

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00583

研究課題名(和文) 下水処理水に残留する医薬品等による魚類の感染症誘発に対するリスク評価

研究課題名(英文) Monitoring of PPCPs in STP effluent and evaluation of their potencies to alter susceptibility to infectious disease in fish

研究代表者

仲山 慶 (Nakayama, Kei)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・講師

研究者番号：80380286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、下水処理場の放流水に含まれる81種類の医薬品およびパーソナルケアプロダクト(PPCPs)を通年モニタリングし、相対的に高濃度で検出されるPPCPsを明らかにした。また、コイに対して *Aeromonas salmonicida* を感染させる試験において、細菌の培養至適温度およびコイの飼育至適水温を明らかにし、コイの体サイズ依存的に *A. salmonicida* に対する感受性は変化しないことを示した。上記条件にて、コイの細菌性感染症に対する感受性の変化を指標とした化学物質の免疫系への影響を評価することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、生態毒性の観点からの免疫毒性の評価において、従来法のような免疫刺激の無い条件下で化学物質の影響を解析するのではなく、病原体に対する感受性の変化を評価する試験が可能となった。近年、当該分野における国際学会においても免疫毒性を主題としたセッションが継続的に開かれており、とくに本テーマに関する研究は高い関心を集めている。野生生物における感染症の発生に対して化学物質の関与が疑われる事例があるものの、未だその証明には至っておらず、本研究で提案する手法が免疫毒性評価の推進に大きく貢献出来ると考えている。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have monitored 81 compounds of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in effluent of a sewage treatment plant through a whole year, and have identified some certain PPCPs such as NSAIDs, anti-ulcer agents, and antihistamic agents, whose levels in the effluents are relatively high. We also optimized the method of experimental infection test using common carp (*Cyprinus carpio*) as a host and *Aeromonas salmonicida* as a pathogen. We fixed the temperature for culturing the bacteria at 20 degrees C, and decided to conduct the infection test around 23 degrees C. Additionally, size-dependent alteration of susceptibility in carp against *A. salmonicida* was evaluated. We found that body size of carp unaffected the susceptibility, when we use the fish whose body weight are between 1.6 to 8.0 g. Using the fixed experimental conditions, immunomodulatory effects of chemicals will be evaluated.

研究分野：環境毒性学

キーワード：免疫毒性 医薬品 下水処理水 コイ *Aeromonas salmonicida*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学物質の曝露が野生生物における感染症の発症リスクを高めていることが疑われる事例が報告されている。具体的には、米国では農薬の曝露量が増えるに従って両生類の吸虫感染リスクが増大することが示されている¹⁾。また、スイスでは産業化に伴う化学汚染の発生がブラウントラウトの寄生虫感染症の拡大を引き起こしたことが示唆されている²⁾。我々も瀬戸内海のスナメリにおいて、体内に蓄積した有機スズ化合物濃度と肺線虫感染の重症度との間に有意な関係があることを明らかにし、有機スズ汚染が寄生虫感染リスクを高めた可能性を示した³⁾。このように、化学物質への慢性的な曝露に起因する免疫系の機能不全が感染症のまん延に關与している可能性が指摘されている。

化学物質と感染症との関連性を解析する上で免疫毒性の評価は必須であるにもかかわらず、水生生物において化学物質が免疫系に及ぼす影響を評価する確固たる手法は確立されていないのが現状である。従来法では、免疫刺激の無い条件下で、*in vivo*もしくは*in vitro*での化学物質の曝露による白血球の活性の変化を検出する手法がとられてきたが、そこで観察される影響は必ずしも感染症に対する感受性の変化を引き起こすとは限らない。したがって、近年では化学物質を曝露した個体に病原体を感染させ、感染症の発症をエンドポイントとした新たな手法が用いられ始めている。臭素系難燃剤 (PBDEs) を添加した飼料を与えたマスノスケはピブリオ病によるへい死率が上昇することが報告されている⁴⁾。このような感染実験と曝露試験を組み合わせた手法を実験モデル魚の一種である海産メダカに適用するために、利用可能な病原体の検討もなされている⁵⁾。病原体の感染に対する免疫応答への化学物質の作用を解析することが、今後の免疫毒性評価の主流になると考えられる。

