

# B-17 藻類・ミジンコ・細菌を用いた 医薬品及び日用品由来化学物質の生態毒性評価

○川上 都香彩<sup>1\*</sup>・山下 尚之<sup>1</sup>・中田 典秀<sup>1</sup>・田中 宏明<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 京都大学大学院工学研究科 (〒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)

\* E-mail: kwkm@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp

## 1. はじめに

近年、水環境中に存在する医薬品及び日用品由来化学物質が注目を集めている。医薬品は生理活性を有するため、低濃度でも慢性的な曝露による水域生態系への影響が懸念されている。また、医薬品に加えて水環境中での検出が報告されている合成香料や紫外線吸収剤などの日用品由来の化学物質は、脂溶性の物質が多いため、生分解性が低く生物蓄積性が大きいと予想される。これらは日常的に広範囲で使用されており、生態毒性評価の必要性が指摘されているが、水生生物に対する影響は未だ明確にはわかっていない。そこで、本研究では、水域生態系の栄養段階が異なる藻類、ミジンコ、細菌を用いて、医薬品及び日用品由来化学物質の生態毒性試験を実施することで、3種の水生生物に対する各対象物質の毒性値を比較検討し、その特徴を把握することを目的とした。また、より詳細な評価を行うべき物質を抽出するために、各対象物質の水環境中濃度の報告値を用いて生態リスク初期評価を行った。

表-1 対象物質

抗菌剤	Azithromycin, Clarithromycin, Erythromycin, Kitasamycin, Tylosin, Chlortetracycline hydrochloride, Oxytetracycline hydrochloride, Tetracycline hydrochloride, Doxycycline hydrochloride, Lincosamin hydrochloride, Chloramphenicol, Thiamphenicol, Gentamicin sulfate, Streptomycin sulfate, Spectinomycin dihydrochloride pentahydrate, Sulfachloropyridazine, Sulfadimethoxine, Sulfadiazine, Sulfamerazine, Sulfamethazole, Sulfamethoxazole, Sulfamonomethoxine, Sulfathiazole, Trimethoprim, Ciprofloxacin hydrochloride, Enrofloxacin, Levofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Amoxicillin, Ampicillin, Benzylpenicillin potassium salt, Piperacillin sodium salt, Cefazolin sodium salt, Ceftiofur, Cefalexin, Fosfomycin disodium salt, Vancomycin hydrochloride, Carbadox, 2-quinoxaline carboxylic acid (QCA), Griseofulvin, Nincarbazin, Triclosan
抗ウイルス剤	Amantadine hydrochloride, Oseltamivir acid hydrate, Acyclovir, Ganciclovir, Saquinavir Mesylate, Zidovudine
解熱鎮痛剤	Acetylsalicylic acid, Antipyrine, Diclofenac sodium salt, Fenoprofen, Ibuprofen, Indometacin, Isopropyl antipyrin, Ketoprofen, Mefenamic acid, Naproxen, Acetaminophen, o-ethoxybenzamide(Ethenzamide), Etodolac, Loxoprofen sodium salt dihydrate
抗潰瘍薬	Nizatidine, Ranitidine hydrochloride, Rebamipide
不整脈用剤	Metoprolol, Propranolol hydrochloride, Disopyramide, Fexofenadine hydrochloride
その他医薬品	Theophylline, Clenbuterol hydrochloride (気管支拡張剤), Furosemide, Caffeine (利尿剤), Diltiazem hydrochloride, Dipyridamole (狭心症治療薬), Bezafibrate, Clotfibric acid (脂質降下薬), N,N-diethyl-m-toluamide(DEET) (忌避剤), Atenolol (高血圧用剤), Carbamazepine (抗てんかん薬), Sulpiride (精神病治療薬), Crotamiton (鎮痒剤), Ifenprodil tartrate (脳循環改善薬), Cisplatin, Cyclophosphamide, 5-fluorouracil (5-FU) (抗がん剤)
合成香料	Benzyl acetate, Isobornyl acetate, Methyl dihydrojasmonate (MDJ), Methyl salicylate, Terpineol, Tonalide(AHTN)
紫外線吸収剤	Benzophenone (BP)

