

性毒性試験に相当し、OECD TG211 がある。

藻類成長阻害試験：水生生態系の第一次生産者である藻類を用いる試験である。通常、緑藻の *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いるが、抗菌物質には藍藻の *Synechococcus leopoliensis* を用いて試験を実施する。対象群と5濃度以上の試験群について、5,000細胞/mLが生育しているOECD培地に、試験区については3容器に、それぞれの被験物質もしくは溶媒(対照区)を添加混合し、 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、光連続照射を $65\sim 75\text{mE}/\text{m}^2/\text{s}$ 、100rpmの条件下で、72時間振とう培養を行う。この間、24時間ごとに細胞数を計測し、72時間後の成長速度から、半数成長阻害濃度(EC50)および最大無影響濃度(NOEC)を求める。OECD T201、化審法ガイドライン、農薬ガイドラインがある。

抗菌薬の影響試験には、緑藻類より感受性の高い指標生物である藍藻(Cyanophyta)が推奨される。また、抗菌作用を有する物質は、微生物群に影響を与える可能性がある。最高濃度で曝露される可能性が最も高い微生物群は、活性汚泥中の微生物群である。抗菌薬の抗微生物影響を評価するために、活性汚泥呼吸阻害試験(OECD 209)を実施する。

活性汚泥呼吸阻害試験：微生物源として都市下水処理場等の標準化された活性汚泥200mL(4000mg/L)に、合成下水16mLと被験物質を加え、滅菌水を適量加えて合計500mLとし、500~1000mL/分のエアレーション下で3時間接触させた後、培養液中の溶存酸素濃度(DC)を測定する。その結果から、化学物質の分解者である微生物の半数呼吸阻害率を求め、半数呼吸阻害濃度(EC50)を算出する。対照区

2区と被験物質濃度区5区で試験する。この試験は急性毒性試験に相当し、OECDTG209がある。

微生物増殖阻害試験：微生物源として、土壌や表層水中に偏在的に存在する従属栄養細菌である *Pseudomonas putida* を単一種の微生物として用いる。*Pseudomonas putida* を前培養した溶液(A610=0.01)と、栄養培地に被験物質を加えた溶液を混ぜ、止水式で、 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、照度 $65\sim 75\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の連続照射、100rpmで振とう培養し、16時間後、生物量濃度と被験物質濃度を測定する。その結果から、化学物質の分解者である微生物の増殖阻害率を求め、半数増殖阻害濃度(EC10、EC50)を算出する。対照区2区と複数の被験物質濃度区で試験する。ISO 10712がある。

#### 7.4 評価係数を用いたPNECの計算

実施した試験から得られた無影響濃度(NOEC)に評価係数(AF)を適用することにより、予測無影響濃度(PNEC)を算定する。AFは、限られた数の種についての試験結果から実環境への外挿における不確実性の程度を表すものであり、毒性試験および抗微生物影響試験からのPNECの計算には、初期値としてAF10を適用する。このAFは以下を考慮している。

- 感受性の差の種間変動
- 種内変動
- 実験室データから野外での影響への外挿

PNEC<sub>水</sub>は、魚類、ミジンコ類および藻類を用いる表3で示した推奨される毒性試験で得られた各種生物種でのNOECのうち、最も値の小さなものとする。

ただし、PNEC<sub>微生物</sub>は、藍藻を用いた藻類成長阻害試験や活性汚泥呼吸阻害試験等の微生物に対する影響試験のNOEC結果を用いる。PNEC<sub>地下水</sub>は、ミジンコ類を用いた試

験の NOEC 結果に基づいて行う。

#### 7.5 地下水の評価

地層ろ過経路で地下水に進入する可能性があるため、平均  $K_{oc} > 10000 \text{ L/kg}$  の物質、易生分解性の物質あるいは  $DT_{90} < 3$  日の有効成分等を除き、地下水についても ERA を実施する。単純な推定は  $PEC_{地下水} = 0.25 \times PEC_{表層水}$  の換算式で行い、 $PNEC_{水}$  と比較する。

