

東京大学大学院新領域創成科学研究科  
環境学研究系自然環境学専攻  
自然環境循環学分野

平成 27 年度

修士論文

ニセネコゼミジンコを用いた医薬品の回復試験の提案

(Proposal of recovery test for the pharmaceuticals  
using *Ceriodaphnia dubia*)

2016 年 1 月 21 日 提出

指導教員 鑪迫 典久 教授  
47-46609 川久保 雄揮

## 目次

第1章 序論	4
1. 1. 背景	4
1. 2. 目的	5
第2章 医薬品の繁殖試験	6
2. 1. 目的	6
2. 2. ミジンコの系統と飼育	6
2. 3. 試験方法	6
2. 4. 試験用ニセネコゼミジンコの条件	6
2. 5. 被験物質	7
2. 6. 試験結果と考察	9
2. 6. 1. 産仔数と致死率	9
2. 6. 2. NOEC と EC50	12
第3章 医薬品と標準物質の回復試験	13
3. 1. 目的	13
3. 2. 既存の回復試験に関する研究の事例	13
3. 3. ニセネコゼミジンコの生涯産仔数の推移	14
3. 4. 試験方法	14
3. 5. 被験物質	15
3. 6. 試験結果と考察	16
3. 6. 1. 標準物質の繁殖試験	16
3. 6. 2. 回復試験	17
第4章 医薬品の分類ごとの回復試験結果とその比較	23
4. 1. 目的	23
4. 2. 被験物質	23
4. 3. 試験方法	24
4. 4. 結果	25
4. 4. 1. 第3章で扱った医薬品の再試験	25
4. 4. 2. 同種の医薬品の回復試験	27
4. 5. 考察	32
4. 5. 1. 第3章で扱った医薬品の再試験	32
4. 5. 2. 同種の医薬品の再試験	32
第5章 繁殖試験結果に基づく回復試験結果の予測	34
5. 1. 繁殖試験結果と回復に要する日数の関係	34
5. 1. 1. 繁殖試験における繁殖阻害率と回復に要する日数の関係	34

5. 1. 2. 繁殖試験における致死率と回復に要する日数の関係	35
5. 2. 影響を受けたミジンコの体長と回復性の関係	36
5. 3. まとめ	37
第6章 総括	38
謝辞	39
引用文献	40

## 第1章 序論

### 1. 1. 背景

医薬品は人類にとって必要不可欠な物質である一方、環境中に放出されると野生生物に悪影響を与える可能性が考えられる。欧米では 1980 年代から医薬品による水環境汚染が問題視され、河川水や湖水、地下水など水環境での医薬品の存在実態や挙動が明らかにされてきた(Richardson and Bowron, 1985; Aherne et al., 1990)。近年、医薬品の環境影響評価のためのガイドラインが、ヨーロッパでは欧州医薬品庁(European Medicines Agency; EMEA)、米国ではアメリカ食品医薬品局(Food and Drug Administration; FDA)で示されている(EMEA, 2005; U. S. FDA, 1998)。日本においては、化学物質による環境の汚染を防止することを目的とした法律として「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法)があり、人の健康を損なう恐れおそれや動植物の生息・生育に支障を及ぼすおそれのある化学物質について上市前に事前審査、上市後にも継続的な管理がなされているが、他の特定の法律で管理されている物質は化審法適用の対象外であり、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」(薬機法)で管理されている医薬品もその一つである。しかしながら薬機法には化審法のように環境汚染防止を目的とした規則がなく、現行では環境汚染防止のために医薬品を管理する法律は存在しない。日本では 21 世紀に入るまで、医薬品の環境影響についてはほとんど問題視されていなかったが、今日では水環境中における医薬品の分析法や存在実態に関する知見が増えている(清野ら 2004; 久保田ら 2008; 田中 2008; 鈴木ら 2010; etc.)。しかし環境中医薬品による水環境中に生息する水生生物への悪影響についての報告はほとんどない(福永ら 2006)。そのため、水生生物を用いて医薬品の毒性試験を行う必要がある。

毒性試験の手法については、OECD や Environment Canada などのガイドラインで指定されており、それらの手法に則って医薬品の毒性試験を行えば、医薬品の環境影響を評価するうえで有益なデータとなることが期待できる。上述のガイドラインで示された毒性試験手法は、主に藻類、甲殻類、魚類に属する生物が用いられ、藻類の試験では生物量または細胞数、甲殻類の試験では死亡率や産仔数など、魚類の試験では孵化数、生存率、体形異常などをエンドポイント(評価軸)として毒性値を求める。日本国外においては水生生物を用いた医薬品の毒性試験例は少なくなく、様々な医薬品の毒性値が明らかになっている(Huggett et al., 2002; Goolsby et al., 2013; etc.)。しかし医薬品の環境影響に関しては未だ不明な点が多く残されている。

ところで、厚生労働省所管の独立行政法人医薬品医療機器総合機構による「医薬品毒性試験法ガイドライン」では、医薬品の製造・輸入の承認を申請する際に行われる医薬品の安全性に関する試験法が示されている。その中の項目の一つに医薬品の毒性からの回復性を問う試験について記されており、これは「回復試験」と呼ばれる。しかし水生生物に対

して医薬品の毒性作用の回復性に着目した例はほとんど見当たらない(Hayashi et al., 2008)。医薬品の水生生物に影響を及ぼす濃度での水環境中への放出が一時的な場合、その医薬品の毒性影響が可逆的であれば、結果的に環境への影響は小さいと考えられる。そこで水生生物の場合にも毒性の回復性を調べる試験を行うことは有意義と考える。一部の医薬品のほかには殺虫剤などを被験物質として回復試験が行われた研究例があり (Brain, 2012; Sancho et al., 2015; etc.)、被験物質の悪影響を受けた水生生物が、その物質の無い環境に戻された後に悪影響から回復するかどうかに関するデータは、潜在的な影響を正確に表すという指摘もある(Brain, 2012)。しかしながら、この点に焦点を置いた研究例が少ないため、試験法のガイドラインも存在しない。よって毒性試験に良く使用され、感受性の高い生物の 1 つである甲殻類のニセネコゼミジンコ(*Ceriodaphnia dubia*; Environment Canada EPS1/RM/21 試験法で使用)による研究例も存在しない。ニセネコゼミジンコはライフスパンが短く、短期間で慢性毒性試験を行うことができるメリットがあり、一方で Constantine and Huggett (2010) の報告によるとオオミジンコとニセネコゼミジンコの間に種感受性差は無いとされている。そこで、本研究では、ニセネコゼミジンコを用いていわゆる回復試験を行うことで、医薬品の環境影響に関する新たな知見が得られると考えた。

## 1. 2. 目的

本研究は、以下の 3 点を主な目的として行った。

日本では医薬品の毒性影響に関する研究例が少ないため、ニセネコゼミジンコを用いて毒性試験を行い、データを取得する。

ニセネコゼミジンコを用いた毒性試験を応用して新たに考案した回復試験を行い、医薬品の毒性の回復性についての知見を得る。回復性の指標として、毒性試験で影響が認められた濃度における回復の程度、回復までの日数に着目する。

回復試験の有用性について検討する。

## 第2章 繁殖試験

### 2. 1. 目的

医薬品の環境影響について知見を得るため、東京都健康安全研究センターの鈴木俊成氏の報告から、多摩川流域で検出された上位 10 種を選び、毒性試験に供した。

### 2. 2. ミジンコの系統と飼育

実験には、国立環境研究所で 20 年以上前から継代飼育されている単一遺伝系統のニセネコゼミジンコ(*Ceriodaphnia dubia*)を用いた。つくば市の水道水を活性炭ろ過したものを飼育水として用い、15mL の飼育水を満たしたガラス製の容器（ミジンコカップ）に一個体ずつ飼育する方法（シングルカルチャー、個別飼育）とした。2 日に一度全換水を行った。継代方法としては、飼育開始から 6～8 日経過した個体が産んだ生後 24 時間以内の仔虫を新たな容器に移すことで新しく飼育を開始する方法を採用した。飼育条件は、水温  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、明期 16 時間、暗期 8 時間とした。餌は単細胞緑藻クロレラ(*Chlorella vulgaris*)と YCT(yeast, ceropyhll, and trout chow; Marincio Bioassay Laboratory, inc., Samuel St, Sarasota, FL, USA 製)を用い、ミジンコ 1 個体あたりクロレラを有機炭素換算量で 0.02-0.05mgC、YCT を  $50 \mu\text{L}$ 、それぞれ毎日投与した。

### 2. 3. 試験方法

ニセネコゼミジンコの繁殖試験は EPS/RM/21(Environment Canada,2007)に従って行った。生後 24 時間未満の個体を試験に供し、試験条件は水温  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}$ :6.5~8.5,  $\text{DO}$ :>8.00, 明期 16 時間・暗期 8 時間とした。各濃度区につきミジンコ 10 個体を供し、濃度区数は 6 または 8（対照区を含む）で行った。濃度公比は 2 または 1.4 とした。各ミジンコは試験水 15mL が入ったミジンコカップに入れ、それぞれの産仔数を毎日カウントして記録し、同時に仔虫を除去した。物質の影響濃度を示す数値には最大無影響濃度 (NOEC) および半数影響濃度(EC50)を用い、これらは繁殖試験期間中の各個体の産仔数の合計をばく露区と対照区の間で多重比較検定を行うことで算出した。EC50 の算出にはプロビット法を用いて統計処理を行った。

### 2. 4. 試験用ニセネコゼミジンコの条件

試験を開始するために、以下の条件を満たした個体を十分数含む一連のシングルカルチャー(35 個体で 1 セットのシングルカルチャー)を準備した。

- ・試験前 7 日間の平均死亡率が 20% を超えないこと
- ・試験に用いる 3 腹目以降の産仔数が 1 個体あたり 8 個体以上であること
- ・試験前 7 日間の 3 腹分の合計産仔数の平均値が 15 個体以上であること

- ・休眠卵が観察されないこと

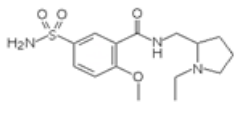
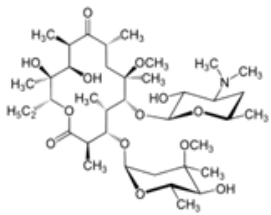
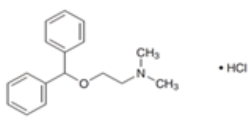
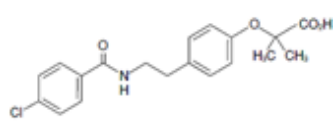
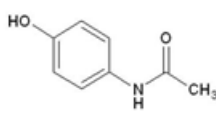
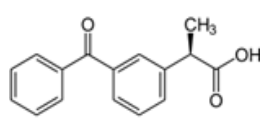
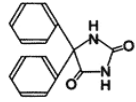
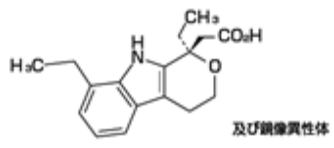
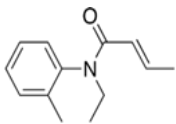
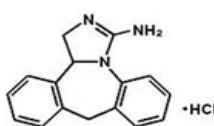
試験には、生後 24 時間以内の仔虫を供した。試験条件は、水温  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、明期 16 時間・暗期 8 時間で行い、餌は飼育条件と同様に与えた。

## 2. 5. 被験物質

東京都健康安全研究センターの鈴木俊成氏の報告（鈴木ら 2010, 鈴木 2012）から、多摩川流域にて高濃度で検出された医薬品から上位 10 種を選んだ。それらの医薬品の最高検出濃度、構造式、用途、純度、試薬メーカーは表 1 のとおりである。

溶解方法は以下の通りに行なった：ジフェンヒドラミン塩酸塩、クロタミトン、エピナスチン塩酸塩、3,4-ジクロロアニリン、3,5-ジクロロフェノール、重クロム酸カリウムは、milli-Q 水に溶かしてストック溶液を作成した。試験水としては、ストック溶液を飼育水で 100 倍希釈したものを用いた。スルピリド、クラリスロマイシン、ベザフィブラート、アセトアミノフェン、ケトプロフェン、フェニトイン、エトドラク、塩化ナトリウムは水溶解度が小さいため、毎時飼育水に直接溶解させた。

表 1 対象医薬品 10 種

医薬品名	最高検出濃度(ppb)	構造式	用途	試薬メーカー	純度
スルピリド	1.959		向精神薬	和光純薬工業株式会社	98.0%
クラリスロマイシン	1.291		抗生物質	東京化成工業株式会社	98.0%
ジフェンヒドラミン塩酸塩	1.209		抗ヒスタミン薬	東京化成工業株式会社	98.0%
ベザフィブラート	0.974		高脂血症薬	和光純薬工業株式会社	97.0%
アセトアミノフェン	0.671		解熱鎮痛薬	和光純薬工業株式会社	97.0%
ケトプロフェン	0.63		解熱鎮痛薬 (NSAID)	和光純薬工業株式会社	98.0%
フェニトイン	0.561		抗てんかん薬	東京化成工業株式会社	99.0%
エトドラク	0.463		解熱鎮痛薬 (NSAID)	和光純薬工業株式会社	97.0%
クロタミトン	0.447		鎮痒薬	和光純薬工業株式会社	99.2%
エピナスチン塩酸塩	0.415		抗アレルギー薬	東京化成工業株式会社	98.0%



## 2. 6. 試験結果と考察

### 2. 6. 1. 産仔数と致死率

10種の医薬品の繁殖試験の結果として、ミジンコの産仔数と致死率を図1に示す。検出濃度が1位であるスルピリドは最大水溶解度に近い濃度である100mg/Lにおいても産仔数に有意差が見られなかった。2位のクラリスロマイシンでも最大水溶解度に近い濃度である25mg/Lで1%有意差が見られるにとどまった。この2種の医薬品の試験ではすべてのミジンコの親個体が試験終了まで死亡せずに生存した。その他8種の医薬品についてはそれぞれの試験の最高濃度区で1%有意差がつくか親個体がすべて死亡した。エピナスチンでは最高濃度区の10mg/Lにおいて70%という高い死亡率を示したものの、生存した親個体について繁殖は完全には阻害されなかった。

