

令和 2 年 9 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18206

研究課題名(和文) 生理活性化学物質の魚類への移行/残留性の解析および生物濃縮性予測モデルの構築

研究課題名(英文) Prediction of uptake and elimination of biologically active substances in fish species

研究代表者

田上 瑠美 (TANOUE, RUMI)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・助教

研究者番号：60767226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品類やパーソナルケア製品に含まれる生理活性化学物質(PPCPs)78種を対象に魚類への移行残留性を調査した。試験魚を公共下水処理水に曝露し、移行残留性の指標である生物濃縮係数(魚/水の濃度比、以下BCF)、取込速度定数、排泄速度定数を解析した。実測したBCFが化学物質の脂溶性に基づき予測される値に比べ1桁以上高値であった物質(ハロペリドールやクロルフェニラミンなど)の取込速度定数は比較的高値を示したことから、脂質だけでなくたんぱく質との特異的結合が推察された。実測したBCFが予測値の2桁以上低値であった物質の排泄速度定数は比較的高値を示したことから、速やかな代謝・排泄が要因と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学物質の生理活性は一般に生体内濃度が閾値を超えることで発現することから、生物体内濃度、特に取込・分布・代謝・排泄(以下、ADME)の理解が重要と考えられる。本研究によりPPCPsの水生生物への移行・残留性は、各生物種のADMEに顕著に依存することが明らかとなり、特異なたんぱく結合を示す物質や比較的代謝・排泄されやすい物質の存在が示された。本研究において得られた魚類におけるPPCPsのADMEに関する知見は、ADMEの機能差を考慮した生物濃縮性予測手法の確立に役立つことが予想され、生物種間の外挿・類推に付随する不確実性の低下および生態毒性・生物濃縮性試験の削減が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We determined the uptake and depuration kinetics of 78 PPCPs in three fish species, to examine the factors causing the discrepancy between the bioconcentration factors predicted on the basis of chemical lipophilicity (BCF_{predicted}) and the bioconcentration factors calculated from the measured PPCP concentrations in the water and fish (BCF_{measured}). When comparing BCF_{measured} with the BCF_{predicted}, similar values were observed for >58% of detected compounds. On the other hand, BCF_{measured} were 2-4 orders of magnitude lower than the BCF_{predicted} for some compounds. This was likely due to rapid metabolism and excretion of these compounds, as the calculated half-lives were short. In contrast, 1-2 orders of magnitude higher BCF_{measured} than the BCF_{predicted} were observed for haloperidol and chlorpheniramine, which can be explained by a fast uptake rate and slow depuration rate. The k_1 values of the two compounds were relatively high, implying a specific partition to non-lipid components.

研究分野：環境科学

キーワード：水環境 化学物質 生物濃縮 体内動態 水生生物 魚類 移行残留性

1. 研究開始当初の背景

ヒトの生活圏で使用された化学物質の多くは、下水処理場に流入し浄化処理される。しかし、一部は十分に除去されず下水処理水を介して水環境中へ恒常的に排出されており、放流河川に棲息する水生生物はそれらに慢性的かつ複合的に曝露されている。そのような物質群の中で、医薬品類やパーソナルケア製品に含まれる生理活性化学物質 (PPCPs) が世界各国の水圏環境から高頻度で検出されており、生態系への悪影響が懸念されている。現在、それらの生態影響評価は、水生生物を用いた毒性試験により推定される予測無影響濃度と環境水中濃度を比較することにより実施されている。しかし、化学物質の生理活性は一般に生体内濃度、特に血中濃度 (厳密に言えば血中タンパク質非結合型の濃度) が閾値を超えることで発現することから、曝露影響をより正しく評価するためには、PPCPs の外部環境水濃度だけでなく生物体内濃度、特に取込・分布・代謝・排泄 (以下、ADME) の理解が重要と考えられる。水生生物における PPCPs の ADME について、知見の集積と体系的な整理、そして ADME を考慮した予測手法が確立されれば、生物種間の外挿・類推に付随する不確実性の低下および生態毒性・生物濃縮性試験の削減が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、公共下水処理水に 8-10 日間曝露され、その後脱塩素水で飼育された試験魚 (メダカ・コイ・ティラピア) を対象に、PPCPs 78 種を分析し、生物移行・残留性の指標である生物濃縮係数 (魚/試験水の濃度比、以下 BCF)、取込速度定数、排泄速度定数、消失半減期、および体内分布を解析することにより、各魚種の *in vivo* における ADME の知見を得る (図 1)。また、*in vitro* 血しょうたんぱく結合試験および肝 S9 を用いた *in vitro* 代謝試験を実施し、*in vitro* における ADME 関連因子の定量値を得る。最終的に、魚類における ADME を考慮した生物濃縮係数予測モデルの確立を目指す。