#### 7.6 段階Aの運命および影響解析の評価

藻類、ミジンコ類及び魚類に対する長期毒性データ、活性汚泥呼吸阻害試験および吸着率 ( $K_{oc}$ ) に関する結果により評価する。 $PEC_{表層水}$  は、製品の販売予測情報により精緻化する。

- 1)  $PEC_{表層水} : PNEC_{水}$  の比が 1 未満の場合は、その後の追加試験は必要ない。有効成分等が水環境に対してリスクを起す可能性は低いと結論できる。したがって、評価をこの段階で終了することができる。
- 2)  $PEC_{表層水} : PNEC_{水}$  の比が 1 を超える場合は、段階Bで水環境における追加評価を実施する。
- 3)  $PEC_{地下水} : PNEC_{地下水}$  の比が 1 を超える場合は、段階Bで水環境における追加評価を実施する。
- 4)  $PEC_{表層水} : PNEC_{微生物}$  の比が 0.1 を超える場合は、段階Bで医薬品の有効成分等の運命及び微生物に対する影響に関する追加評価が必要である。
- 5) n-オクタノール/水分分配係数から有効成分等が水環境から生物に移行し、生体内に蓄積する可能性が示される場合 ( $K_{ow} > 1000$ ) は、段階Bで生物濃縮係数を考慮する。
- 6) 物質が易生分解性でなく、水/底質試験 (OECD 308) の結果から底質への著しい移行が実証される場合は、段階Bで底生生物に対する影響を評価する。

水/底質試験の実施時において、14 日以降のいずれかの時点で有効成分等が 10%以上底質に存在する場合は、水/底質試験成立の基準を満たす。

#### 7.7 段階B：拡大環境運命および影響解析

A段階で  $PEC/PNEC \geq 1$  との評価が出た有効成分等の場合には、A段階の環境影響試験において毒性が強く観察された生物と同じ種類の生物を用いた環境影響試験を実施し、その結果を用いて  $PNEC$  を再計算する。B段階の環境影響試験は、A段階より長期の曝露による慢性毒性試験、繁殖影響試験あるいはA段階より多くの種を用いた試験を行う。

$\log Kow \geq 4.5$  に分類されたヒト用新有効成分含有医薬品の有効成分等の場合には、B段階において魚類生物濃縮試験を実施し、生物濃縮係数 (BCF) を算出する。

段階Bでは、精緻化された  $PEC$  および  $PNEC$  を用い、精緻化されたリスク評価を行う。環境内の分解に関する情報を用いたリスク評価の精緻化は、必要に応じて実施する。

#### 7.8 環境運命分析および $PEC_{表層水}$ の精緻化

地域の表層水濃度を次のように精緻化できる：

$$PEC_{表層水} (II) = \{ (\text{最大用量}) \times (\text{市場浸透係数}) \times (\text{付加市場浸透係数}) \} \times (\text{排出率}) \div \{ (\text{排出量}) \times (\text{処理能力}) \times (\text{吸着係数}) \times (\text{希釈係数}) \}$$

計算には、最悪ケースの推定値を用いる。

#### 7.9 追加すべき影響解析

##### 7.9.1 水/底質への影響

水/底質試験 (OECD 308) の結果により、底質への有効成分等の顕著な移行が認められる場合は、底生生物 (*Hyalella* sp、

Lumbriculus sp あるいは Chironomus sp) に対する影響を調査し、PEC<sub>底質</sub>と比較する。

#### 7. 9. 2 微生物に対する特異的影響

段階Aで、微生物に対するリスクが確認される場合は、段階Bで微生物に対する有効成分等の運命及び影響の追加評価を行う。

欧州化学物質影響評価システム (EUSES、<http://ecb.jrc.it/>) に示されている SimpleTreat モデル等で、暴気槽における曝露濃度 (PEC<sub>暴気槽</sub>) を用いて、微生物に対するリスク指数を精緻化する。PEC<sub>暴気槽</sub> : PNEC<sub>微生物</sub> の比が 1 を超える場合は、段階Bで抗微生物影響の追加解析を行う。