濃度区の設定に際してはすべて濃度公比を2としたが、濃度区ごとの影響変化は急なもの（例：ベザフィブラート）から緩やかなもの（例：ケトプロフェン）まで、物質ごとにまちまちであった。また、ベザフィブラートやエトドラクでは最高濃度区で致死率が0なのに対して繁殖阻害率が100%となっている。一方でエピナスチン塩酸塩では最高濃度区で死亡率70%にもかかわらず生存した個体の産仔によりある程度の数の産仔がみとめられた。これらのことから、ミジンコに対する作用の仕方は医薬品ごとに異なることがうかがえる。

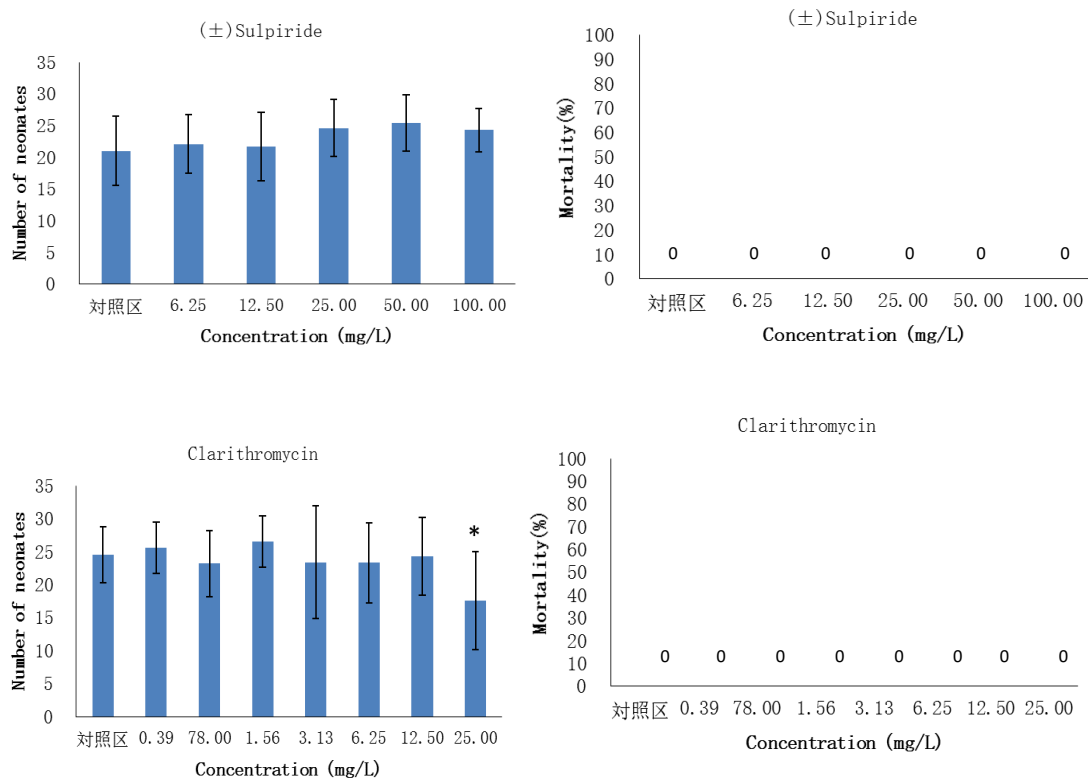


図1(1) 各医薬品の産仔数と致死率（上から順にスルピリド、クラリスロマイシン）

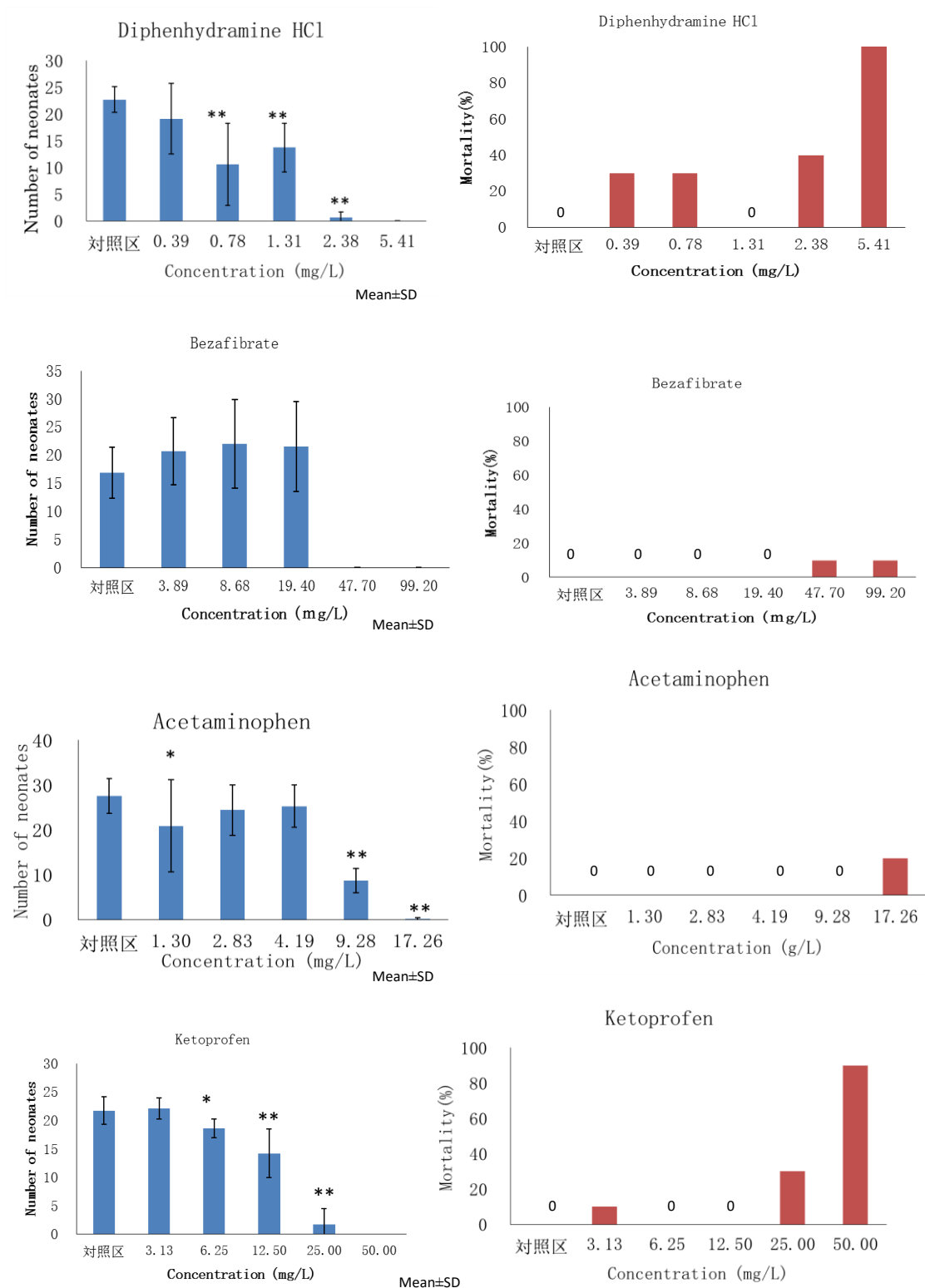


図 1(2) 各医薬品の産仔数と致死率（上から順にジフェンヒドラミン塩酸塩、ベザフィブラート、アセトアミノフェン、ケトプロフェン）

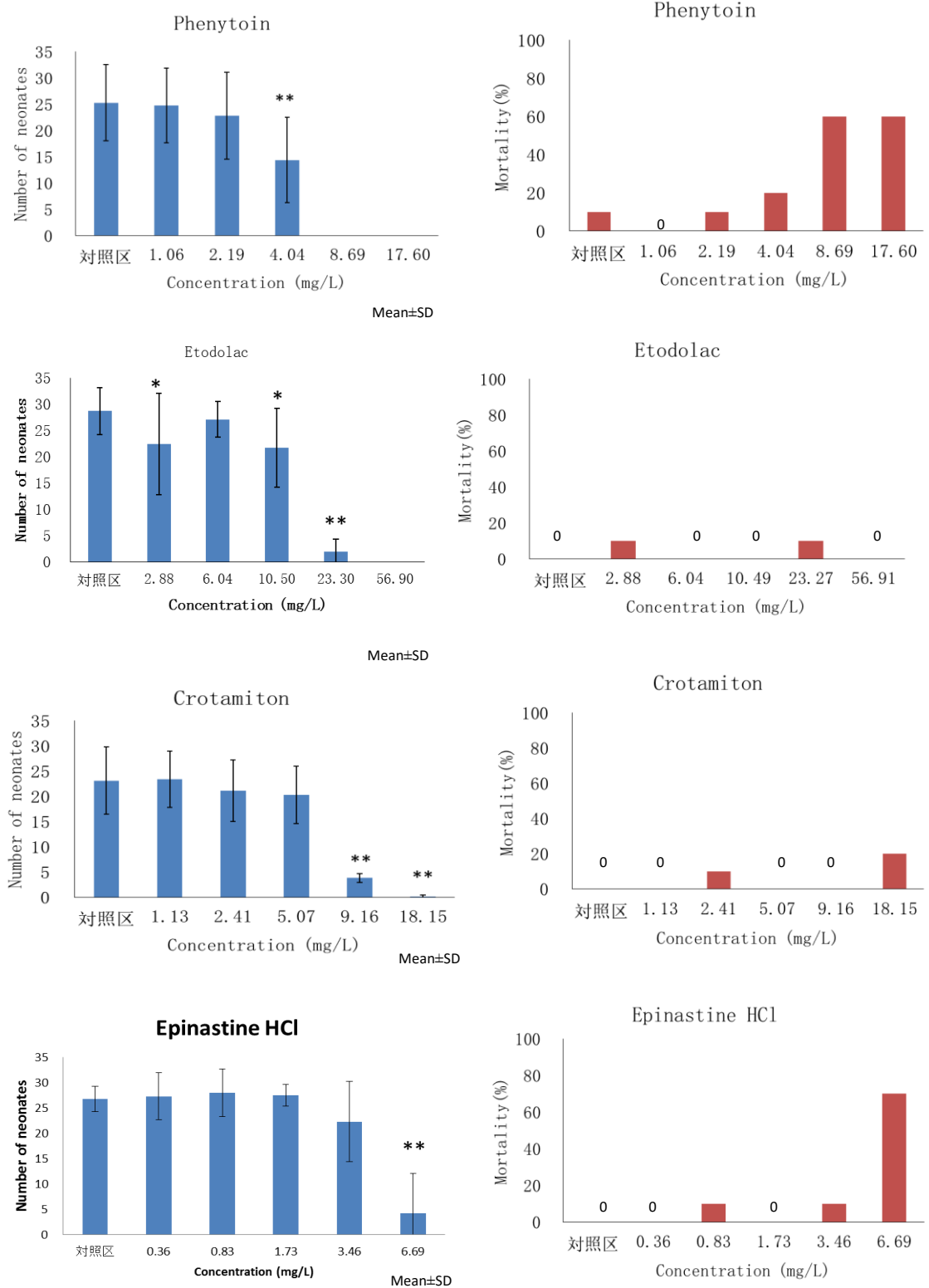


図 1(3) 各医薬品の産仔数と致死率（上から順にフェニトイン、エトドラク、クロタミトン、エピナスチン塩酸塩）

## 2. 6. 2. NOEC と EC50

試験を行った医薬品の NOEC と EC50 を、先述した河川中での検出濃度とともに表 2 に示す。スルピリド、クラリスロマイシン、ベザフィブラートの 3 種はプロビット法が適用されず、EC50 は算出されなかった。全ての医薬品の影響濃度は河川水中での検出濃度と比較して 100～10000 倍高い濃度である。このことから実際に河川水中に存在するこれらの医薬品が環境に影響を与えている可能性は低いと考えられる。この点はメダカ（魚類）、オオミジンコ（甲殻類）、プセウドキルクネリエラ属（藻類）を用いた医薬品の毒性試験結果 (Yamamoto et al., 2007) と一致している。

表 2 各医薬品の NOEC, EC50, 多摩川における検出濃度

試験を行った医薬品	NOEC(mg/L)	EC50(mg/L)	検出濃度( $\mu$ g/L)
スルピリド	>100 a	>10 0 a	1.959
クラリスロマイシン	12.5 a	>25 a	1.291
ジフェンヒドラミン	0.39	1.36	1.209
ベザフィブラート	19.4	19.4<, <47.7	0.974
アセトアミノフェン	4.19	9.280	0.671
ケトプロフェン	3.13 a	13.200 a	0.63
フェニトイン	2.19	4.450	0.561
エトドラク	6.04	12.100	0.463
クロタミトン	5.07	6.470	0.447
エピナスチン	3.46	4.770	0.415

a 設定濃度

## 第 3 章 回復試験

### 3. 1. 目的

第 2 章では、実際の河川中で検出された医薬品の毒性についてニセネコゼミジンコを用いて試験を行い、毒性値を求めた。本章では、繁殖試験で医薬品の影響を受けたミジンコが、医薬品の溶けていない水に移された際に正常な状態になるかどうかを観察し、医薬品の毒性変化が可逆的であるかどうかを判断するため、回復試験を行った。繁殖試験と同様に、ばく露区と対照区の間で産仔数の多重比較検定を行い、毒性試験で影響が認められた濃度における回復の程度、日数について検討した。また、毒性試験の標準物質で同様の試験を行い、影響の回復性が医薬品特有のものであるかどうかを確認した。