## 2. 医薬品及び日用品由来化学物質の生態毒性試験

### (1) 対象物質の選定

本研究では、①生産量が多いこと、②生態毒性試験を行うにあたって十分な純度の試薬が手に入ること、③水環境中における濃度の報告値が手に入ること、の3つを条件に、表-1に示す94種類の医薬品及び日用品由来等化学物質を選定した。94物質のうち87物質は医薬品であり、6物質は合成香料、残り1物質は紫外線吸収剤である。各対象物質は、ジメチルスルホキシド(DMSO)を溶媒に用い、10000 mg/Lの標準液を作成した。

### (2) 試験方法

本研究では、栄養段階が異なる水生生物に対する医薬品及び日用品由来化学物質の毒性を評価するために、生産者に対する試験として藻類生長阻害試験を、一次消費者に対する試験としてミジンコ急性遊泳阻害試験を、分解者に対する試験としてMicrotox<sup>®</sup>試験を行った。

#### a) 藻類生長阻害試験

供試生物として、緑藻類の *Pseudokirchneriella subcapitata* (旧名 *Selenastrum capricornutum*) (NIES-35株)を用いた。前培養として、試験培地であるAAP培地を用いて24℃、4000 lux、80rpmで振とう培養し、試験には植え継ぎ後3~5日経過し対数増殖期にあるものを用いた。試験に

は 96 穴マイクロプレート（ポリスチレン製，IWAKI 社製）を用い，24℃，4000 lux，120rpm で 96 時間振とう培養した。試験開始後 0，24，48，72，96 時間にマイクロプレートリーダー（Model550，BIORAD 社製）を用いて吸光度を測定し，測定した吸光度から藻類細胞濃度を算出した。求めた藻類細胞濃度から生長阻害率を算出し，用量反応曲線を描くことで半数影響濃度(EC50)を，Dunnett の多重検定手法により最小影響濃度(LOEC)及び最大無影響濃度(NOEC)を求めた。

#### b) ミジンコ急性遊泳阻害試験

供試生物として，*Daphnia magna* (NIES 系統)を用いた。継代飼育及び試験時には人工調製水である M4 飼育水を用い，試験には 24 時間以内に生まれた仔虫を用いた。試験は 100 mL ビーカーを用い，止水式で 20℃，遮光，無給餌の条件で行い，曝露時間は 48 時間とした。試験開始後 24，48 時間に遊泳阻害判定を行い，遊泳阻害数から用量反応曲線を描くことで EC50 を求めた。

#### c) Microtox<sup>®</sup>試験

供試生物として，海洋性発光細菌である *Vibrio fischeri* (旧名 *Photobacterium phosphoreum*) (Strategic Diagnostics 社製)を用いた。試験には Microtox<sup>®</sup>測定装置 (Microtox<sup>®</sup> M500 Analyzer, AZUR Environmental 社製)を用い，付属のマニュアル (Microtox<sup>®</sup> Acute Toxicity Basic Test Procedures) に記された手順で行った。曝露時間は 15 分とし，試験開始後 15 分に発光量を測定し，EC50 を付属の計算ソフトにより求めた。

### (3) 試験結果及び考察

藻類生長阻害試験及び Microtox<sup>®</sup>試験の結果には，福永ら<sup>1)</sup>の測定結果も含まれている。毒性試験の結果，細菌とミジンコの  $\log(1/EC50)$ の相関係数は 0.8035 となり高い相関が得られた。全体的に藻類の感受性が高く，特に抗菌剤においては 3 種の生物の中で藻類に対する毒性が突出していた。しかし，Triclosan については 3 種の生物全てに強い毒性が見られた。また，抗ウイルス剤に関しては，抗菌剤と比較すると毒性は強くなかった。これは，抗ウイルス剤が一般的な抗菌剤とは異なり，基本的にはウイルスが持つ特定の酵素に作用するように作られているからであると考えられる。合成香料及び紫外線吸収剤においては，ミジンコ及び細菌に対して強い毒性を示すものが多かった。ミジンコの  $\log(1/EC50)$ と合成香料及び紫外線吸収剤の分子量，オクタノール/水分配係数  $\log K_{ow}$  及び  $\log K_{ow}$  に pH の影響を加味した  $\log D$  との相関をとると，相関係数が 0.8571~0.8664 となり高い相関が得られた。しかし，医薬品に対してはこれらの物理化学的性質と 3 種の生物に対する毒性値との間に相関は見られなかった。今後，医薬品の作用機序と水生生物への毒性との関係をさらに明らかにすることが課題となる。