#### 7. 9. 3 段階Bの運命および影響分析の評価

段階Bの最後に、排泄経路に関する情報、排泄された化合物に関する定性的および定量的な情報、場合により追加の長期毒性データ、微生物の阻害に関する追加データおよび生分解性に関する追加情報を含む精緻化された情報を得て評価を実施する。

### 8. その他

#### 8. 1 環境リスク評価報告書について

報告書は、有効成分等の特性、その環境曝露の可能性、環境運命及び影響ならびに必要な応じたリスク緩和を記載するものであって、適切な試験に裏付けられた信頼できる科学的根拠に基づく結論によらなければならない。

その他の関係資料 (例えば、関連する物質の特定の生物学的影響に焦点を当てた試験) が利用可能な場合は、それらも提出する。

評価報告書には、①リスク評価を裏付けるデータの提示と評価、②患者による使用又は未使用の製品の廃棄等により生じた廃棄物の処分による環境への有効成分等の放出に関して申請者が取るべき予防・安全対策案、③医療機関等における患者への投与及び廃棄物の処分に関して、環境に対する

あらゆるリスクを軽減する目的で、医療機関等において取られるべき予防・安全対策について申請者が提供できる情報の概要、④評価文書作成責任者の署名、が記載されていること、を記載する。

#### 8. 2 米国の段階的リスクアセスメント方式

米国では、3段階で環境影響評価を実施し、別途、当該医薬品の物理化学的特性、排出される場所、分解メカニズムについての報告が求められている。

Tier1:適切な生物を用いた急性水生毒性試験

藻類、ミジンコ、魚類などから一種類の生物を選択し、評価を実施する。

EC50 または LC50 に対する環境中最大濃度 (MEEC) の比が 1000 以下の場合で毒性が見られない場合は終了し、1000 以上の場合は Tier2 へすすむ。結果が満足する場合は、残りの二種の生物に対する試験を実施し、全ての結果が満足すれば、Tier1 で評価を終了する。

Tier2 : 水性および/または陸生生物を用いた一連の急性毒性試験

藻類、ミジンコ、魚類による一連の生物種の急性毒性試験。汚泥や土壌などに対して吸着性が高い医薬品については、「植物」、「土壌中微生物」、および「ミミズ」を用いた試験を実施する。

EC50 または LC50 に対する環境中最大濃度 (MEEC) の比が 100 以下の場合で毒性が見られない場合は終了し、100 以上の場合は Tier3 へすすむ。

Tier3 : 水性および/または陸生生物を用いた慢性毒性試験

EC50 または LC50 に対する環境中最大濃度 (MEEC) の比が 10 以下の場合で毒性が見られない場合は終了し、10 以上の場合は使用範囲などを協議する。

米国 FDA Tier1 は、EMEA のガイドライン

に準拠した水生生物試験の実施で可能である。米国FDA Tier2 およびTier3 は、EMA のガイドライン Phase II Tier B に準拠した試験の実施で、一部を除きほぼ支障がない。ただし、「水への溶解度試験(OECD105)」、「解離定数」、「蒸気圧、ヘンリー定数」などの物理化学的特性試験を追加することにより対応が可能である。

#### D. 結論

ヒト用の医薬品の成分として用いられる化学物質は、医薬品が本来の目的により使用された後や、未使用の医薬品として廃棄されることにともない、環境中に排出された際には、医薬品成分としてもつ生理作用に加えて、化学物質としての化学的、物理的、生物学的な性状に由来して、生態系に影響をおよぼす可能性がある。新規に承認されるヒト用新有効成分含有医薬品の上市にともない、ヒト用新有効成分含有医薬品の有効成分原体又はプロドラッグの活性代謝物が有する化学物質としての化学的、物理的、生物学的な性状に由来する直接及び間接的に生じる環境に対する負荷を推定し、影響を評価して、人の健康と生態系へのリスク軽減を図ることを目的とする環境影響評価ガイドラインの作成に関する諸外国の情報収集と整理を行った。

この環境影響評価ガイドラインは、ヒト用新有効成分含有医薬品又は活性代謝物を有効成分とするプロドラッグの承認申請新薬について適用するものであり、医薬品の使用、保管および廃棄に関連した ERA に焦点を置く。