### 3. 2. 既存の回復試験に関する研究の事例

既存の研究には、オオミジンコ(*Daphnia magna*)を用いて回復試験を行った例が、数は少ないものの存在する。例えば医薬品の回復試験では Hayashi et al.(2008)がイブプロフェンの試験を、医薬品以外では E. Sancho et al. (2015)が農薬のテブコナゾールの回復試験を、ともにオオミジンコを用いて行っている。これらの研究においてばく露区と対照区の比較には、1頭あたりの産仔数、ミジンコの体長、生存率などを用いている。このうち Hayashi et al. (2008)の研究における産仔数の比較には試験期間中の累積産仔数を用いており、その推移は図2のグラフのとおりである。Hayashi et al. (2008)はこのグラフと産仔数の元データから、「ばく露期間の産仔数は、20mg/L, 40mg/Lにおいては対照区と比較して少なく、80mg/Lではまったく産仔を行わなかった。しかしながら回復期間の終わりまでに産んだ仔虫の総数は20mg/Lでは対照区と有意な差がついておらず、40mg/Lと80mg/Lにおいても対照区には追い付かなかったもののある程度の回復を示した」としている。しかしながら40mg/Lと80mg/Lにおける回復度合いについて、影響がある、または無い、といった言及はされていない。本研究の回復試験ではこの点についての考察を加える。

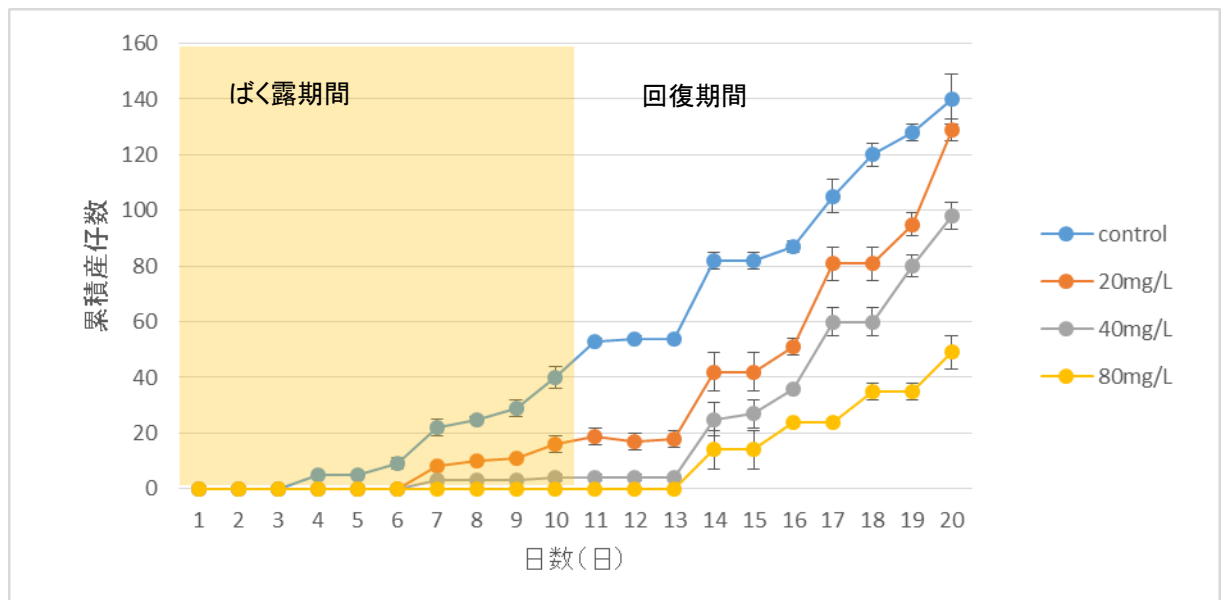


図2 Y. Hayashi et al. (2008) による回復試験におけるオオミジンコの産仔数推移

### 3. 3. ニセネコゼミジンコの生涯産仔数の推移

医薬品の回復試験を行うにあたり、観察を何日間行えば回復の有無を判断することが可能かを知るため、ミジンコ 10 頭を全ての個体が死亡するまで飼育水で飼育し、産仔数を毎日カウントした。最も寿命が長かった個体は日齢 40 日まで生存したが、1 日当たり・1 頭当たりの平均産仔数は生後 10 日頃より減少し始め、生後 2 週間を過ぎると産仔数がごくわずかになった。このことから、本研究の試験期間は 14 日間とした。

### 3. 4. 試験方法

回復試験の全体的な流れを図 3 に示す。回復試験はミジンコに被験物質をばく露する前半と被験物質を含まない飼育水を用いる後半に分けられる。前半は繁殖試験と同じ手法をとる。試験前半の繁殖試験の条件が成立し、かつ、一部の濃度区で影響が見られた場合、使用するミジンコの親個体を全て飼育水に移して回復試験後半とした。後半は物質のばく露以外の試験条件を前半と同様にした。各個体の産仔数を毎日カウントして記録し、同時に仔虫を除去した。試験日数は前半と後半を含めて 14 日間とした。

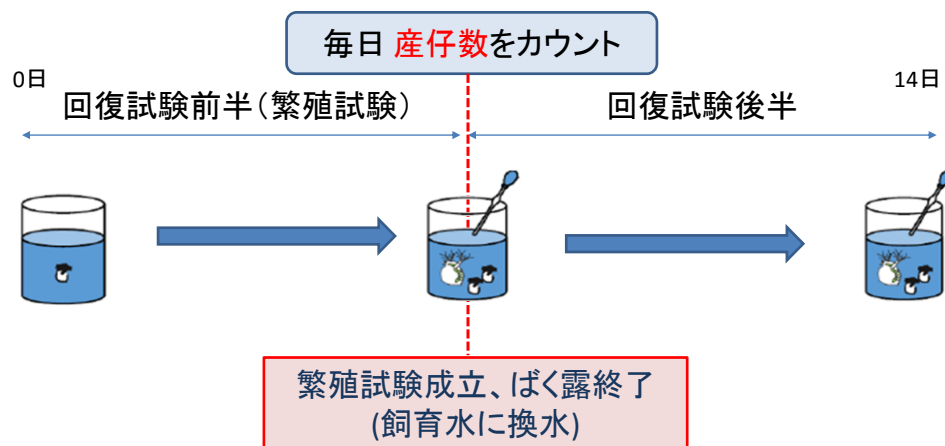


図 3 回復試験の流れ

回復試験結果のモデル図を図 4 に示す。試験前半で物質による影響を受けたミジンコがばく露終了後にどの程度の数の産仔を行うかから、回復の有無と回復に要する日数を観察した。

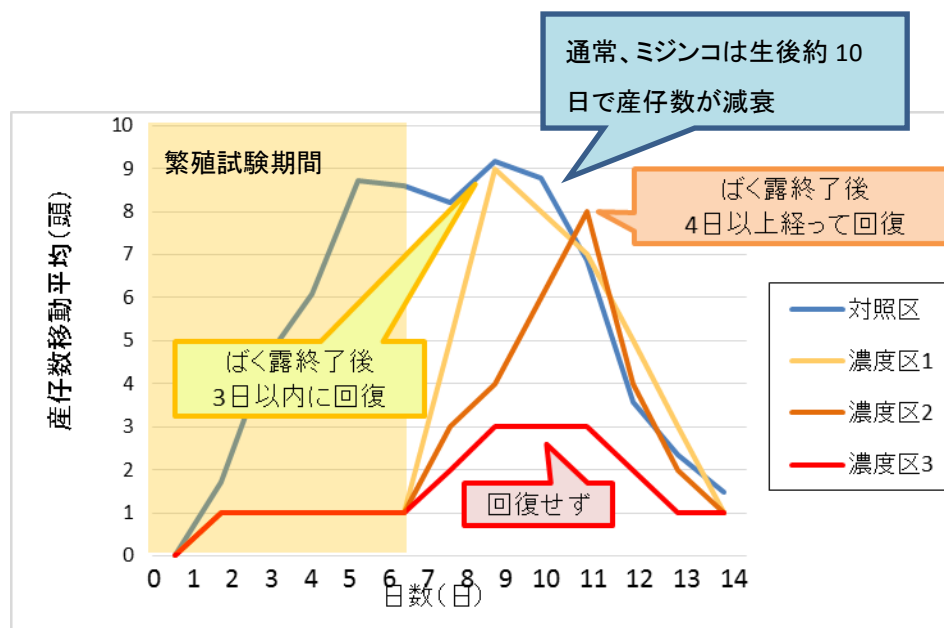


図4 回復試験結果のモデル図

また、同一濃度区内のすべての親個体は2～3日の周期で産仔するため、1日ごとの産仔数のばらつきは大きい。そこで対照区とばく露区の産仔数の比較を行う際に、それぞれの産仔数の二日間移動平均値を用いた。移動平均の最高値を記録するまでにかかった日数を比較することで、ばく露終了から回復までにどの程度の日数を必要とするかを観察した。移動平均の最高値の比較を多重比較検定で行い、平均産仔数に有意差がない濃度を求め、これを最大回復濃度とした。死亡した個体については、死因が被験物質によるものかどうかを勘案して繁殖試験期間中に回復試験の産仔数の勘定から除外し、ばく露終了後に死亡した個体については死亡後の産仔数を0として計算した。

### 3. 5. 被験物質

東京都健康安全研究センターの鈴木俊成氏の報告（鈴木ら 2010, 鈴木 2012）から選んだ、多摩川流域において高濃度で検出された医薬品上位10種のうち、影響が見られなかったスルピリドと影響が小さかったクラリスロマイシンを除く8種を回復試験の対象とした。これらの回復試験については、第2章で述べた繁殖試験を回復試験前半と位置づけ、繁殖試験成立後に使用したミジンコを処分せずに回復試験後半として試験を継続した。さらに、試験結果の比較検討を行うため、毒性試験の標準物質4種（塩化ナトリウム、3,4-ジクロロアニリン、3,5-ジクロロフェノール、重クロム酸カリウム）についても試験を行った。これらの純度と試薬メーカーは表2のとおりである。



表 2 標準物質 4 種

医薬品名	試薬メーカー	純度
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	和光純薬工業株式会社	99.5%
3,4-DCA	和光純薬工業株式会社	98.0%
3,5-DCP	和光純薬工業株式会社	98.0%
NaCl	和光純薬工業株式会社	99.5%

### 3. 6. 試験結果と考察

#### 3. 6. 1. 標準物質の繁殖試験

4 種の標準物質の繁殖試験の結果として、ミジンコの産仔数と致死率を図 5 に示す。重クロム酸カリウムは 0.80mg/L 以上で全ての親個体が死亡した。その他 3 種物質ではそれぞれ全ての濃度区で死亡率が 40%以下であった。全 4 物質を通して全個体が死亡した濃度区を除き産仔が全く見られなかった濃度区は無かったが、それぞれの試験で有意差の見られる濃度区が存在した。

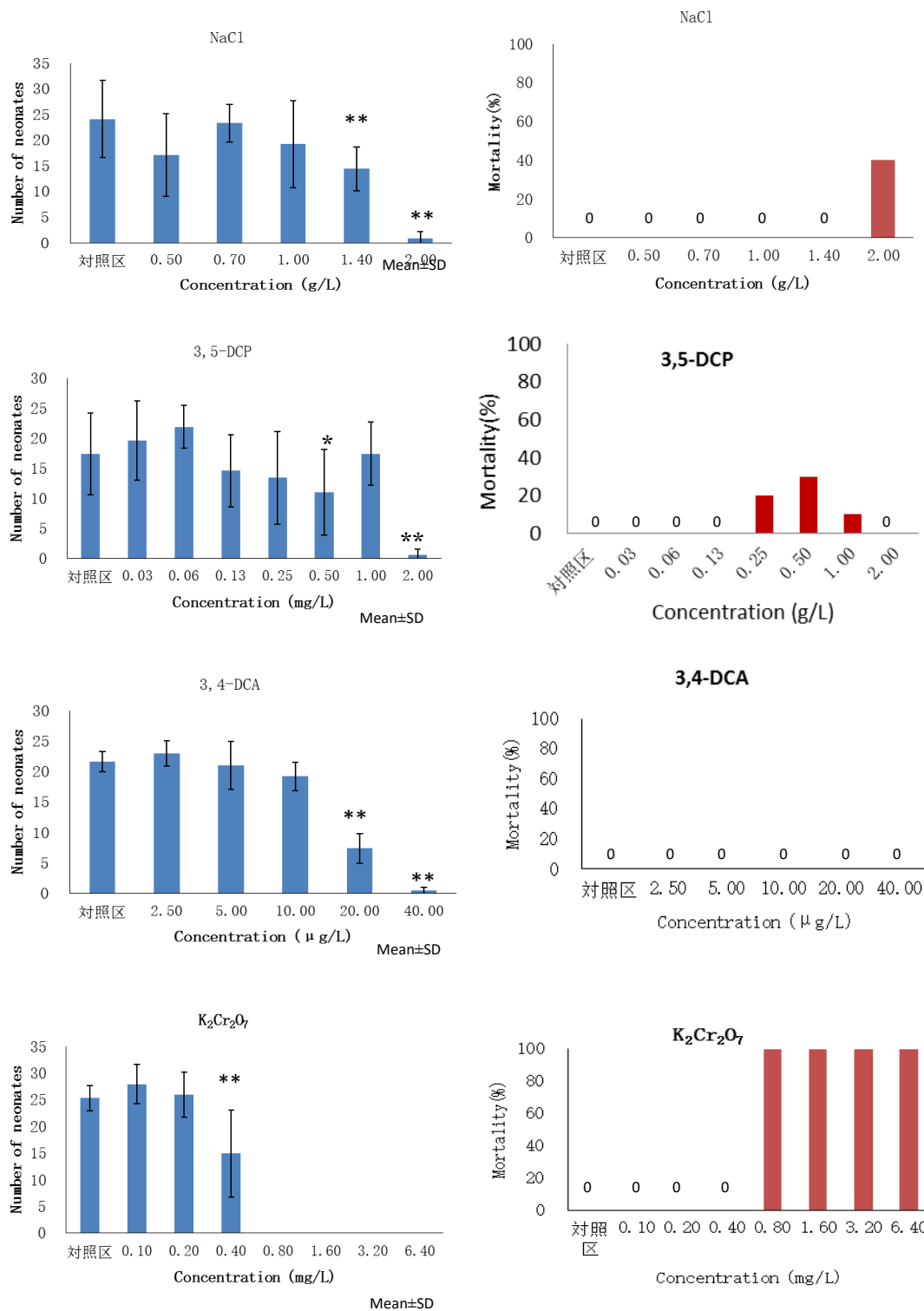


図5 標準物質の繁殖試験結果 産仔数と致死率（上から順に塩化ナトリウム、3,5-ジクロロフェノール、3,4-ジクロロアニリン、重クロム酸カリウム）

### 3. 6. 2. 回復試験

それぞれの試験結果を図 6 に示す。各回復試験結果について、それぞれの濃度区から日齢ごとの産仔数移動平均値の最高値を対照区とばく露区の間で多重比較検定を行った。その結果、対照区の産仔数と比較して有意に少なかったのはベザフィブラート 100mg/L、塩化ナトリウムの 1.4g/L および 2.0mg/L における産仔数のみであり、医薬品、標準物質ともに多くの物質で産仔数の回復が見られた。なお、ベザフィブラート 100mg/L においては、ばく露終了後に生存していたミジンコ 9 頭のうち 5 頭が仔虫を産むことなく 3 日以内に死亡した。このようにばく露終了直後に多くのミジンコが死亡した例はほかの回復試験には見られなかった。

