中に存在する化学物質の生物影響 井口泰泉（横浜市立大学）
 16:15～16:45 総合討論 征矢野清（長崎大学）
 16:45 閉会

長崎大学 海洋未来イノベーション機構
 〒851-2213 長崎市多良町1551-7（環境シナ環境資源研究センター内）
 TEL.095-850-7328 / 7311 FAX.095-840-1881

東京理科大学 研究推進機構 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
 RIST TUS
 Research Institute for Science & Technology

わたしたちの生活と生物環境を考える

【共催】独立行政法人環境再生保全機構 環境研究総合推進費「環境医薬品の魚類次世代生産への影響解析」5-1952

今年度の生物環境イノベーション研究部門・公開シンポジウムは環境研究総合推進費「環境医薬品の魚類次世代生産への影響解析」プロジェクトチームと共催で行います。わたしたちが生活のなかで使用した医薬品は環境中、特に水域に放出されます。これらを環境医薬品と呼びますが、水生動物にどのような影響を与えるのでしょうか。新たな環境問題「環境医薬品」のほか、さまざまな環境要因が動物に与える影響に焦点を当てた研究を紹介します。

【プログラム】
 13:00 開会挨拶
 13:10-13:30 征矢野清（長崎大学）
 13:30-13:50 井原賢（京都大学）
 13:50-14:10 中田典秀（京都大学）
 14:10-14:30 宮川信一（東京理科大学）
 14:40-15:40 ポスター・ショートプレゼンテーション
 15:50-16:10 長江真樹（長崎大学）
 16:10-16:30 延平裕次（長崎大学）
 16:30-16:45 休憩
 16:45-17:10 齊藤拓也（国立環境研究所）
 17:10-17:35 秋山好嗣（東京理科大学）
 17:35-18:00 白石克典（東京理科大学）
 18:00 閉会挨拶

2021年11月18日（木）
 東京理科大学葛飾キャンパス
 図書館ホール

一般公開はオンライン開催とさせていただきます。
 参加申込みは本部門HPからお願いします。

お問い合わせ先
 東京理科大学先進工学部生命システム工学科環境生命研究室
 〒125-8585 東京都葛飾区新宿6-3-1
 TEL：03-5876-1466
 交通：JR常磐線（東京メトロ千代田線）金町駅
 京成金町線 京成金町駅
 本部門HP <https://sites.google.com/view/bioinnovation>

140th Anniversary