医薬品は使用段階においてヒトに投与されることを前提として製造・使用されるものであるから、ヒトの健康リスクは医薬品としての審査時に十分評価されており、環境を通じた曝露が実際の投与量を上回る可能性は極めて低いと考えられるため、基本

的に、環境を介した健康影響リスクを考慮する必要はないと考える。

ここで示す環境影響評価ガイドラインの内容は、現在、販売・使用されている医薬品と承認申請新薬は分けて考え、承認申請新薬について適用することを想定し、販売・使用されている医薬品に対する適用は今後の検討課題とした。また、有効成分等に起因する環境リスクとは、医薬品の使用及び廃棄から生じる環境へのリスクに関係する事項を全て含んでいる。

環境リスク評価を実施した結果、リスクの排除ができない場合を含め、いかなる場合も、ERA の結果が薬事法第14条の承認の可否の判断において、承認申請の却下基準とはしない。申請新薬として使用がされない医薬品については、環境リスク評価を実施した結果、リスクの排除ができない場合においても、予防・安全のために、環境への影響を最小限に抑えるように、実施可能な対策を取ることが求められ、明確な管理のもとで使用することをもって承認の判断をする。承認申請の却下基準とはしない理由は、医薬品の使用目的が疾患に対する予防と治療であることが前提であるによる。医薬品が環境におよぼす影響が懸念される場合であっても、医薬品の開発を制限すべきではなく、医薬品の環境リスクの可能性をあらかじめ把握しておくことが重要であるとの考えに基づいている。

環境リスク評価 (ERA) の結果は、ヒト用医薬品の販売承認を受ける際に、販売承認のための申請書に添付することが求められるべきである。したがって、環境リスク評価書を欠く販売承認申請の場合には、販売承認申請の中で、環境リスク評価書を欠くことの正当な理由を示さなければならない。

また、複数社で共同開発している場合には、代表企業が排出総数を勘案した ERA を提出する。ただし、それぞれの販売予測数

量が異なる場合には、予防・安全対策を勘案して、両社で統一した対策を取ることとする。

効能追加承認申請の場合にも同様に提出する。既に承認され、市場に上市されている医薬品もしくは医薬品の成分が、新たな適応症により使用量の増加に伴い、環境曝露が当初の販売もしくは使用推定量を大きく上回ると想定される場合は、ERA を再度行う必要がある。しかし、販売承認時の更新については、ERA は必要としない。

リスク評価は、以下のような段階的な評価手法を用いることとした。最初の段階(第 I 相)は、ヒト用の医薬品の成分として用いられている物質による環境に対する曝露を、科学的な情報に基づき環境予想濃度(PEC)<sub>表層水</sub> 値を求め、その値が一定値以上になる場合に、次の段階の評価を実施する。次の段階(第 II 相)では、環境における運命及び影響に関する情報を収集して評価を実施する。必要な場合は、藻類、甲殻類及び魚類を用いた慢性毒性を評価できる試験法により予測無影響濃度(PNEC)を求め、PNEC に対する PEC<sub>表層水</sub> 値の比を求める。PNEC に対する PEC<sub>表層水</sub> 値の比の値が 0.1 を超える場合は、PEC<sub>表層水</sub> 値及び PNEC 値を精緻化するため、追加試験を実施する。

#### E. 健康危機情報

なし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

- 1) Nishimura, T., Obama, T., Kubota, R., Kobayashi, N., Sugimoto, N., Kosugi, Y., Suzuki, T. (2011) Attempt to health risk assessment of pharmaceuticals in drinking water.

