

環境水中に存在する抗生物質を対象とした藻類生長阻害試験

京都大学大学院工学研究科 学生会員	清水 大吾
京都大学大学院工学研究科 正会員	田中 宏明
独立行政法人土木研究所 正会員	山下 尚之
独立行政法人土木研究所 正会員	鈴木 穰

1. 背景と目的

近年、環境水中に様々な医薬品由来の化学物質が存在することに関心が集まりつつあり、国内外の水環境から様々な医薬品の検出が報告されているが、生態系に対するリスクの評価は未だほとんどなされていない。最近わが国においても、化審法の改正により化学物質の生態影響評価が導入されるなど、水生生態系の保全と復元が重要視されているが、医薬品はその評価の対象外である。したがって、本研究においては、環境水中に存在が報告されている医薬品が、生態系の根幹たる一次生産者である藻類の増殖に与える影響を評価することを目的とした。

2. 方法

2.1 藻類生長阻害試験

藻類生長阻害試験の被験株として、藻類試験に広く用いられる緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) F. Hindák (NIES-35) (以下、*P.subcapitata* と表記)を用いた。96 ウェルマイクロプレート(IWAKI 社製・浮遊細胞用)を使用し、被験物質濃度ゼロの対照群を 24 検体、10 倍(クラリスロマイシンは 2 倍)の等比で 6 段階に希釈した各被験物質濃度毎に 6 検体配置した。対照群、試験群共に藻類培地として AAP 培地(US-EPA 標準)、被験物質溶媒として 0.83vol% の DMSO を使用した。この DMSO 濃度では、対照群に対して有意な生長阻害性が無いことを確認している(表 3-1)。液量は 1 ウェル 240 μ L (純水 180 μ L、被験物質 20 μ L、培地 20 μ L、藻類 20 μ L の量を混合したもの。混合後試験濃度となる)に統一し、最外部の well には純水を配置した。培養庫(EYERA 社製・FLI-2000T)内に振とう台(TITEC 社製・NR-80)を設置し、初期濃度 10,000cells/mL の対数増殖中の緑藻株を 24、4,000lx、120rpm で 96 時間培養した。マイクロプレートリーダー(BIOTEC 社製・EL-340)を使用し、測定波長 450nm で吸光度を測定し、検量線を用いて細胞濃度(cells/mL)に換算した。

細胞濃度のデータの処理には日本環境毒性学会の EcoTox Statics を利用した。阻害率の算出には 0-96hr 期間の平均増殖速度を用いた速度法を採用した。NOEC、LOEC の判定には Dunnett 多重検定法($\alpha=5\%$ 両側検定)を、EC10 の算出には、縦軸に阻害率、横軸に対数濃度をプロットし、各点を直線で結び、縦軸成分が 10% を示す線分上の一点横軸座標となる濃度とした。

2.2 文献調査

国内外で出版された環境水中からの医薬品の検出報告に関する論文から、下水処理場からの流出水、河川水、地下水の検出濃度データを引用した。その結果、被験物質は、環境水中からはおよそ 1~1000ng/L の範囲で検出されていることがわかった(表 3-1)。使用対象のヒトへ使用は、医薬品医療機器情報提供ホームページ(<http://www.info.pmda.go.jp/>)で確認し、動物への使用はその他様々な日本語の Web サイトで確認した。

2.3 試験対象医薬品

抗生物質は微生物を殺すことを目的に製造、使用されており、環境水中の微生物への影響が懸念される。このため、本研究においては環境水中からの検出報告がある抗生物質とし、表 3-1 で示す 12 種類とした(使

キーワード 医薬品、抗生物質、生態毒性、藻類生長阻害試験、マイクロプレート

連絡先 〒520-0811 大津市由美浜 1-2 京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター
TEL 077-627-6730 FAX 077-524-9869

用した薬品は、アジスロマイシンが Fluka 社、エンロフロキサシンが MP Biomedicals 社、スルファチアゾールが Alfa Aesar 社以外は、和光純薬社製であり、純度は表 3-1 中に表示したが、クラリスロマイシンは土木研究所で精製されている。