### 3. 生態リスク初期評価

#### (1) 評価方法

本研究で対象とした医薬品及び日用品由来化学物質について，より詳細な評価を行うべき物質を抽出するために生態リスク初期評価を行った。この評価は，対象とする化学物質に関して生態系への影響を与えないと予想される濃度 (PNEC: Predicted No Effect Concentration) と，実測または計算により求められる環境濃度 (PEC: Predicted Environmental Concentration) を用いて，PEC/PNEC の値から 3 段階の優先度を与えることで，リスク評価を行うものである。本研究では，①日本の河川中濃度の報告値を用いた評価，②下水処理場放流水中濃度の報告値を用いた評価を行った。PEC を決定する際，花本ら<sup>2)</sup>の淀川調査の結果，Nakada ら<sup>3)</sup>の利根川調査の結果，及び亀田ら<sup>4)</sup>の利根川，荒川，鶴見川，多摩川の調査結果における河川水及び下水処理場放流水での最大報告値を用いた。また，PNEC については，環境省のガイドライン<sup>5)</sup>に基づいて，藻類に対する NOEC をアセスメント係数 100 で除した値と，ミジンコ及び細菌に対する EC50 をアセスメント係数 1000 で除した値とをそれぞれ比較し，最小値を PNEC として用いた。これらのアセスメント係数には，急性毒性値から慢性毒性値への外挿，感受性の種間差，実験室内での結果から野外への外挿という不確実性が含まれ，水生生物の個体群レベルでの保全という観点から評価を行っている。

#### (2) 評価結果及び考察

図-1 に①日本の河川中濃度の報告値を用いた評価の結果を，図-2 に②下水処理場放流水中濃度の報告値を用いた評価の結果を示す。①の評価の結果，PEC/PNEC $\geq 1$  となり「詳細な評価を行う候補」に分類された物質は，Clarithromycin, Triclosan の 2 物質であった。また，0.1 $\leq$  PEC/PNEC $< 1$  となり「情報収集に努める必要がある候補」に分類された物質は，Azithromycin, Ketoprofen, Erythromycin, Sulfamethoxazole の 4 物質であった。また，②の評価では，Ketoprofen, Clarithromycin, Azithromycin, Triclosan の 4 物質が「詳細な評価を行う候補」に分類され，Erythromycin, Ifenprodil, Levofloxacin, AHTN, Caffeine の 5 物質が「情報収集に努める必要がある候補」に分類された。大部分の物質のリスクは藻類に対する毒性の影響が大きい，Caffeine や AHTN のリスクはミジンコに対する影響によるものであった。また，PEC/PNEC $\geq 0.1$  とはなっていないものの，解熱鎮痛剤や合成香料のリスクには，ミジンコ及び細菌に対する毒性が影響しているものが多かった。このことから，栄養段階が異なる水生生物を用いて生態リスク評価を行うことは重要であるといえる。