医薬品ではエピナスチンを除く 7 種、標準物質では重クロム酸カリウムを除く 3 種の物質の試験において、一部濃度区でばく露期間中の産仔数が極めて少ない（一日当たり 1 頭以下）という結果が得られた。これらの濃度区にけるばく露終了後の産仔数の推移について、次の 3 通りに分類した。図 6 にはここに示す分類番号を記載している。

- ①ばく露終了後すぐに産仔数が回復した（＝対照区と同程度の水準に達した）物質
- ②回復に時間がかかった物質
- ③回復が見られなかった物質
- ④産仔数が極めて少ない濃度区無し

①にはアセトアミノフェン、エトドラク、ケトプロフェンの 3 医薬品と標準物質の 3,4-ジクロロアニリンが、②にはジフェンヒドラミン、クロタミトン、フェニトインの 3 医薬品と標準物質の 3,5-ジクロロフェノールが、③には医薬品のベザフィブラートと標準物質の塩化ナトリウムが分類された。

なお、④に分類されたエピナスチンの試験では、10mg/L においてばく露期間中に 10 頭中 7 頭が死亡し、グラフに反映されたデータは生き残った 3 頭の産仔数の平均値である。また重クロム酸カリウムについても 0.8mg/L において全個体が死亡したため、回復はしないと判断する。

また、回復試験前半にあたる繁殖試験の結果においてある程度の数の産仔をしたものの対象区と比較すると有意に少なかった濃度区については、ばく露終了後の産仔数はすべてそれぞれの物質の試験の対象区と同様であった。

②で回復に時間がかかった濃度区に着目すると、それぞれの試験において該当のミジンコの産仔数はばく露終了後 4 日以上経過した時点で最大値を記録している。この時点で対照区や低濃度区における産仔数はすでに減少中で影響濃度区と比較しても産仔数は少ない。すなわち、物質の影響により正常な数の産仔を行うまでの回復に時間がかかったミジンコは、生涯における産仔の期間が終了する時期も遅くなることが示唆された。

12 種の物質の回復試験すべてに対し、試験前半に物質のばく露による影響を受けたミジンコの産仔数移動平均値の最高値が対照区を有意に上回ることは無かった。この点は

Hayashi et al. (2008) によるオオミジンコを用いた回復試験の結果と異なっている。したがって、産仔数総数が試験終了時点で対照区の産仔数に追いつく事例はなかった。

以上をまとめると、ほとんどの医薬品で産仔数が回復したものの、ばく露期間を含めた産仔数の総数は影響濃度区と対照区で同水準になることは無かった。また、回復に要する日数が医薬品によりまちまちであることが分かった。

また、産仔数推移の分類からは、その傾向として医薬品の試験結果にのみみられる特徴も標準物質の試験結果にのみみられる特徴も特に見られなかった。したがって、回復試験により示される影響の回復性は医薬品特有のものではないことが分かった。

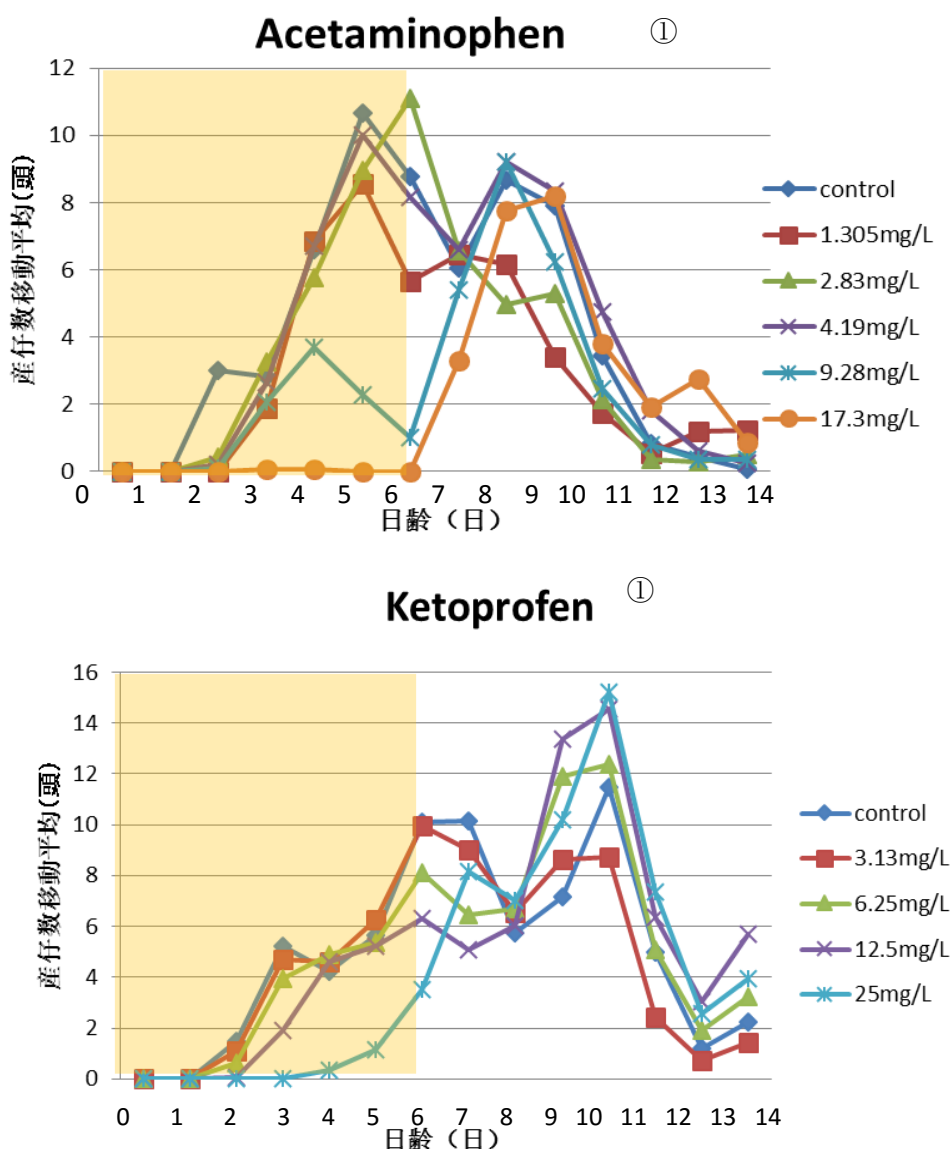


図 6(1) 回復試験結果（上から順にアセトアミノフェン、ケトプロフェン）

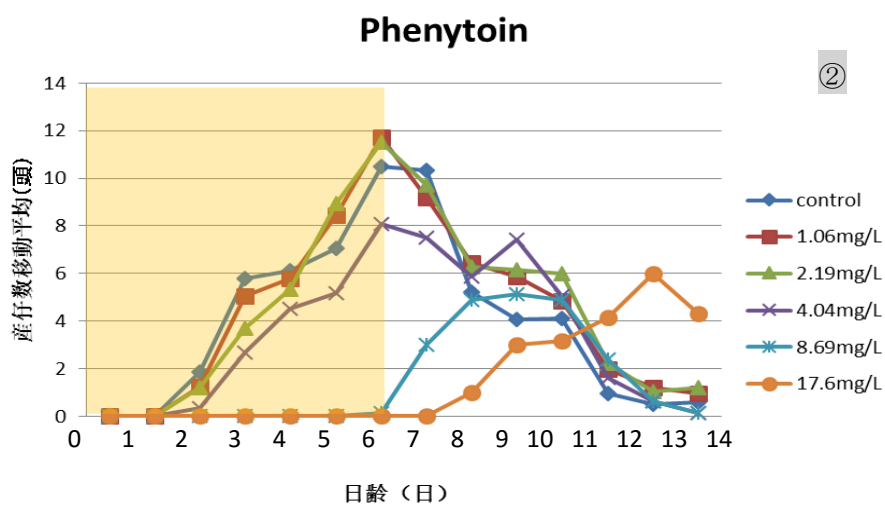
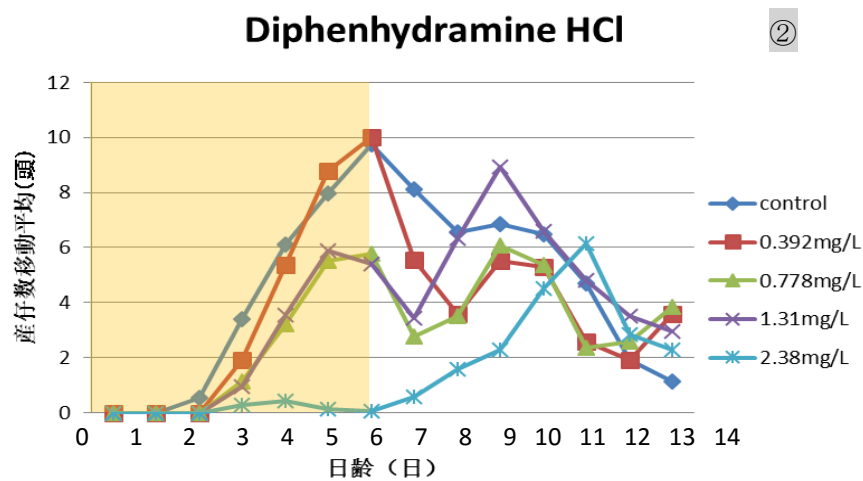
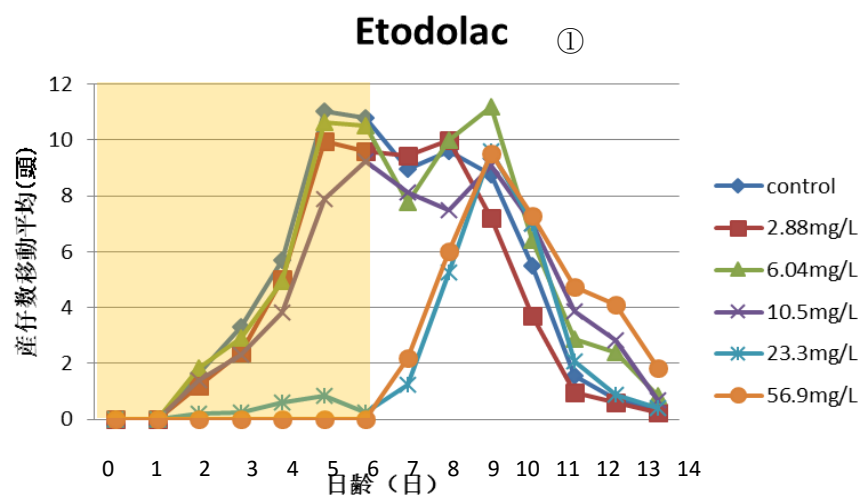


図 6(2) 回復試験結果 (上から順にケトプロフェン、ジフェンヒドラミン塩酸塩、フェニトイン)