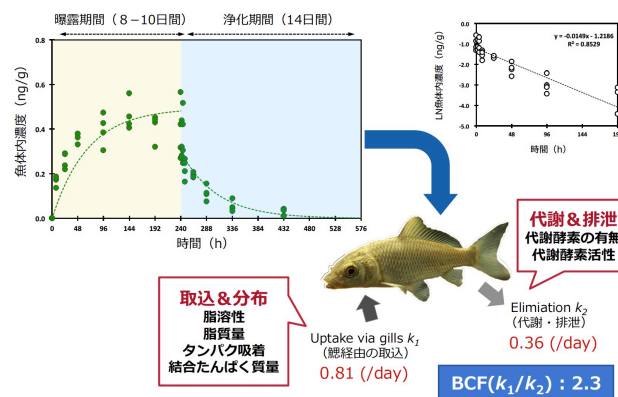


図 1 *in vivo* 下水処理水曝露試験の概要

3. 研究の方法

公共下水処理水に試験魚 (メダカ成魚・コイ幼魚・ティラピア幼魚) を 8-10 日間曝露し、これを取込期間とした。その後、試験魚を脱塩素水に移し 14 日間の浄化期間を設けた。数時間毎に試験水、試験魚のホール組織と血しょうを採取し、PPCPs 78 種の分析に供試した。BCF に加え、取込速度定数、排泄速度定数、消失半減期を算出した。また曝露 8-10 日目には、血しょう、筋肉、脳、肝臓、腎臓、えらを採取し、体内分布を解析した。

定期的に採水した試験水 (20 mL) は、Oasis HLB Plus Light Cartridge を用いて固相抽出した。抽出液を窒素気流下で濃縮後、シリンジフィルターでろ過し、最終試料溶液とした。魚血しょう試料 (20-40 μ L) は、内部標準物質および酢酸緩衝液 (pH = 4)、メタノール/アセトニトリル (1:1, v/v) を添加しボルテックス後、96-well HybridSPE®-Phospholipid に通液し、リン脂質とタンパク質を除去した。精製液を窒素気流下で濃縮し、最終試料溶液とした。魚ホール試料および臓器組織試料は、ホモジナイズ後、湿重量 100 mg に内部標準物質および酢酸緩衝液 (pH = 4)、メタノール/アセトニトリル (1:1, v/v) を添加し、超音波抽出後、遠心分離した。得られた上澄みを HybridSPE®-Phospholipid Ultra カートリッジに通液し、リン脂質とタンパク質を除去した。精製液を窒素気流下で濃縮後、シリンジフィルターでろ過し、最終試料溶液とした。対象物質は LC (Shimadzu UFLC XR) -MS/MS (ABSciex Qtrap 5500) の MRM モードで定性・定量した。イオン化法は ESI を用いた。分析カラムには Ascentis Express C18 analytical column (2.7 μ m, 100 mm \times 2.1 mm; Supelco, USA) を用いた。

血しょうたんぱく結合試験では、下水処理水に曝露した、あるいは化学物質単体を添加したティラピアとコイの血しょう試料を平衡透析し、たんぱく結合画分とたんぱく非結合画分を分離後、

それぞれの画分の被験物質濃度を測定することにより、被験物質の血しょうたんぱく結合率を算出した。平衡透析には Rapid Equilibrium Dialysis Device (8 kDa) を用いた。

肝 S9 を用いた代謝試験は、ティラピア成魚の新鮮肝を採取し、作製した肝 S9 画分溶液を用いて実施した。S9 画分の調整および代謝試験は、OECD ガイドライン TG319B に準拠した。現在、代謝試験データの収集中および解析中であるため、ここでは議論しない。