環境汚染物質のうち免疫毒性を有することが知られている化合物として、ベンゾピレンや有機スズ化合物が挙げられ、魚類の免疫系への影響についても報告されている^{6,7)}。一方、最近では下水処理水中に残留する医薬品による免疫抑制作用が懸念されている⁸⁾。医薬品は高い生物活性を有するように設計されているため、低濃度でも生物に影響を及ぼし得るが、現行の法制度では医薬品の生態毒性評価は義務づけられていない。したがって、医薬品の水生生物に対する影響については不明な点が多い。医薬品のなかには抗炎症作用を有するものが多く含まれ、中でもジクロフェナクやインドメタシン、イブプロフェンなどに代表される非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) は国内外の下水処理水から数百 ng/L ~ 数 µg/L と比較的高濃度で検出されることが報告されており⁹⁾、それらの化合物が水生生物における感染症に対する感受性に及ぼす影響を明らかにする必要がある。また、医薬品のなかには、免疫系に作用することを意図せずに設計されたにもかかわらず、副次的に免疫系に悪影響を及ぼすものも存在する⁸⁾。それ故、個々の医薬品による水生生物への影響はもちろんのこと、これらの複合的な影響も考慮したりリスク評価が急務である。

2. 研究の目的

我々のこれまでの研究で、ヒラメ¹⁰⁾やメダカ¹¹⁾、コイ¹²⁾を対象に化学物質の存在下で病原体の感染に対する感染症の発症や宿主の免疫応答を検出することを可能とした。とくに、コイを対象にした実験系については、平成 26~27 年度に実施した若手研究 B (26740030) で検討を重ね、病原性細菌である *Aeromonas salmonicida* の浸漬感染が簡便かつ高い再現性で感染症を引き起こすことが示され、陽性対照として用いたデキサメタゾンの高濃度曝露によって同感染症によるコイの死亡率が著しく上昇することも報告した¹³⁾。したがって、コイと *A. salmonicida* の宿主-病原体の組み合わせで化学物質の感染症に対する感受性への影響を評価することとした。多くの化学物質の影響を評価するにあたり、省スペースおよび使用する化学物質の量を最小化する必要があるが、そのためには実験系のスケールダウンが必要となる。しかしながら、コイの成長段階と *A. salmonicida* に対する感受性との関係や、感染実験を実施する際の至適水温など、いくつかの試験条件が未確定のままであったため、これらの検討を行った。事前の検討では、図 1 に示す通り、小型のコイにおいて発症しない傾向にあったことから、体サイズに依存した感受性の変化の有無について重点的に検証した。また、下水処理水に残留した医薬品およびパーソナルケア製品 (PPCPs) を定期的にモニタリングすることで、優先的に評価すべき物質のスクリーニングを行った。