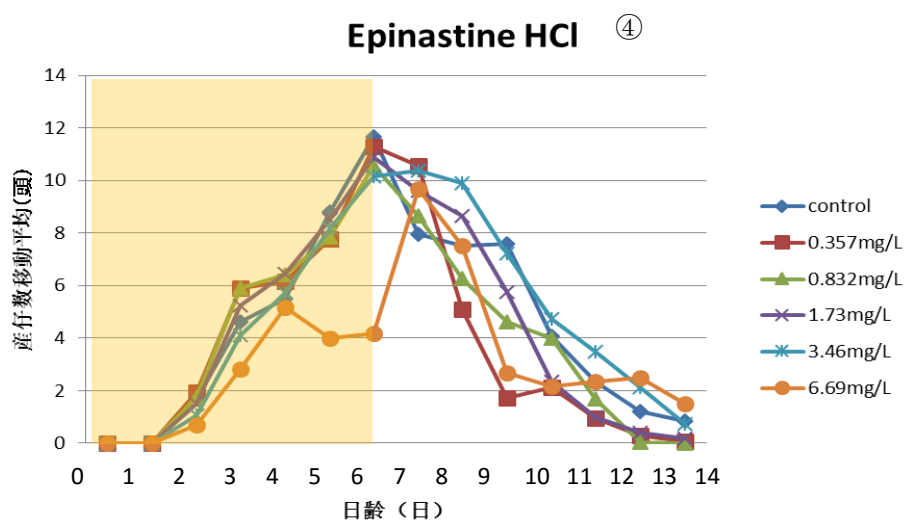
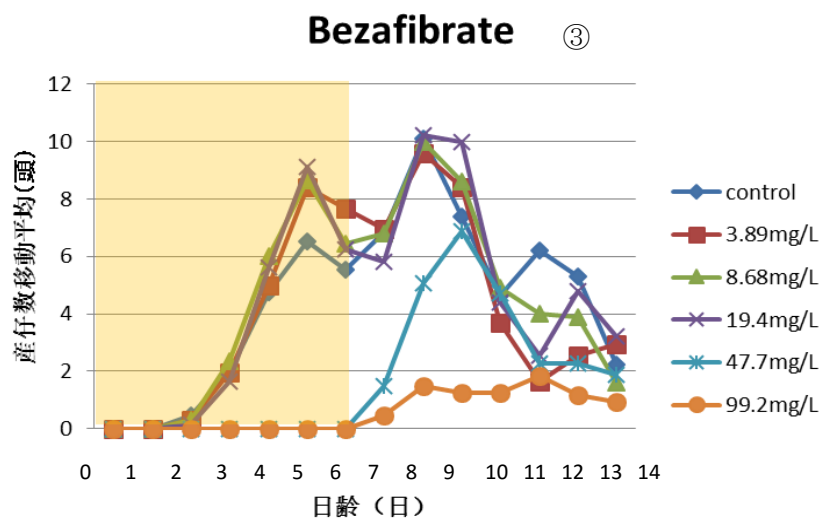
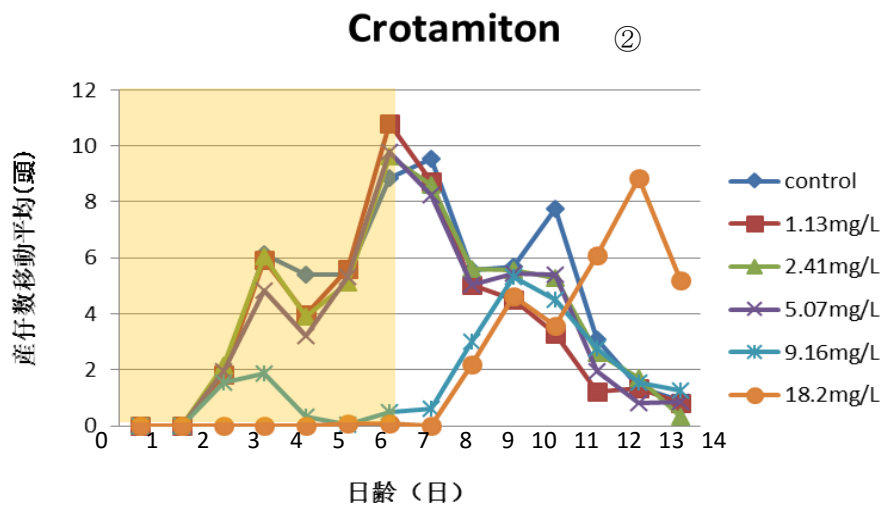


図 6(3) 回復試験結果（上から順にクロタミトン、ベザフィブラート、エピナスチン塩酸塩）

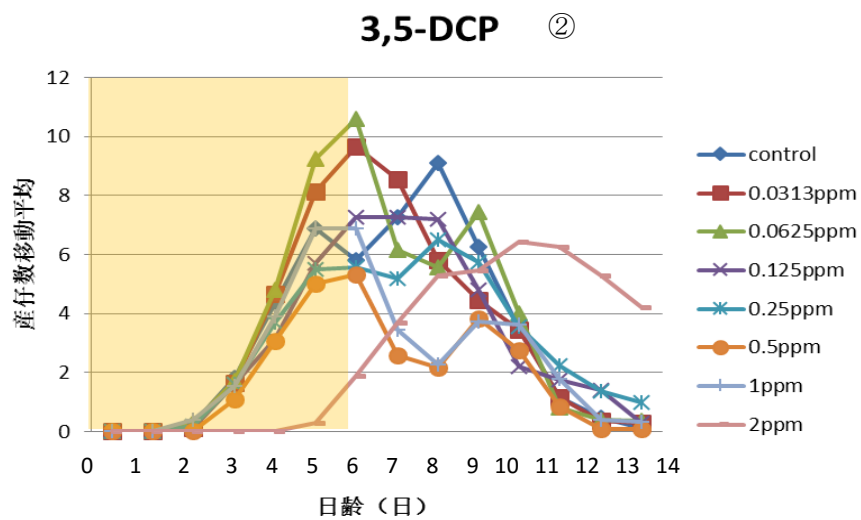
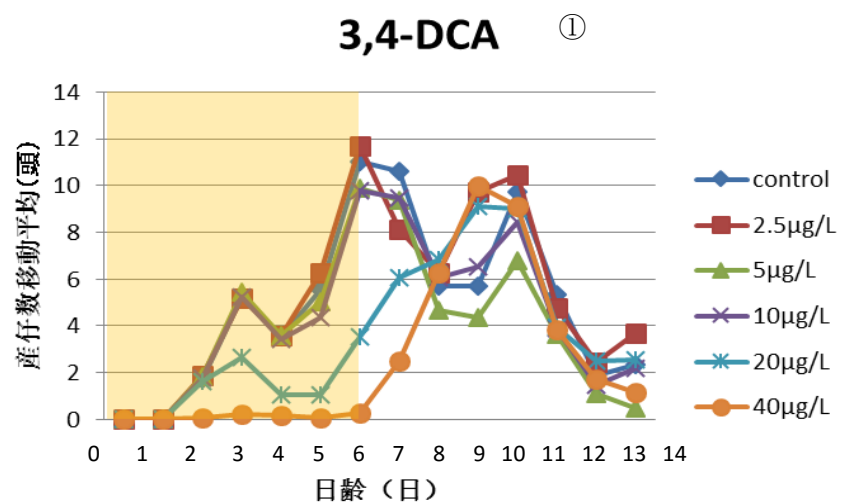


図 6(4) 回復試験結果 (上から順にエピナスチン、3,4-ジクロロアニリン、3,5-ジクロロフェノール)

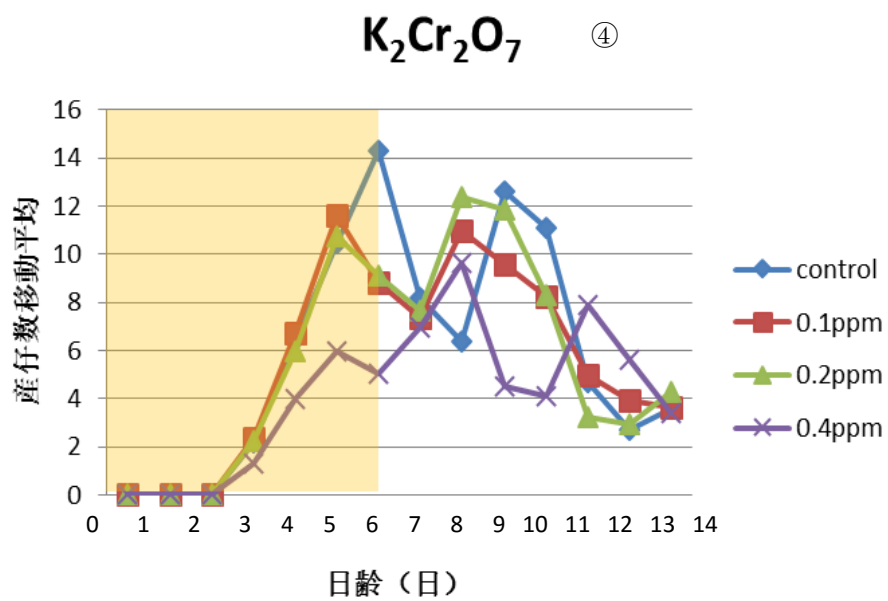
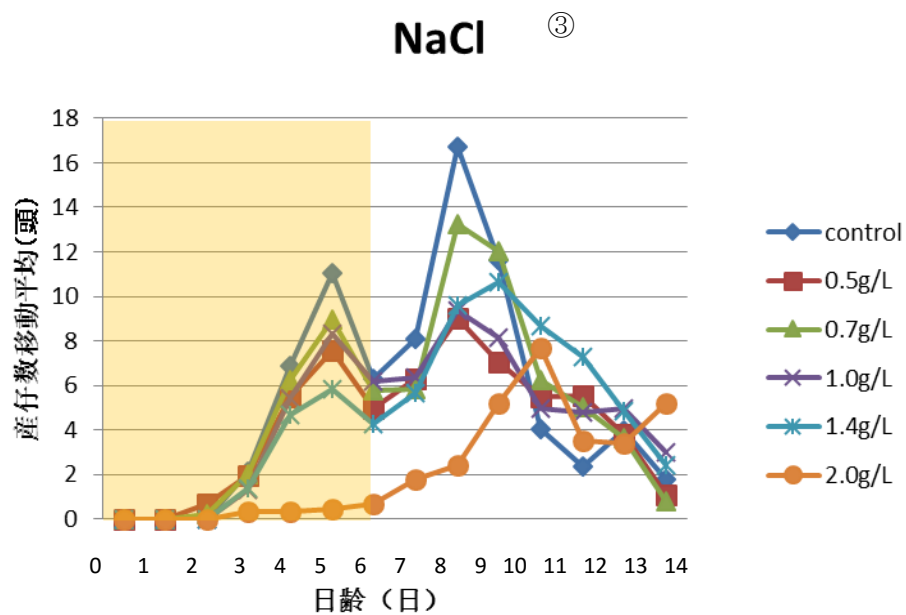


図 6(5) 回復試験結果（上から順に塩化ナトリウム、重クロム酸カリウム）



## 第 4 章 医薬品の分類ごとの回復試験結果とその比較

### 4. 1. 目的

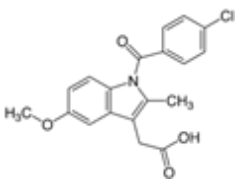
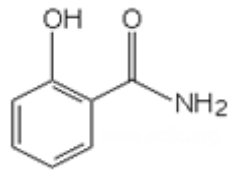
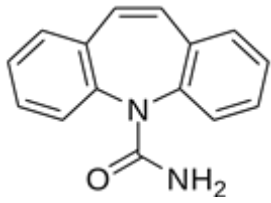
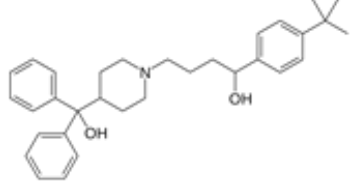
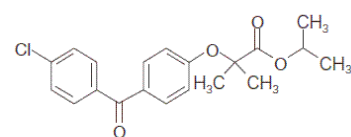
第 3 章では、回復試験の産仔数推移について 3 通りの分類を行った。分類された医薬品のうち、ケトプロフェンとエトドラクはともに NSAID(非ステロイド系解熱鎮痛薬)であり、これらは共にばく露終了後すぐに回復するという似通った傾向を示した。そのほかに医薬品としての用途・作用機序による分類が同じである医薬品の組み合わせはなかった。そこで、同じ作用機序を持つ医薬品がニセネコゼミジンコに対してもそれぞれ同様な作用が働き、回復試験結果が似た傾向となるかどうかについて、第 3 章で述べた回復試験で扱った医薬品と同種のものについて回復試験を行い、検証を試みた。

### 4. 2. 被験物質

第 3 章で回復試験を行った医薬品 8 種のうち、詳しい作用機序が不明であったアセトアミノフェンとクロタミトンを除く 6 種の医薬それぞれと同種の医薬品として、鈴木ら(2010)の報告を参照のもと、河川中に高濃度で検出された医薬品の中からケトプロフェン・エトドラクと同じ NSAID であるインドメタシンとサリチルアミド、フェニトインと同じ抗てんかん薬であるカルバマゼピン、ベザフィブラートと同じ高脂血症薬であるフェノフィブラート、ジフェンヒドラミンと同じ抗ヒスタミン薬であるテルフェナジンを被験物質に選んで回復試験を行った。これらの医薬品の詳細を表 3 に示す。

また、第 3 章において、フェニトイン回復試験の産仔数推移において、他の物質のものと異なり、ばく露終了直後から対照区の産仔数推移が単調減少となっていた。阻害致死率が極めて高い濃度が見られなかったエピナスチン、医薬品の中で唯一回復が見られなかったベザフィブラートと合わせて、3 種の医薬品について設定濃度を変更して再試験を行った。試験に使用したこれら 3 種の試薬の純度・試薬メーカーは第 2 章・第 3 章で使用したものと同じである。

表 3 対象医薬品 5 種

医薬品名	最高検出濃度(ppb)	構造式	用途	試薬メーカー	純度
インドメタシン	0.35		解熱鎮痛薬 (NSAID)	Sigma-Aldrich Corporation	99%
サリチルアミド	0.29		解熱鎮痛薬 (NSAID)	和光純薬工業株式会社	99.0%
カルバマゼピン	0.11		抗てんかん薬	和光純薬工業株式会社	97.00%
テルフェナジン	ND		抗ヒスタミン薬	Tocris Bioscience	98.7%
フェノフィブラート	0.08		高脂血症薬	Sigma-Aldrich Corporation	99%