4. 研究成果

対象とした PPCPs 78 種のうち、下水処理水から 54 物質、魚のホール組織から 22 物質、魚の血しょうから 14 物質が検出された。ホール組織の BCF は、メダカ、コイ、ティラピアともに抗精神病剤の Haloperidol が最も高値を示し、次いで抗菌剤の Triclosan、抗うつ剤の Sertraline の順であった。Haloperidol の BCF は、メダカ (2,000) >ティラピア (650) >コイ (320) の順に高値を示した。血しょうの BCF は、コイでは高脂血症用剤の Gemfibrozil が最も高値を示し、次いで Sertraline の順であった。他方、ティラピアでは Haloperidol が最も高値を示し、次いで抗ヒスタミン剤の Chlorpheniramine の順であった。ティラピアの血しょうにおける Haloperidol と Chlorpheniramine の BCF は、それぞれコイの 40 倍、130 倍高値であり、ティラピアとコイ間で血中に高濃縮する PPCPs は顕著に異なることが明らかとなった。そこで Chlorpheniramine の体内分布についてティラピアとコイで比較した結果、ティラピアでは血しょう>肝臓~腎臓>脳~えら>筋肉、コイでは腎臓>肝臓~脳~えら>筋肉~血しょうの順に高濃度であり、ティラピアとコイ間で BCF に 10 倍以上の差がみられた組織は血しょうのみであった (図 2)。同様の結果は、Haloperidol でも確認され、Chlorpheniramine と Haloperidol はティラピア血中に特異的に高濃縮すると考えられる。Chlorpheniramine の血しょうたんぱく結合率は、ティラピアで 95-98%、コイで 61-74%と、たんぱく非結合型の割合に約 10 倍の差がみられ、Chlorpheniramine はティラピア血中のたんぱく質に特異的に結合するものと推察される。

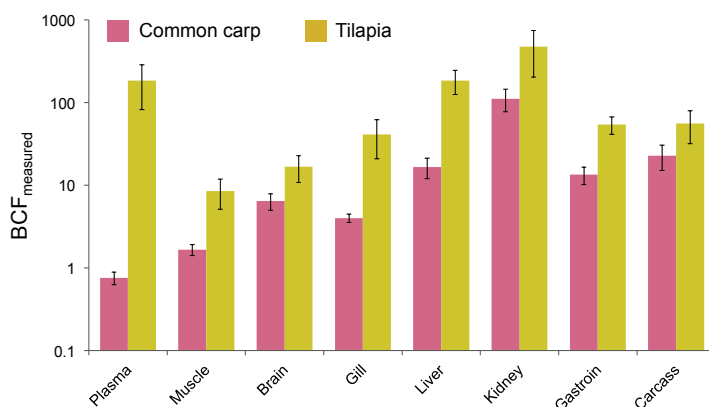


図 2 コイとティラピア間における Chlorpheniramine の組織濃度分布の比較

生物濃縮係数の実測値 ($BCF_{measured}$) と化学物質の脂溶性に基づき予測される生物濃縮係数 ($BCF_{predicted}$) を比較したところ (図 3)、58%以上の物質において $BCF_{measured}$ は誤差 1 桁以内の精度で予測可能であることが示された。一方、残余 42%については、 $BCF_{measured}$ が $BCF_{predicted}$ に比べ 1-2 桁高値を示す物質 (Haloperidol, Chlorpheniramine, Gemfibrozil) と $BCF_{measured}$ が $BCF_{predicted}$ に比べ 2-4 桁低値を示す物質 (Telmisartan, Fexofenadine, Rebamipide など) が存在した。これらの要因として、前者の場合では、取込速度定数が比較的高値を示し、また血しょうたんぱく結合率も比較的高値であったことから、脂質以外への分配 (特異的なタンパク結合など)、後者の場合では、排泄速度定数が比較的高値 (消失半減期は 1.6-20h) を示したことから、速やかな代謝・排泄が推察された (図 4)。本結果は、魚類における PPCPs の ADME を理解することが、曝露影響の予測に重要であることを示している。

結論として、本研究により PPCPs の水生生物への移行・残留性は、各生物種の ADME に顕著に依存することが明らかとなった。そのため、PPCPs による曝露リスクをより正しく評価するためには、環境水ベースの影響値ではなく体内濃度ベースの影響値の方が妥当であると考えられる。しかし、水生生物において ADME の種間差がどの程度影響値の種間差に寄与するのかは不明瞭である。今後、水生生物を対象にした PPCPs の Toxicokinetics と Toxicodynamics の関連解析および ADME を考慮した生物濃縮係数予測モデルの構築が望まれる。

