

研究課題番号	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」
研究実施期間	令和元年度～令和3年度
研究機関名	長崎大学
研究代表者名	征矢野 清

1. 研究開発目的

本研究の目的は、環境医薬品の水環境への負荷の程度を評価し、水域生態系に及ぼすその影響を明らかにすることである。特に、環境医薬品の環境動態を明らかにするとともに、魚類を対象として、医薬品影響を分子応答・細胞応答・個体応答の各視点から研究を進め、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、それらの悪影響が個体から生態まで連動してどのように起こるのかを理解する。それは、環境医薬品の Adverse Outcome Pathway (AOP)を構築することにはほかならない。環境を健全に維持する上で最も重要な課題は、生物の次世代生産（繁殖）が健全に履行されるか否かである。そこで、具体的目標として以下の3つを設置した。1）魚類の行動と配偶子形成・産卵に及ぼす環境医薬品の影響解析を行い、環境医薬品による個体応答を探る。2）環境医薬品に対する標的受容体の応答（分子・細胞応答）を調べ、それを活用した湖沼/河川や下水放流水の医薬品濃度（当量値）の把握を目指す。3）魚類の環境医薬品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。これらの研究を通して、医薬品の開発・利用・処理の適正化に向けた環境政策に資する科学的基盤情報を広く社会に発信する。

2. 研究目標

全体目標：水環境における医薬品の濃度（当量値）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1：1）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2：1）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3：1）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. 研究の進捗状況

サブテーマ1は計画通りに進行している。

1）メダカの行動をトラッキングソフトを用いて二次元で解析する手法を確立し、運用した。また、メダカとアユの行動を三次元解析する手法を確立した。2）数種の抗うつ薬及びGPCR 阻害薬をメダカに曝露し、特異的な行動影響（上層遊泳性の誘起）を明らかにした。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) メダカ及びアユで行動影響を引き起こした医薬品 (mirtazapine) 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、行動影響に関連する遺伝子の検索準備に寄与した。4) 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。

サブテーマ2は計画通りに進行している。

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医薬品の活性を測定した。その結果、処方量が多く、薬理活性の強い医薬品を調査対象として選定した。2) ゼブラフィッシュ受容体を組み込んだ発現プラスミドを作成し、ゼブラフィッシュ受容体に対する抗うつ薬/GPCR 阻害薬の活性を測定した。また、サブテーマ3より提供されたメダカ受容体を用いて抗うつ薬の薬理活性の評価を進めつつある。今後は、アユの遺伝子の提供を受けて薬理活性を把握する。3) 抗うつ薬及び GPCR 阻害薬について、曝露試験水試料の分析を目的とした単物質分析法と、下水処理水や河川水などの環境水の分析を目的とした一斉分析法を検討した。分析精度を確認した成分について、曝露水の分析と近畿圏の5箇所の下水処理場放流水を分析し、汚染実態に関する情報を蓄積した。

サブテーマ3は計画通りに進行している。

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4種のクローニングを終え、遺伝子を取得した。また、サブテーマ2と連携し、それらの活性の測定を終え、抗うつ薬の標的となることを確認した。GPCR のターゲット受容体もクローニングを終えた。2) アユについては、遺伝子データベースに情報が無いことから、肝臓、脳、下垂体より抽出した RNA をもとに遺伝子モデルを作成し、抗うつ薬と GPCR 阻害薬のターゲットとなるトランスポーターや受容体遺伝子の基盤情報の取得に成功した。3) 遺伝子クローニングには時間がかかることが当初から予想されていたため、医薬品曝露したメダカ及びアユの RNA シークエンス解析を始めており、既に発現変動遺伝子の初期解析を終えた。

4. 環境政策への貢献(研究代表者による記述)

- 1) 環境省環境保健部環境安全課では、水環境中で検出される医薬品等 (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」を定期的に開催している。令和元年度第2回研究班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った。また、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。
- 2) 我々の研究では水環境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調査する。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。
- 3) 「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、繁殖異常につながる行動異常をエンドポイントに据えており、その成果は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ことを期待される。
- 4) 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。これは「経済再生運営と改革の基本方針 2018」の課題である「化

学物質対策に関する研究」に貢献できる。

- 5) 水環境中の濃度測定だけではなく、魚の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。

5. 評価者の指摘及び提言概要

環境中に放出され移動、残留する医薬品による魚類の次世代生産など生態系への影響を評価する興味深い研究であり、大きな成果を期待したい。従来の抗菌剤の他に、作用機序から影響の重大性を考慮して対象薬物を絞り込んで調査したのは評価できる。水域に存在する環境医薬品の種類を把握した上で、それぞれの濃度による水生生物への影響を *in-vitro* の計画に沿って研究が進められ、新たな知見が多く得られている。

これまでに得られたデータは医薬品の濃度が環境中に比較して高濃度な条件でのものが多いので、実環境を反映した研究を進めてほしい。具体的には、実際の環境中に多い物質を、濃度を何段階かに分けて、実濃度に近い濃度も含めて、実験するとよい。可能な範囲で、代謝された分解過程の医薬品についても評価が望まれる。

6. 評点

評価ランク：A