#### 4. 3. 試験方法

試験方法及び使用したミジンコは第 2 章と同様にして行った。

## 4. 4. 結果

### 4. 4. 1. 第3章で扱った医薬品の再試験

回復試験前半にあたる繁殖試験の結果を図7に、回復試験の結果を図8に順に示す。

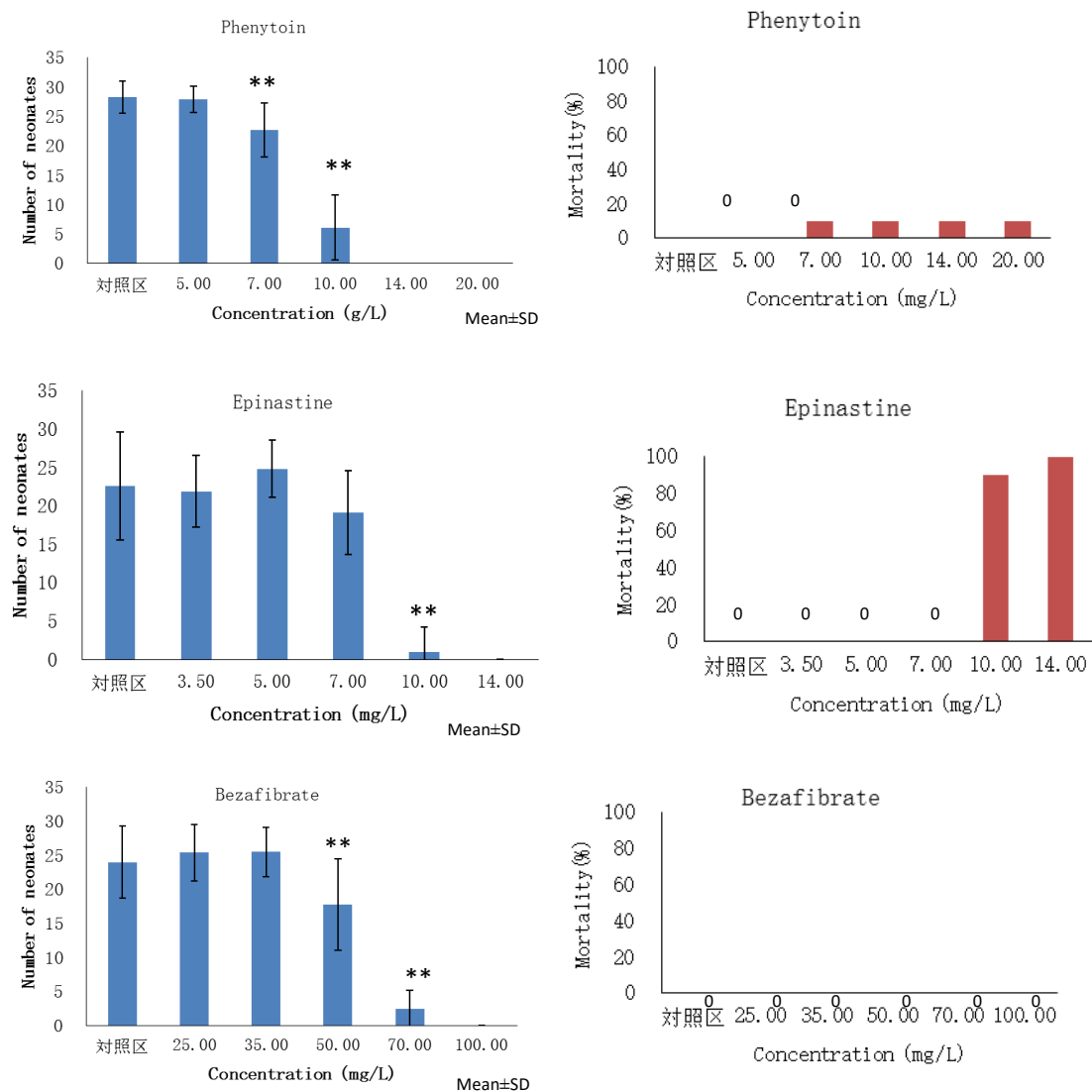


図7 各医薬品の産仔数と致死率（上から順にフェニトイン、エピナスチン塩酸塩、ベザフィブラート）

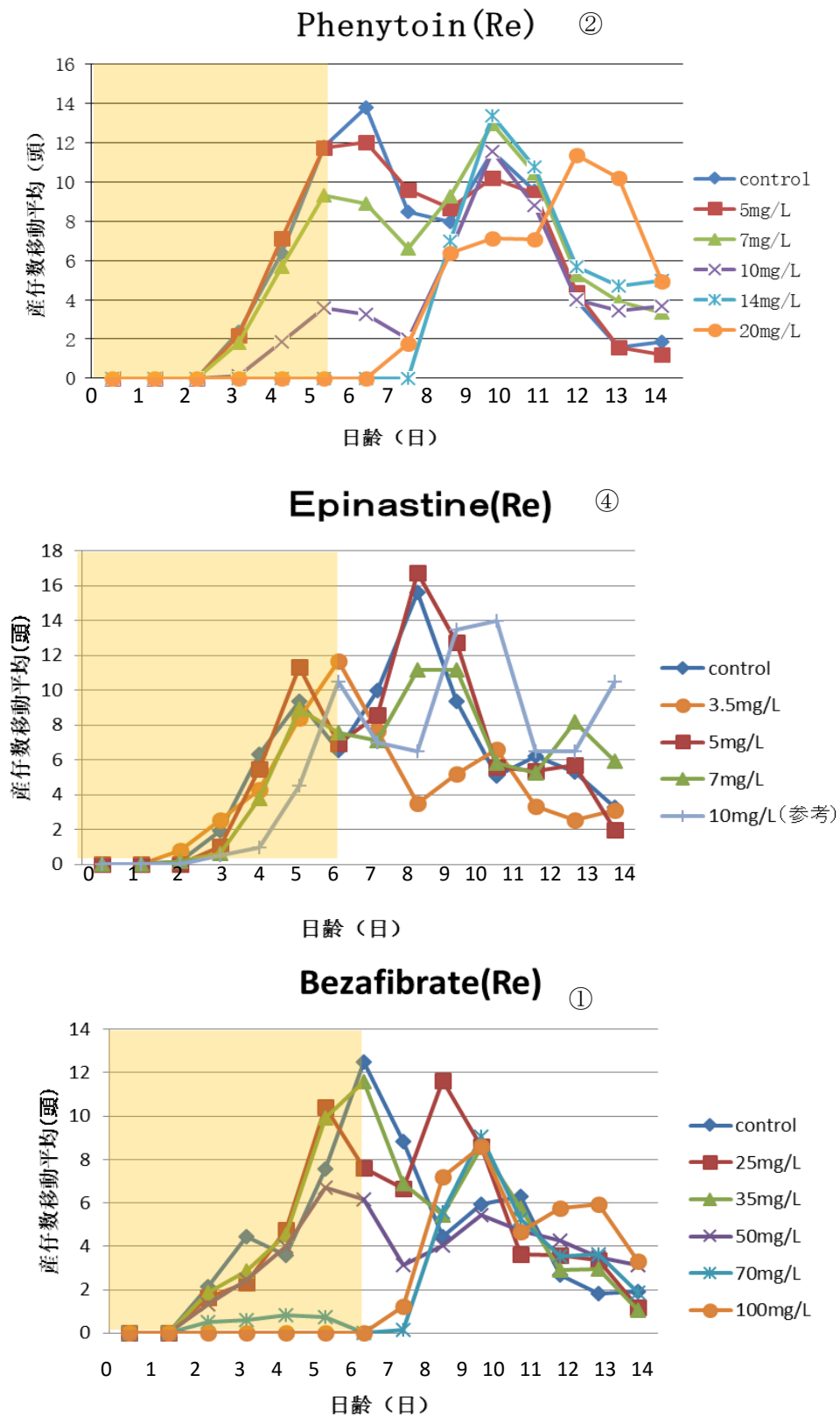


図 8 回復試験結果 (上から順にフェニトイン、エピナスチン塩酸塩、ベザフィブラート)

フェニトインでは、他の大多数の試験と同様に、対照区でばく露終了 3 日後に一日当たり約 10 頭の産仔数を記録した。新たに設定した 14mg/L では繁殖試験における繁殖阻害率が 100%であったものの早期回復が見られた。一方 20mg/L では第 3 章と同様回復が 3 日ほど遅れた。

エピナスチンは新たに設定した 7mg/L で繁殖試験において影響がなく、同じく新たに設定した 14mg/L では全個体が死亡した。10mg/L においても第 3 章と同様に高い致死率を示した一方である程度の数の産仔を記録した。