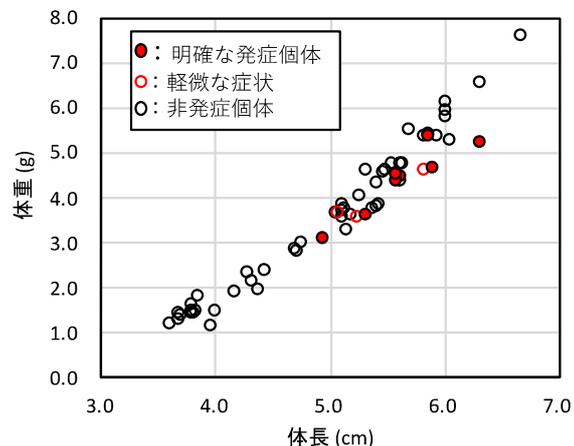


図 1. *Aeromonas salmonicida* 感染実験の予備検討における発症および非発症個体の体長と体重の関係。

3. 研究の方法

(1) 下水処理水における PPCPs モニタリング

2017 年に愛媛県内の下水処理場にて、2 週間に 1 回の頻度で処理水を採取した。81 種類の

PPCPs を LC-MS/MS で定性・定量した。

(2) *A. salmonicida* 感染実験の試験期間の検討

魚体重約 8 g のコイを 20 L の飼育水に 15 または 16 尾入れた群をそれぞれ準備した。いずれも 20 で飼育し、*A. salmonicida* を 3.5×10^3 CFU/mL で感染させた。感染後 31 日目まで毎日症状を観察し、死亡した個体はその都度取り除いた。

(3) 体サイズの異なるコイに対する *A. salmonicida* 感染実験

体サイズの異なるコイからなる個体群 (大: 7 尾 [8.0 g], 中: 10 尾 [4.4 g], 小: 14 尾 [1.6 g]) を 3 群準備し、それぞれ 20 L の飼育水で飼育した。3 群ともに 25 で飼育し、2 群に 20 で培養した *A. salmonicida* を感染させ、1 群を非感染区とした。死亡した個体はその都度、感染後 14 日目まで生存した個体は麻酔をかけた上で、体長、体重および外観症状の有無を記録した。

(4) 温度に依存したコイの *A. salmonicida* に対する感受性の評価

体サイズの異なるコイからなる個体群 (大: 7 尾 [8.4 g], 中: 10 尾 [4.3 g], 小: 14 尾 [1.7 g]) を 4 群準備し、それぞれ 20 L の飼育水で飼育した。2 群を水温 20 で、残りの 2 群を 25 で馴化し、各温度区のコイに対し 20 または 25 で培養した *A. salmonicida* を感染させた。観察は (2) と同様に行った。

4 . 研究成果

(1) PPCPs モニタリング

モニタリング対象とした 81 種の PPCPs のうち 59 種の化合物が 50%以上の頻度で検出された。そのうち 52 種は一年を通じて検出されることが明らかとなった。多くの化合物が数十から数百 ng/L の濃度範囲で検出され、一部の潰瘍治療剤、糖尿病治療剤、人工甘味料は $\mu\text{g/L}$ のオーダーで検出された。本研究でとくに着目した NSAIDs については、ジクロフェナク (64 ~ 130 ng/L) やインドメタシン (74 ~ 200 ng/L) が相対的に高濃度で検出された。

(2) *A. salmonicida* 感染実験期間の検討

感染後 3 日目に最初の発症個体が観察され、9 日目にかけて急激に発症率が上昇した (図 2)。感染から 16 日目に死亡個体が観察された一方で、症状が改善する個体も観察された。この結果から、化学物質が *A. salmonicida* に対する感受性に及ぼす影響を評価する際に発症率をエンドポイントとするならば、回復する個体が出現する以前の感染後 2 週間程度で試験を実施することが望ましいと考えられた。

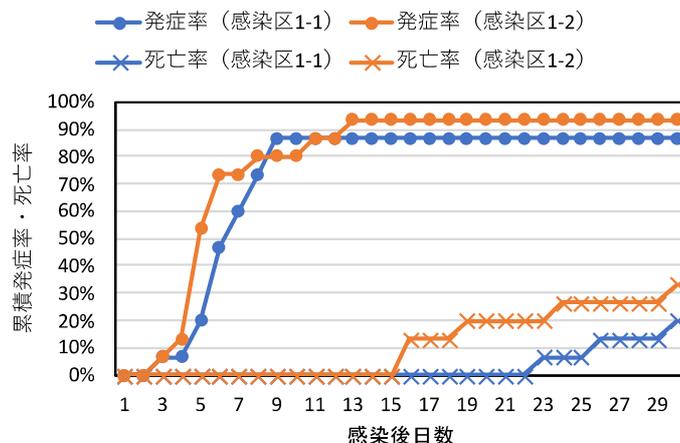


図 2. *Aeromonas salmonicida* 感染実験の試験期間を検討した際の累積発症率と死亡率の推移

(3) 体サイズと *A. salmonicida* に対する感受性との関係

A. salmonicida 感染から 14 日目での感染 2 区での発症率は 38.7% と 26.7% であり、死亡個体はそれぞれ 1 個体、2 個体であった。この時のそれぞれの試験区における各個体の体長と体重をプロットしたものを図 3 に示す。試験区間での体長および体重の違いは見られなかった。また、感染 2 区における発症個体の体長および体重に偏りは見られなかった。