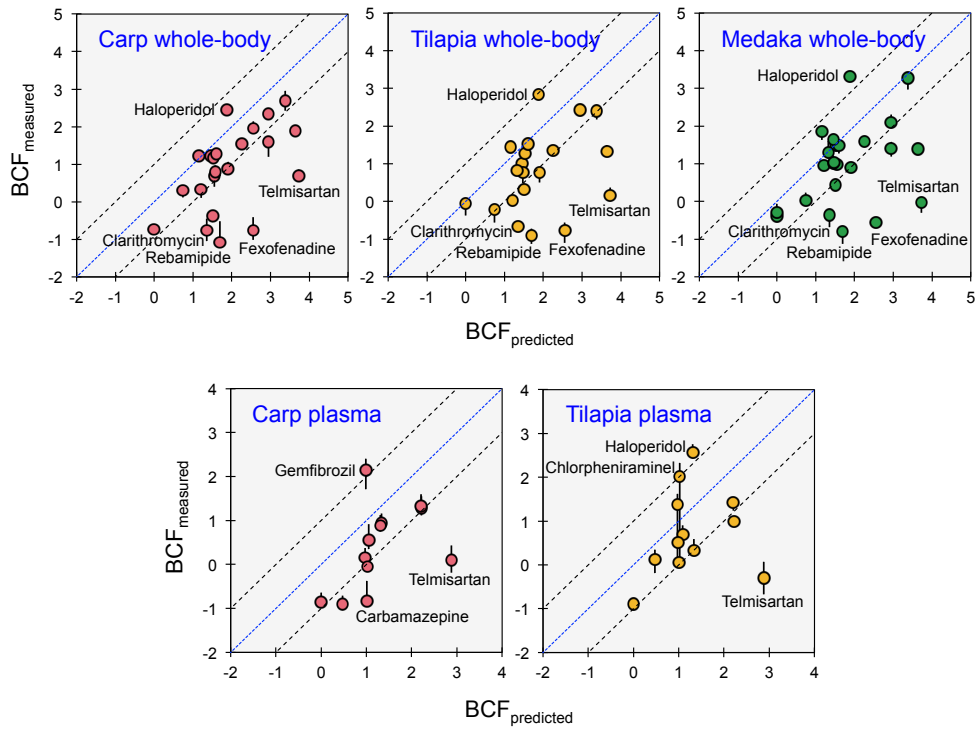


図3 生物濃縮係数の実測値 (BCF_{measured}) と予測値 (BCF_{predicted}) の比較

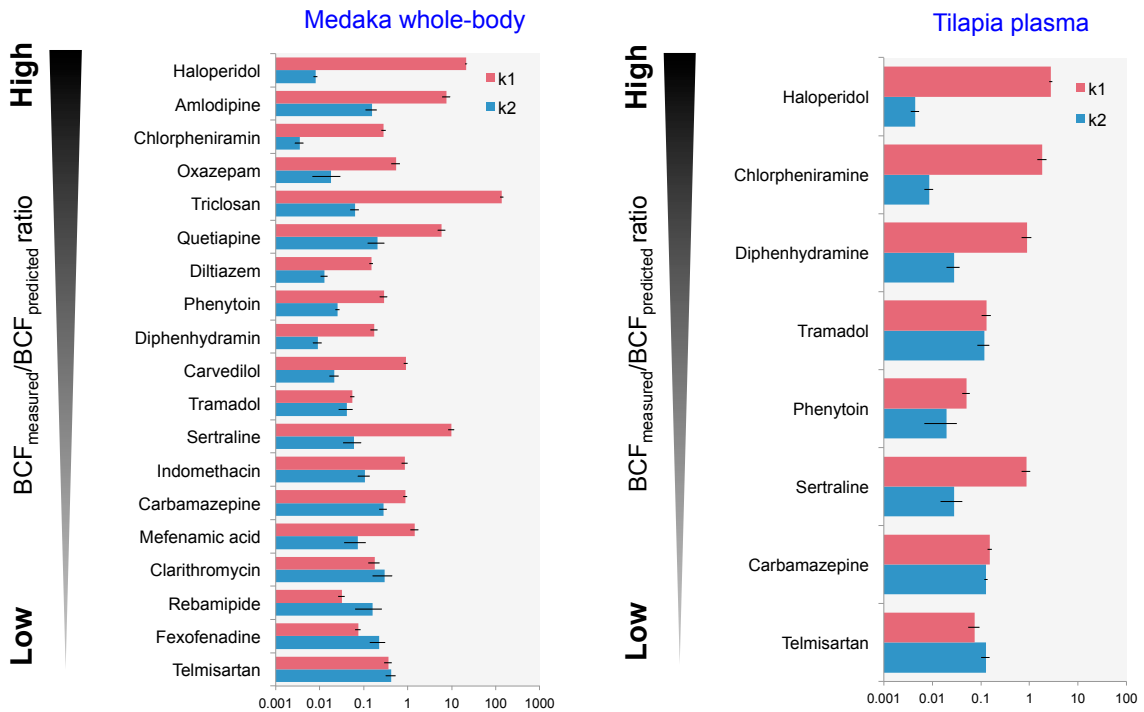


図4 メダカホール組織とティラピア血しょうにおいて算出された取込速度定数 (k₁) と排泄速度定数 (k₂)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanoue Rumi, Margiotta-Casaluci Luigi, Huerta Belinda, Runnalls Tamsin J., Eguchi Akifumi, Nomiya Kei, Kunisue Tatsuya, Tanabe Shinsuke, Sumpter John P.	4. 巻 664
2. 論文標題 Protecting the environment from psychoactive drugs: Problems for regulators illustrated by the possible effects of tramadol on fish behaviour	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 915 ~ 926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Guruge Keerthi S., Goswami Prasun, Tanoue Rumi, Nomiya Kei, Wijesekara R.G.S., Dharmaratne Tilak S.	4. 巻 690
2. 論文標題 First nationwide investigation and environmental risk assessment of 72 pharmaceuticals and personal care products from Sri Lankan surface waterways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 683 ~ 695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 野崎一茶, 田上瑠美, 野見山桂, 国末達也, 田辺信介
2. 発表標題 医薬品類およびパーソナルケア製品由来化学物質(PPCPs)による水圏生態系の汚染実態
3. 学会等名 第21回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田上瑠美, 国末達也, 向井幸乃, 後藤哲智, 田代豊, 野見山桂, 田辺信介
2. 発表標題 沖縄本島南部の河川水における医薬品類およびパーソナルケア製品由来化学物質の存在
3. 学会等名 第27回環境化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野崎一茶, 田上瑠美, 野見山桂, 国末達也, 田辺信介, 磯部友彦