ベザフィブラートは第 3 章と異なり、100mg/L においてもミジンコが死亡することなく一日当たりの平均産仔数が対照区と同程度であった。

#### 4. 4. 2. 同種の医薬品の回復試験

回復試験前半にあたる繁殖試験の結果を図 9 に、回復試験の結果を図 10 に順に示す。

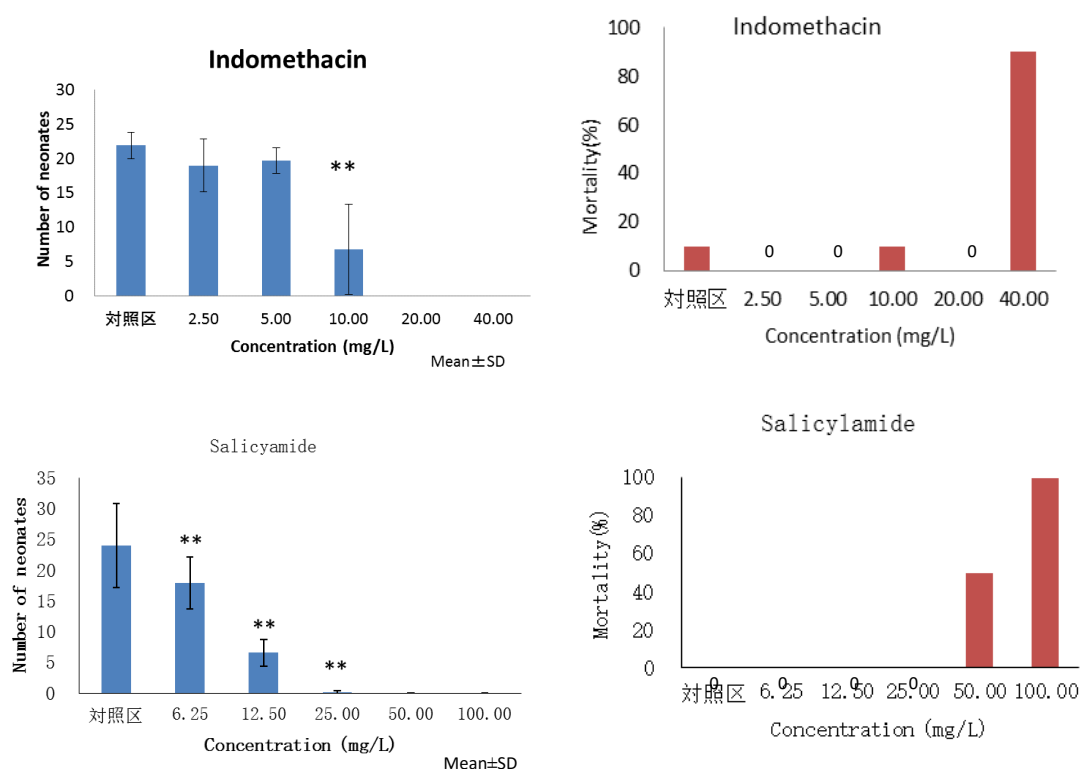


図 9(1) 各医薬品の産仔数と致死率（上から順にインドメタシン、サリチルアミド）

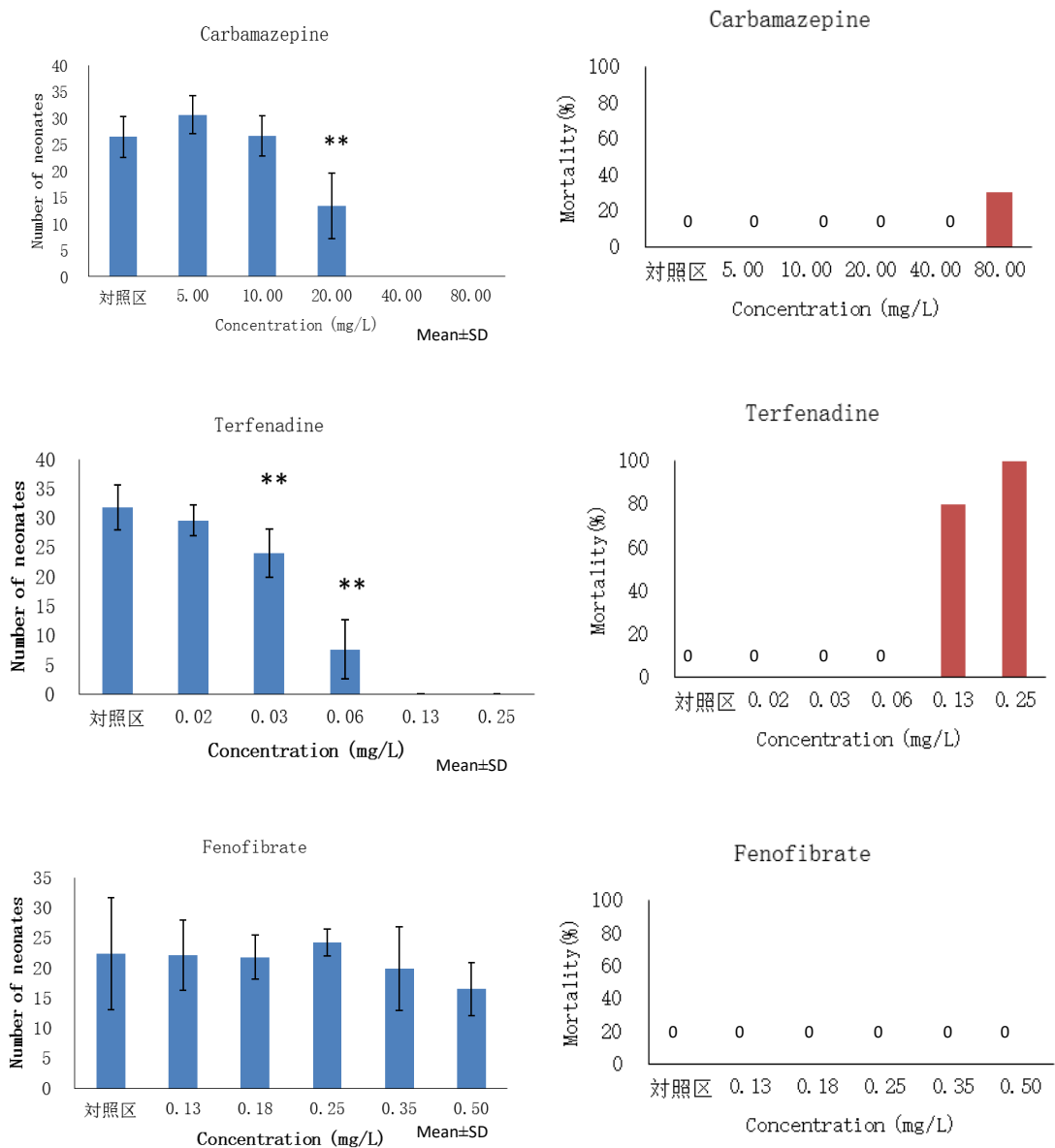


図 9(2) 各医薬品の産仔数と致死率（上から順にカルバマゼピン、テルフェナジン、フェノフィブラート）

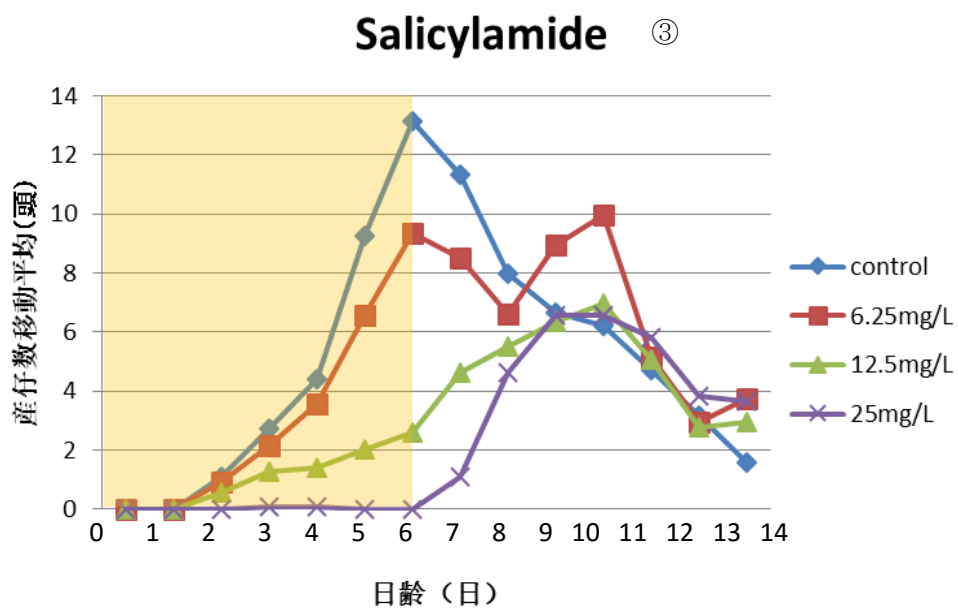
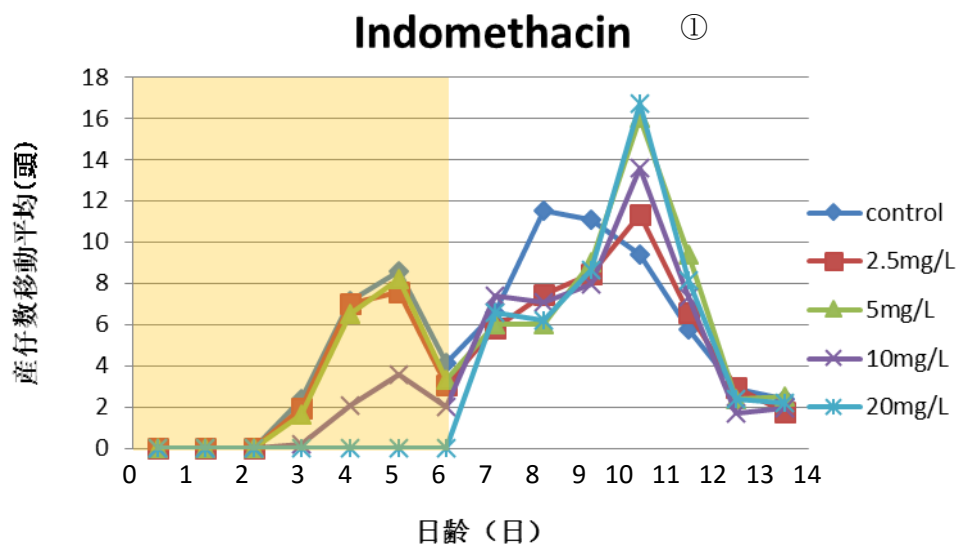


図 10(1) 回復試験結果 (上から順にインドメタシン、サリチルアミド)

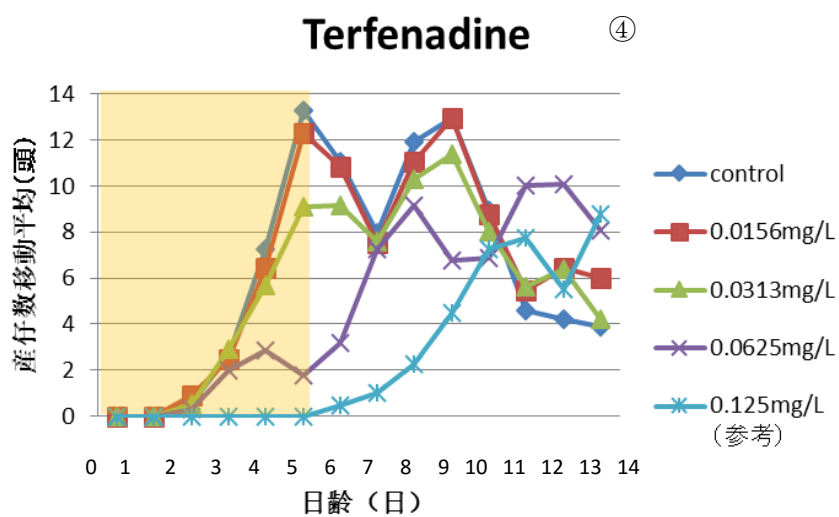
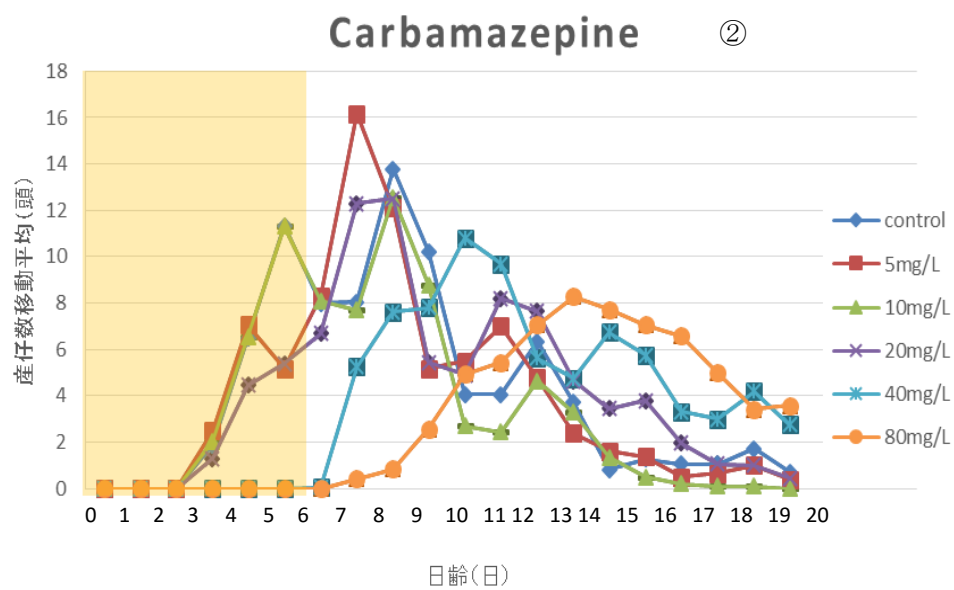


図 10(2) 回復試験結果 (上から順にカルバマゼピン、テルフェナジン)



インドメタシンは繁殖試験の結果でNOECを上回った10mg/Lおよび20mg/Lについて、産仔数が最高値を示す日齢は対象区と比較すると2日遅れているが、NOECを下回った5mg/L,10mg/Lと比較すると一致している。また、産仔を終了する日齢もほぼ同じと判断できる。

サリチルアミドは他のNSAIDと異なり、25mg/Lにおける産仔数移動平均の最高値は対象区と有意な差が生じない値を記録することはなかった。従って回復しなかったと判断する。しかしながら、産仔を終了する時期は一致した。

カルバマゼピンは、日齢14日の時点で全体的に産仔終了の傾向がみられなかった。そのため、この物質の回復試験に限り、試験期間を14日間から20日間に延長した。同じく抗てんかん薬であるフェニトインと同様、回復に要する日数、産仔を終了する時期ともに対照区と比較して数日の遅れがみられた。

テルフェナジンは、濃度区0.125mg/Lにおいて生き残った個体が2頭であったため多重検定比較は不可能であったが、参考データとして生き残った2個体に関して対照区と比較すると産仔数移動平均最高値の記録日は5日遅れた(図10(2))また、全ての濃度区で産仔数移動平均の極大値が2回記録されており、繁殖試験におけるNOEC以下の濃度と対照区の間には極大値を記録したに異例、産仔を終了する時期、ともに差は見られなかった。また繁殖試験において影響を示した濃度区0.0625mg/Lでは対照区と比較して3日遅れて極大値を記録した。これらの傾向はテルフェナジンと同じ抗ヒスタミン薬であるジフェンヒドラミンの回復試験結果とほぼ一致している。

フェノフィブラートは水溶解度0.707mg/Lというデータ(drugbank)に基づき、最高濃度区を0.5mg/Lとして試験を行ったものの、毒性影響は観測されなかった。

#### 4. 5. 考察

##### 4. 5. 1. 第 3 章で扱った医薬品の再試験

フェニトインとエピナスチンの再試験の結果は、第 3 章の試験結果と矛盾しなかったものの、エピナスチンについては致死影響をもたらすことなく繁殖を阻害する濃度の特定はできなかった。また、ベザフィブラートの 100mg/L においてはばく露終了後に回復しており、第 3 章のこの濃度において回復しなかったのは、被験物質による影響ではなかった可能性が考えられる。

##### 4. 5. 2. 同種の医薬品の再試験

本章では、第 3 章で扱った医薬品のうち、NSAID、抗てんかん薬、抗ヒスタミン薬、高脂血症薬について、回復試験結果が医薬品としての用途・作用機序ごとにそれぞれ特有の傾向を示すかどうかを検証した。高脂血症薬についてはフェノフィブラートの回復試験結果が得られなかったため、NSAID、抗てんかん薬、抗ヒスタミン薬の 3 種について考察する。

NSAID の作用機序は、すべてのシクロオキシゲナーゼ (COX-1、COX-2) 活性を阻害し、エイコサノイド (生理活性物質) の一つであるプロスタグランジンの生成を抑制することである。プロスタグランジンは炎症、発熱作用を持つため、解熱鎮痛薬としての役割を果たしている。エイコサノイドは部脊椎動物でも哺乳類と似た働きをすると考えられており (Stanley, 2006)、またエイコサノイドの合成は NSAID により阻害される点も哺乳類と無脊椎動物で共通である (Rowley et al., 2005)。

本章における NSAID 回復試験の結果は、ケトプロフェン、エトドラク、インドメタシンがばく露終了後すぐに回復し、サリチルアミドのみ回復しなかった。ケトプロフェン、エトドラク、インドメタシンを含む多くの NSAID はシクロオキシゲナーゼ活性を競合阻害し、これは可逆的な阻害である (Frolich and Stichtenoth, 1998)。しかしながらその例外の一つにアスピリンがあり、これはシクロオキシゲナーゼをアセチル化することにより阻害する (Canadian Institutes of Health Research et al., 2006)。サリチルアミドの詳しい作用機序は不明であるが、アスピリンに似た作用を持つ (Canadian Institutes of Health Research et al., 2006)。このため、本研究で扱った NSAID 4 種の回復試験においては、サリチルアミドのみミジンコに対して不可逆的に作用を起こしたと考えられる。但し、サリチルアミドの影響を受けたミジンコもばく露期間のように仔虫を全く生まなかったわけではなく、この影響は完全に不可逆的であるとは言い切れない。

抗てんかん薬の作用機序は様々だが、本研究で扱ったフェニトインとカルバマゼピンは、ともに Na チャネル抑制が主な作用である。無脊椎動物での詳しい作用機序は明らかになっていないが、活性代謝産物共に無脊椎動物の Na チャネルと相互作用する可能性が考えられている (Lamichhane et al., 2012)。そのため、フェニトインとカルバマゼピンの回復試験に

おいては、ミジンコにどのような作用をしたのかは明らかでないが、どちらの試験においても回復に要する日数、産仔を終了する時期ともに対照区と比較して数日の遅れがみられたため、類似した作用をしたと考えられる。

抗ヒスタミン薬はアレルギー反応や炎症の発現に介在物質として働くヒスタミンの作用を発現させるタンパク質の一つである H1 受容体に結合することで、ヒスタミンを競合阻害する作用を持つ。ミジンコへの作用については不明な点が多く残されたものの、ジフェンヒドラミンとテルフェナジンで繁殖阻害率が高い場合に回復に時間がかかるという共通点が見られた。

## 第5章 繁殖試験結果に基づく回復試験結果の予測

第3章、第4章では、医薬品・標準物質の回復試験結果一つひとつについて考察を行った、本章では、繁殖試験結果と回復試験のデータを照合し、繁殖試験結果に基づく回復試験結果の予測が可能かどうかについて検討する。

### 5. 1. 繁殖試験結果と回復に要する日数の関係

第3章の結果で述べた分類における、回復に時間がかかるかどうかについての判断は、対照区の産仔数状況にも左右されるものの、ばく露終了後何日間で対照区と同水準に達するかに基づいて行った。そこで、繁殖試験結果と回復に要する日数の関係について考察する。

#### 5. 1. 1. 繁殖試験における繁殖阻害率と回復に要する日数の関係

各医薬品の回復試験の前半にあたる繁殖試験で産仔数に有意差が認められた濃度区における繁殖阻害率と、その濃度区におけるミジンコの産仔数が対照区と同程度になるまでの日数の関係を図11にまとめた。線形近似曲線がほぼ横ばいとなっており、 $R^2$ の値も極めて小さいため、繁殖阻害率と回復に要する日数の間に相関は無いと考えられる。