我々が実施した予備試験の結果から、魚体重 3.0 g 未満の個体は *A. salmonicida* に対する感受性が低く、それよりも大きい個体が発症する感染条件であってもほぼ発症しないと予想していたが、この予想は明確に否定された。少なくとも、魚体重が 1.6 ~ 8.0 g の間においては、コイの *A. salmonicida* に対する感受性に体サイズ依存的な違いは無いと結論づけられた。

(4) 体サイズおよび温度と *A. salmonicida* に対する感受性との関係

A. salmonicida の培養温度による発症率の違いを評価したところ、25 で培養した場合と比較して、20 で培養した細菌を感染させた試験区の方が明確に高い発症率を示した。また、コイの飼育水温による違いを観察した結果、25 で飼育した時の方が、20 で飼育した試験区よりも、高い発症率および死亡率を示した。ただし、25 で飼育した試験区では、発症個体の半数ほどの個体で外観的症状が改善していた。さらに、本実験においても、コイの体サイズによる感受性の違いはみられなかった。

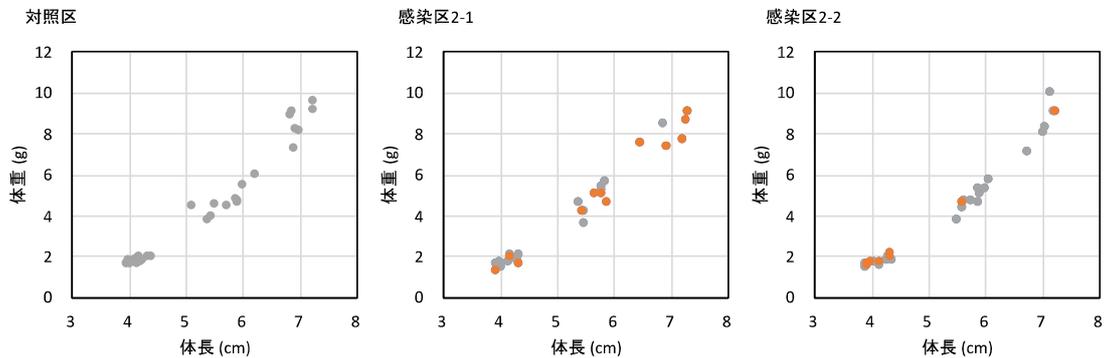


図3. 体サイズと *Aeromonas salmonicida* に対する感受性を評価した試験における、試験区ごとの各個体の体長と体重の関係。オレンジのプロットが発症した個体を表す。

A. salmonicida の病原性因子にはいくつかの候補があるが、細胞壁に存在する A-layer と呼ばれる層がそのひとつとして挙げられる。*A. salmonicida* を比較的高温で培養すると、A-layer を構成するタンパク質が発現しなくなり、同時に病原性が消失することが報告されている¹⁴⁾。我々が使用した菌株では未確認であるが、同様の理由により、25℃で培養した細菌を感染させた試験区では発症率が低くなったと予想された。

本研究の結果、少なくとも我々が使用した体サイズの範囲においては、コイの *A. salmonicida* に対する感受性には違いがないことが明らかとなり、試験の目的に応じてコイのサイズを選択することが可能となった。また、感染に使用する *A. salmonicida* は 20℃で培養することとした。さらに、コイの飼育水温は 20℃から 25℃の範囲で差し支えないが、20℃では発症するまでに時間がかかること、25℃では死亡率が高くなる一方で回復する個体が出現することから、化学物質の曝露による影響を検出するためには、23℃程度で試験を行うのが望ましいと考えられた。