2011 AAPS Annual Meeting and Exposition.

- 2) 西村哲治、小濱とも子、鈴木俊也、鏑迫典久、久保田領志、小林憲弘、田原麻衣子、清水久美子、杉本直樹 (2011) 医薬品の環境影響評価手法に関する検討、フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー.
- 3) Nishimura, T., Hirose, A., Kawamoto, T., Yano, M., Kosugi, Y., Suzuki, T. (2011) Environmental risk assessment of selected human pharmaceuticals in urban rivers in Japan. SETAC North America 32<sup>nd</sup> Annual Meeting.
- 4) Tatarazako, N., Oka, T., Watanabe, H., Suzuki, T., Nishimura, T. (2011) Effects of pharmaceuticals in environment on aquatic organisms. SETAC North America 32<sup>nd</sup> Annual Meeting.
- 5) 小濱とも子、久保田領志、小林憲弘、杉本直樹、西村哲治 (2011) 環境中に存在する医薬品の環境影響評価について、第 48 回全国衛生化学技術協議会年会.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

図1 医薬品の環境中運命

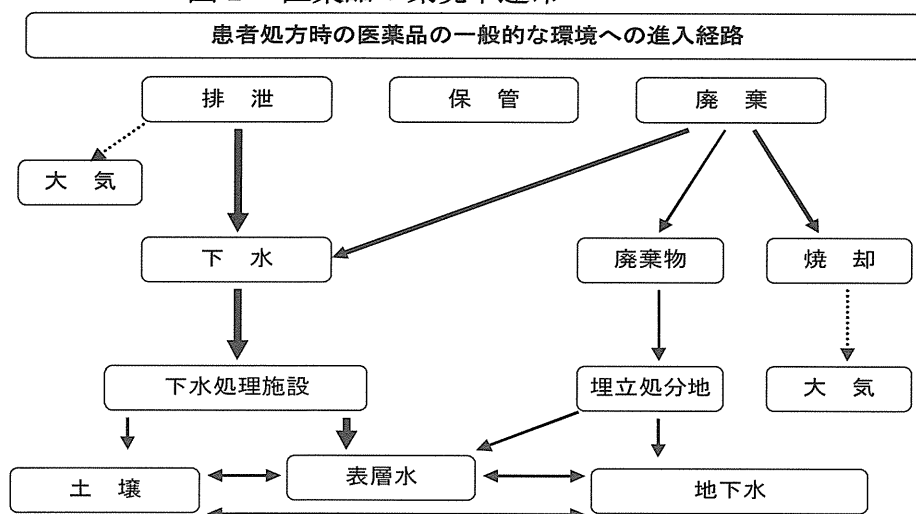


表1 環境リスク評価の段階的アプローチ

評価の段階	リスク評価の段階	目的	方法	試験/ データ要件
第一段階	予備スクリーニング	曝露の推定	曝露の推定	消費予想量、logPow
第二段階(A)	スクリーニング	リスクの初期の予想	リスク評価	水生生物毒性と環境中および体内運命に関する情報
第二段階(B)	スクリーニング	リスクの予想	リスク評価	水生生物毒性と環境中および体内運命に関する詳細な情報

表2 第一段階における PEC<sub>表層水</sub> 計算に対する初期設定値

パラメータ	略称	値	単位	由来	注釈
<u>インプット</u>					
1人が1日に摂取する有効成分等の最大用量	最大用量		[mg/人/日]	申請者の情報に基づく数値	最高推奨用量を使用する。
市場浸透率	市場浸透係数	0.01	[--]	初期値	インフルエンザ薬および風邪薬は3を使用
年間使用期間	年間使用期間係数	1 又は3	[--]	初期値	
住民一人、一日あたりの排水量	排水量	300	[L/人/日]	初期値	
環境中で排水が希釈される割合	希釈係数	10	[--]	初期値	
<u>アウトプット</u>					
表層水中予測環境濃度	PEC <sub>表層水</sub>		[mg/L]		

表3 給水人口別の一日一人使用水量

給水人口	集計数	一日一人使用水量 (L)
100万人以上	14	348
50万人～100万人未満	10	350
25万人～50万人未満	57	349
10万人～25万人未満	134	350
5万人～10万人未満	209	362
3万人～5万人未満	209	369
2万人～3万人未満	169	357
1万人～2万人未満	323	387
5千人～1万人未満	323	396
5千人未満	99	549
平均		355

表4 経営主体区分による一日一人使用水量

経営主体区分	集計数	一日平均給水量(m <sup>3</sup> )
都道府県営	5	6,362,421
市営	911	31,536,131
町営	542	2,917,814
村営	41	163,014
県市町よりなる企業団	1	1,525
市町村よりなる企業団	34	1,148,322
町村よりなる企業団	13	136,016
その他	9	15,642
合計	1,556	42,280,885