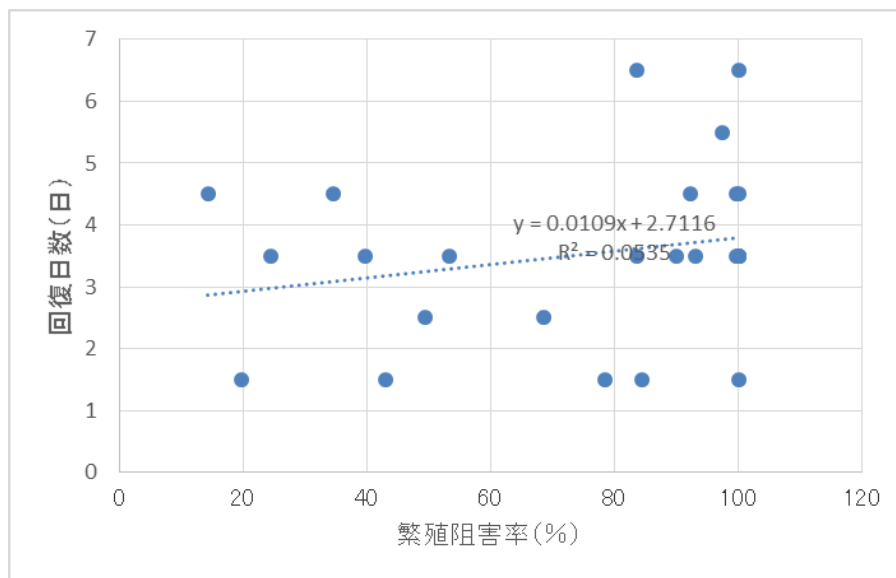


図11 繁殖阻害率と回復に要する日数の関係

### 5. 1. 2. 繁殖試験における致死率と回復に要する日数の関係

各医薬品の回復試験の前半にあたる繁殖試験で産仔数に優位差が認められた濃度区における親個体の死亡率と、その濃度区におけるミジンコの産仔数が対照区と同程度になるまでの日数の関係を図 12 にまとめた。繁殖阻害率との関係と同様に線形近似曲線がほぼ横ばいとなっており、 $R^2$  の値も極めて小さいため、致死率と回復に要する日数の間にも相関は無いと考えられる。

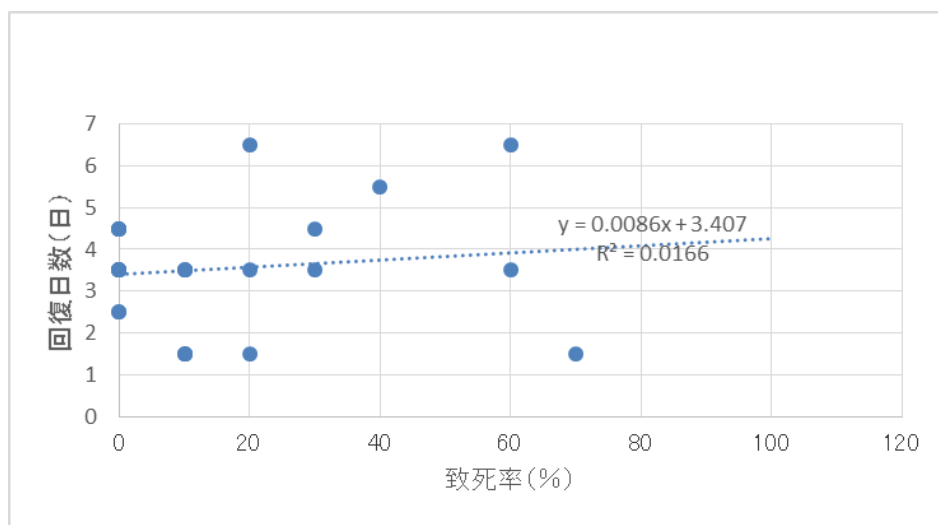


図 12 致死率と回復に要する日数の関係

## 5. 2. 影響を受けたミジンコの体長と回復性の関係

本研究で行った回復試験のうち、カルバマゼピンの 80mg/L とサリチルアミドの 50mg/L で、試験前半終了時点でミジンコのサイズが正常よりも小さくなる現象が見られた。ここではこの現象を成長阻害と呼ぶ。試験前半終了時点でのミジンコの写真を、成長阻害の見られなかったカルバマゼピン 40mg/L, サリチルアミド 25mg/L と合わせて、カルバマゼピンについては図 13、サリチルアミドについては図 14 に示す。

繁殖試験において、カルバマゼピン 80mg/L の致死率は 30%、サリチルアミド 50mg/L の致死率は 50%と、その差は大きくなかったが、ばく露終了後、カルバマゼピン試験で生存したミジンコは日数を要したものの回復した一方で、サリチルアミド試験で生存したミジンコは産仔を行うことなくばく露終了後三日以内に全個体が死亡した。

したがって、成長阻害から回復の可能性を予測することは不可能であることが分かった。



図 13 カルバマゼピン回復試験前半終了時点でのミジンコの親個体  
(左：80mg/L, 右：40mg/L 各画像の一边は 2cm)

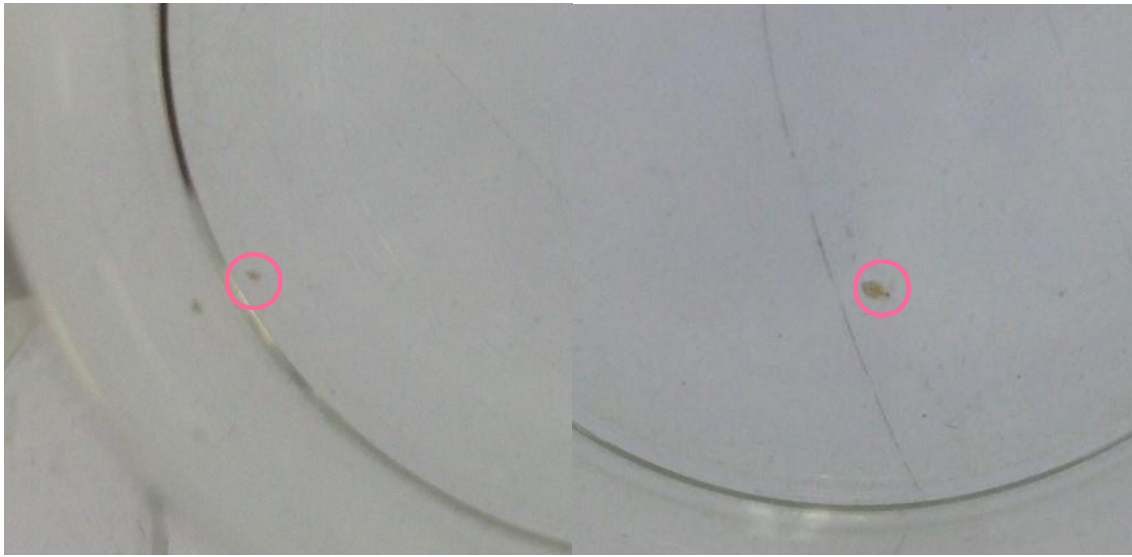


図 14 サリチルアミド回復試験前半終了時点でのミジンコの親個体  
(左：50mg/L, 右：25mg/L 各画像の一边は 2cm)

### 5. 3. まとめ

繁殖試験結果と回復試験結果は全くと言っていいほど相関が無く、繁殖試験結果に基づく回復試験結果の予測は不可能であると考えられる。従って、回復試験によって得られた回復の有無や回復までの日数といったデータ、さらにそれにより得られた考察は繁殖試験だけでは得られなかったものであった。回復試験は水生生物への作用の回復性を考察するうえで有効であると考えられる。

## 第6章 総括

本研究は、河川中の医薬品の水生生物に対する影響を調べるとともに、ニセネコゼミジンコを用いた回復試験を通し、医薬品の毒性変化の可逆性についての知見を得ること、さらに回復試験を行うことの意義について検討することを目的として行った。

多摩川で検出された医薬品の影響濃度は、検出濃度と比較して 100~10000 倍高かった。従ってこれらの医薬品が環境に影響を与えている可能性が低いことを確認した。

様々な医薬品の回復試験結果から、ほぼすべての医薬品について繁殖試験で影響を受けたミジンコはばく露終了後に回復した一方で、医薬品ごとに回復の程度、回復までの日数が異なった。この差異は医薬品のニセネコゼミジンコに対する作用機序の違いによるものであることが示唆された。また、4 種の標準物質で行った回復試験から、影響からの回復性は医薬品特有のものではないことが分かった。

回復の有無や回復までの日数は、繁殖試験から得られる繁殖阻害率や致死率との相関がないことが分かった。従って、回復試験によって得られた回復の有無や回復までの日数といったデータ、さらにそれにより得られた考察は繁殖試験だけでは得られなかったものであった。回復試験は水生生物への作用の回復性を知るうえで有効であると考えられる。



## 謝辞

本修士論文は、筆者が東京大学大学院創成科学研究科自然環境学専攻修士課程において、自然環境学循環学分野鑑迫研究室にて行った研究をまとめたものである。

本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました本学鑑迫典久教授に心より感謝いたします。また、本論文をご精読いただき貴重なコメントを頂きました本学福田健二教授に感謝いたします。また本研究に関して親身にアドバイスを下さいました国立環境研究所の阿部良子氏、高信ひとみ氏、渡部春奈博士に深く感謝致します。

実験に使用したミジンコの飼育は、国立環境研究所の阿部良子氏、高信ひとみ氏、本学自然環境循環学分野修了生の岡本暁氏のご協力により行いました。3氏のご協力のもと実験を行うことができました。

第2章における溶液濃度の分析は国立環境研究所の小塩正明氏にご協力いただきました。感謝いたします。

最後になりますが、本研究に関してご協力いただいた全ての皆様に心より感謝申し上げます。ありがとうございました。

## 引用文献

- Aherne GW, Hardcastle A, Nield AH. 1990. Cytotoxic drugs and the aquatic environment. Estimation of bleomycin in river and water samples. *J Pharm Pharmacol* 42:741-742
- Brain RA, Arnie JR, Porch JR, Hosmer AJ. 2012. Recovery of photosynthesis and growth rate in green, blue-green, and diatom algae after exposure to atrazine. *Environ Toxicol Chem.* 2012 Nov;31(11):2572-2581
- Canadian Institutes of Health Research, Alberta Innovates - Health Solutions, The Metabolomics Innovation Centre. 2006. DrugBank(<http://www.drugbank.ca/>)
- Constantine LA, Huggett DB. 2010. A comparison of the chronic effects of human pharmaceuticals on two cladocerans, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Chemosphere* 80:1069-1074
- Environment Canada. 2007. Biological test method-Test of reproduction and survival using the *Cladocera Ceriodaphnia dubia*.
- European Medicines Agency (EMA). 2005. Guideline on risk management systems for medicinal products for human use.
- Frolich JC and Stichtenoth DO. 1998. Renal side effects of NSAIDs: role of COX-1 and COX-2. In *Selective COX-2 Inhibitors: Pharmacology, Clinical Effects and Therapeutic Potential* (ed. J. Vane and J. Botting), pp.87-98. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Goolsby EW1, Mason CM, Wojcik JT, Jordan AM, Black MC. 2013. Acute and chronic effects of diphenhydramine and sertraline mixtures in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ Toxicol Chem.* 2013 Dec;32:2866-2869.
- Hayashi Y, Heckmann LH, Callaghan A, Sibly RM. 2008. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology* 17:246-251
- Henry TB., Kwon JW, Armbrust KL, Black MC. 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, No. 9: 2229-2233.
- Huggett DB, Brooks BW, Peterson B, Foran CM, Schlenk D. 2002. Toxicity of Select Beta Adrenergic Receptor-Blocking Pharmaceuticals (B-Blockers) on Aquatic Organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 229-235
- Lamichhane K, Garcia SN, Huggett DB, DeAngelis DL, La Point TW. 2012. Chronic Effects of Carbamazepine on Life-History Strategies of *Ceriodaphnia dubia* in

- Three Successive Generations. Arch Environ Contam Toxicol (2013) 64:427–438
- Richardson ML, Bowron JM. 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. J Pharm Pharmacol 37:1-12
- Rowley AF, Vogan CL, Taylor GW, Clare AS. 2005. Prostaglandins in non-insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems. J Exp Biol 208:3–14
- Sancho E, Villarroel MJ, Ferrando MD. 2015. Assessment of chronic effects of tebuconazol on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* after different exposure times. Ecotoxicology and Environmental Safety 124:10–17
- Stanley D. 2006. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. Annu Rev Entomol. 2006;51:25-44
- U.S. Food and Drug Administration (U.S. FDA). 1998. Guidance for industry, Environmental assessment of human drug and biologics applications.
- Yamamoto H, Nakamura Y, Nakamura Y, Kitani C, Imari T, Sekizawa J, Takao Y, Yamashita N, Hirai N, Oda S, Tatarazako N. 2007. Initial ecological risk assessment of eight selected human pharmaceuticals in Japan. Environmental Sciences. Vol. 14, No. 4:177-193
- 清野 敦子, 古荘 早苗, 益永 茂樹 2004 わが国の水環境中における人用・動物用医薬品の存在, 水環境学会誌 Vol.27(2004) No.11, 685-691
- 久保田 領志, 鈴木 俊也, 田原 麻衣子, 清水 久美子, 西村 哲治 2008 水環境中の PPCPs のモニタリングと浄水工程を想定した処理性評価, 水環境学会誌 Vol.31 No.11, 643-649
- 鈴木 俊也, 小杉 有希, 保坂 三継, 矢口 久美子, 小縣 昭夫, 西村 哲治, 中江 大 2010 多摩川流域の下水処理場における医薬品の存在実態, 東京都健康安全研究センター研究年報 61, 333-339
- 鈴木俊也 2012 水環境中のヒト用医薬品の存在実態及び環境中濃度の予測, 東京健安研年報 63, 69-81
- 田中 宏明 2008 河川水中で見出される医薬品の底質汚染の実態と生物影響に関する研究, 公益財団法人 河川財団  
(<http://www.kasenseibikikin.jp/seibikikin/h20/pdf/rep1-02h.pdf>)
- 福永彩, 山下尚之, 田中宏明 2006 藻類生長阻害試験を用いた医薬品の毒性評価, 環境工学研究論文集・第 43 巻, 57-63