2. 発表標題 医薬品類およびパーソナルケア製品由来物質(PPCPs)によるアジア途上国の水環境汚染と水生生物への影響評価
3. 学会等名 第52回日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanoue, R., Nakayama, K., Kondo M., Nomiya, K., Kunisue, T., Tanabe, S.
2. 発表標題 Toxicokinetic parameters causing the discrepancy between the measured and predicted bioconcentration factors of pharmaceuticals and personal care products in fish
3. 学会等名 Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe 29th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田上瑠美, 野崎一茶, 仲山 慶, 国末達也, 田辺信介, 野見山 桂
2. 発表標題 水生生物に残留する医薬品類およびパーソナルケア製品由来化学物質
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanoue, R., Nakayama, K., Kondo, M., Kunisue, T., Tanabe, S., Nomiya, K.
2. 発表標題 Uptake and depuration kinetics of pharmaceuticals and personal care products in fish
3. 学会等名 1th Korean-Japan Symposium on Adverse Outcome Pathways: From Exposome to Phenotypic Effects (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田上瑠美, 野崎一茶, 国末達也, 田辺信介, 野見山 桂
2. 発表標題 水生生物おける医薬品類およびパーソナルケア製品由来化学物質の残留実態と生物種間比較
3. 学会等名 大気環境学会・日本水環境学会・廃棄物資源循環学会 中国・四国支部 合同講演会「大気・水・廃棄物に関わる研究の進捗と最前線」(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	仲山 慶 (NAKAYAMA KEI) (80380286)	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・講師	
研究協力者	野見山 桂 (NOMIYAMA KEI) (30512686)	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・准教授	