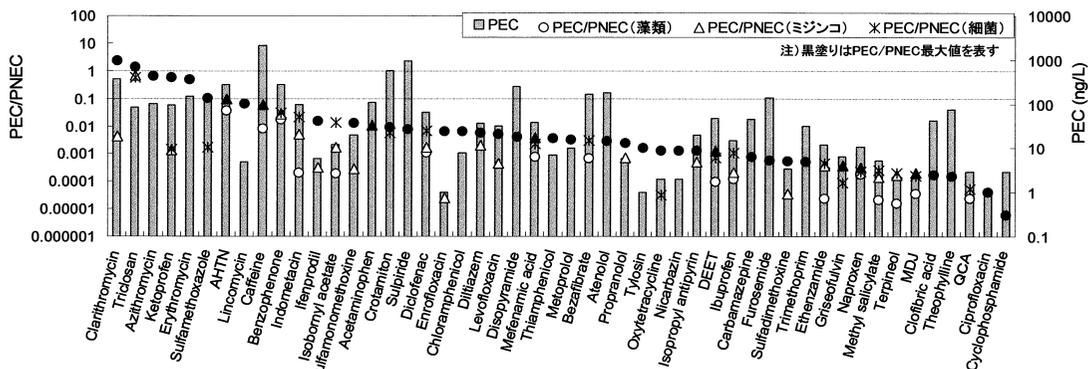


図-1 河川中濃度の報告値を用いた評価の結果

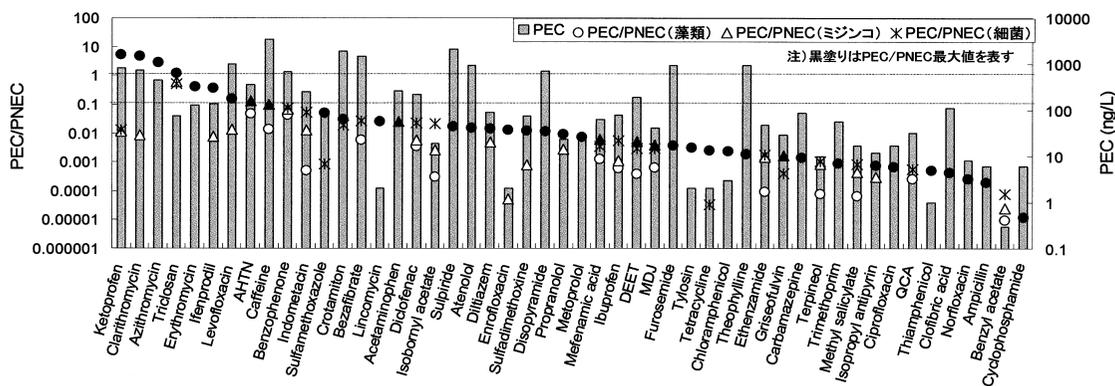


図-2 下水処理場放流水中濃度の報告値を用いた評価の結果

#### 4. まとめ

本研究では、栄養段階が異なる藻類、ミジンコ、細菌に対する医薬品及び日用品由来化学物質の毒性値の比較検討及び生態リスク初期評価を行った。生態毒性試験の結果、全体的に藻類の感受性が高かったが、細菌とミジンコの  $\log(1/EC50)$  との間には高い相関が得られた。また、ミジンコの  $\log(1/EC50)$  と合成香料及び紫外線吸収剤の分子量、 $\log K_{ow}$  及び  $\log D$  との間にも高い相関が得られた。しかし、3種の生物に対する医薬品の毒性には、医薬品の作用機序が関わっていると考えられ、今後その関係を明らかにすることが課題となる。また、生態リスク初期評価の結果、河川中濃度の報告値を用いた評価では Clarithromycin, Triclosan の2物質が「詳細な評価を行う候補」に分類され、下水処理場放流水中濃度の報告値を用いた評価では Ketoprofen, Clarithromycin, Azithromycin, Triclosan の4物質が「詳細な評価を行う候補」に分類された。

謝辞：本研究は日本学術振興会及び国土交通省からの助成により実施されたものである。記して感謝の意を表す。

#### 参考文献

- 1) 福永彩, 杉下寛樹, 山下尚之, 田中宏明: 水生生物に対する医薬品類の毒性影響, 環境衛生工学研究, Vol. 21, No. 3, pp. 27-28, 2007.
- 2) 花本征也, 中田典秀, 山下尚之, 田中宏明: 淀川水系における医薬品類の存在実態, 環境工学研究論文集 (印刷中)
- 3) N. Nakada, K. Komori, Y. Suzuki, C. Konishi, I. Houwa, H. Tanaka: Occurrence of 70 Pharmaceutical and Personal Care Products in Tone River Basin in Japan, *Water Science & Technology*, Vol.56, No.12, pp. 133-140, 2007.
- 4) 亀田豊, 山下洋正, 尾崎正明: 香料及び紫外線吸収剤の下水処理場及び環境中への負荷量原単位推定と下水処理場における除去特性の把握, 水環境学会誌, Vol.31, No.7, pp.367-374, 2008.
- 5) 環境省: 化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン, [http://www.env.go.jp/chemi/risk/guideline\\_ia.pdf](http://www.env.go.jp/chemi/risk/guideline_ia.pdf) (最終アクセス日: 2010.09.23)