3. 結果

図 3-1 に、アジスロマイシンの場合用量の反応関係を示したが、このように EC100 となる濃度は得られない場合が多かった。毒性データの算定には日本環境毒性学会の EcoTox Statics を利用した。阻害率の算出には 0-96hr 期間の平均増殖速度を用いた速度法を採用した。NOEC、LOEC の判定には Dunnett 多重検定法 ($\alpha=5\%$ 両側検定) を、EC10 の算出には、対数濃度と阻害率をプロットし、各点を直線で結んだ図形において算出した。表 3-1 には、2 - 2 で調

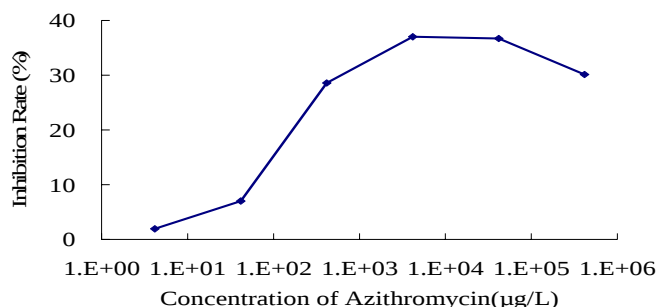


図 3-1 阻害率とアジスロマイシン濃度

査した被験物質の環境水中濃度(Ce)、その毒性値を示した。その結果、本研究の被験抗生物質は、1 ~ 1000 μg/L の濃度範囲で、*P.subcapitata* に対する毒性が認められ始めることが分かった。この結果をもとに、リスク比として Ce/NOEC を算出した場合、下水処理水では 0.005 から 0.16 の範囲、河川水では高くても 0.039 であり、この種への影響としては生じないレベルであることが分かった。

表 3-1 文献調査と試験結果

被験物質情報				環境水中濃度Ce(μg/L)			毒性値(μg/L)		
名称	CAS-RN	純度(%)	使用対象	下水処理場放流水	河川水	地下水	NOEC(μg/L)	LOEC(μg/L)	EC10(μg/L)
azithromycin	88905-01-5	≥95	ヒト	0.165			4.2	42	57
clarithromycin	81103-11-9	高純度	ヒト	0.567	0.023	0.023	10	21	13
enrofloxacin	93106-60-6	不明	動物		0.02		100	1000	250
norfloxacin	70458-96-7	98.0	ヒト・動物		0.02		1000	10000	2200
spiramycin	24916-50-5	≥97.0	ヒト・動物		0.0742	0.0742	8.3	83	110
sulfadimethoxine	122-11-2	≥99.0	ヒト・動物		1.5		100	1000	340
sulfamerazine	127-79-7	≥99.0	動物		0.05		1000	10000	1300
sulfamethoxazole	723-46-6	≥99.0	ヒト・動物	0.5	1.02	0.41	100	1000	710
sulfathiazole	72-14-0	99	ヒト・動物		0.1		1000	10000	2520
trimethoprim	738-70-5	≥99.0	ヒト・動物	0.27	0.0054		10	100	660
triclosan	3380-34-5	≥98.0	ヒト・動物	0.157	0.039		1	10	4.5
tylosin	1401-69-0	不明	動物		0.05		100	1000	180
DMSO	67-68-5	≥99.0					1.3(vol%)	2.5(vol%)	2.5(vol%)

4. 結論と今後の課題

いずれの被試験抗生物質も報告されている環境水中濃度では、直ちに *P.subcapitata* の増殖阻害性が認められないことが分かった。しかし、現在わが国において医薬品は環境水中濃度が殆ど調査されていないため、国内の環境水中でのリスク評価は困難であり、今後より多くの調査をする必要がある。また、医薬品は一箇所の水中から複数種類同時に検出される報告例が多く、医薬品間やその他化学物質との複合影響も検討される必要がある。さらに、*P.subcapitata* 以外の感受性の異なる生物種の毒性データを検討することも、医薬品の生態系に対する影響評価を行うための今後の課題と考えられる。