<引用文献>

- 1) Rohr, J. R. *et al.* Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature* **455**, 1235–1239 (2008).
- 2) Burkhardt-Holm, P. *et al.* Where have all the fish gone? *Environ. Sci. Technol.* **39**, 441A–447A (2005).
- 3) Nakayama, K. *et al.* Temporal and spatial trends of organotin contamination in the livers of finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides*) and their association with parasitic infection status. *Science of The Total Environment* **407**, 6173–6178 (2009).
- 4) Arkoosh, M. R. *et al.* Disease susceptibility of salmon exposed to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Aquatic Toxicology* **98**, 51–59 (2010).
- 5) Ye, R. R. *et al.* Immune competence assessment in marine medaka (*Orzias melastigma*)—a holistic approach for immunotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research* **24**, 27687–27701 (2017).
- 6) Carlson, E. A., Li, Y. & Zelikoff, J. T. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquatic Toxicology* **56**, 289–301 (2002).
- 7) Nakayama, A. *et al.* Effects of tributyltin on the immune system of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquatic Toxicology* **83**, 126–133 (2007).
- 8) Huemer, H. P. Possible immunosuppressive effects of drug exposure and environmental and nutritional effects on infection and vaccination. *Mediators Inflamm.* **2015**, 349176 (2015).
- 9) Shanmugam, G., Sampath, S., Selvaraj, K. K., Larsson, D. G. J. & Ramaswamy, B. R. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Indian rivers. *Environmental Science and Pollution Research* **21**, 921–931 (2013).
- 10) Song, J.-Y., Nakayama, K., Murakami, Y. & Kitamura, S.-I. Heavy oil exposure induces high mortalities in virus carrier Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Marine Pollution Bulletin* **63**, 362–365 (2011).
- 11) Kitamura, S.-I., Akizuki, M., Song, J.-Y. & Nakayama, K. Tributyltin exposure increases mortality of nodavirus infected Japanese medaka *Oryzias latipes* larvae. *Marine Pollution Bulletin* **124**, 835–838 (2017).
- 12) Nakayama, K., Yamashita, R. & Kitamura, S.-I. Use of common carp (*Cyprinus carpio*) and *Aeromonas salmonicida* for detection of immunomodulatory effects of chemicals on fish. *Marine Pollution Bulletin* **124**, 710–713 (2017).
- 13) Ishiguro, E. E. *et al.* Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. *J. Bacteriol.* **148**, 333–340 (1981).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 仲山 慶, 北村真一
2. 発表標題 コイとAeromonas salmonicidaを用いた免疫毒性評価法の構築
3. 学会等名 令和2年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakayama K, Yasumoto S, Kitamura SI
2. 発表標題 Optimization of the infection test method using common carp with Aeromonas salmonicida for the assessment of immunotoxicity
3. 学会等名 SETAC North America 40th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakayama K and Kitamura SI
2. 発表標題 Proposed minimum requirements for the immunotoxicity test to assess chemically induced alteration of susceptibility to pathogen in fish
3. 学会等名 SETAC North America 39th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲山 慶, 北村真一
2. 発表標題 病原体に対する感受性の変化をエンドポイントとした免疫毒性の評価～最近の動向～
3. 学会等名 第24回日本環境毒性学会研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakayama K and Kitamura SI
2. 発表標題 Determination of suitable host-pathogen combinations to detect the chemical effects on susceptibility to infectious disease
3. 学会等名 SETAC North America 38th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

魚類免疫毒性評価 http://www.team-fische.com/bio/?cat=48 魚類免疫毒性評価 http://www.team-fische.com/bio/?cat=48
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	北村 真一 (Kitamura Shinichi) (40448379)	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・准教授 (16301)	
連携研究者	田上 瑠美 (Tanoue Rumi) (60767226)	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・助教 (16301)	