表5 一級河川の年間総流出水量

地域	年間総流出量(億m <sup>3</sup> )			平成15年及び平成14年の傾向	
	平成15年 (A)	平成14年 (B)	最近10年 間の平均 (C)	{(A)／(C)} x100	{(B)／(C)} x100
北海道	306.08	322.51	361.20	95	85
東北	482.17	591.99	502.90	81	96
関東	178.98	186.70	170.35	96	105
北陸	466.98	484.17	467.96	96	100
中部	339.00	228.90	287.86	148	118
近畿	224.11	162.44	213.68	138	105
中国	229.06	151.93	197.34	151	116
四国	148.66	85.07	141.63	175	105
九州	310.82	219.77	278.37	141	112

表6 第二段階 段階Aで推奨される物理-化学、運命および影響試験

試験の種類	推奨試験法
バッチ平衡法による吸着-脱着	OECD 106 又は OECD 121 又は OPPTS 835.1110
易生分解性試験	OECD 301
水/底質における好気性および嫌気性分解	OECD 308
藻類生長阻害試験	OECD 201
ミジンコ類繁殖試験	OECD 211
魚類初期生育段階試験	OECD 210
活性汚泥呼吸阻害試験	OECD 209

表7 第二段階における PEC<sub>表層水</sub> 計算用のパラメータおよび初期値

パラメータ	略称	値	単位	由来	注釈
<u>インプット</u> 1人が1日に摂取する有効成分等の最大用量 市場浸透率 年間使用期間 付加市場浸透率 下水処理場から表層水に対する排出の割合	最大用量 市場浸透係数 年間使用期間係数 付加市場浸透係数 排出率	0.01 <sup>(*)</sup>	[mg/人/日] [--] [--] [--]	申請者の情報に基づく数値 初期値 申請者の情報に基づく数値 申請者の情報に基づく数値 計算値	最高推奨用量を使用する。 初期値として設定された市場浸透係数にさらに付加する係数(根拠を示す必要がある) * 1
住民一人、一日あたりの排水量	排水量	300	[L/人/日]	初期値	
下水処理場の一日流入水の処理できる割合	処理能力	1	[--]	初期値	
浮遊物への吸着を考慮した係数	吸着係数		[--]	計算値	* 2
環境中で排水が希釈される割合 <u>アウトプット</u> 精緻化した表層水濃度	希釈係数 PEC <sub>表層水</sub> (II)	10	[--] [mg/L]	初期値	

\* 1 : 欧州化学物質影響評価システム (EUSES、<http://ecb.jrc.it/>) に示されている SimpleTreat モデル等を用い、下水処理場から表層水に対する排出の割合を求める。

下水処理場における易生分解性試験 (OECD 301) を用いることもできる。

\* 2 : 吸着係数の推定データを用いた STP における下水汚泥に対する物質の吸着試験



厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
医薬品の環境影響評価ガイドラインに関する研究  
分担研究報告書

医薬品の環境影響評価における生物影響試験法の開発と確立

研究分担者 鎌迫 典久 独立行政法人 国立環境研究所

研究要旨

環境中に放出された医薬品が生態系に及ぼす影響について評価を行う際に必要となる情報を得るために、生物への毒性影響の視点から評価手法について検討を行った。今年度は、昨年度に引き続き、多摩川流域から検出された医薬品 2 種について、藻類・甲殻類・魚類を用いた生態毒性試験を実施し、医薬品の環境影響評価における慢性試験相当のデータの追加蓄積を行った。また、これまでに藻類、甲殻類及び魚類を用いた短期慢性毒性試験のデータが存在しており、かつ、環境中濃度が測定されている医薬品の中から、多摩川流域で検出濃度の高い上位 14 種類を混合し、下水処理場の排水に含まれる医薬品の毒性寄与程度を推測するため、その混合液を用いて藻類、甲殻類及び魚類を用いた生態影響試験を実施し、個別毒性値と、全毒性値に関する情報を得た。慢性試験相当のデータの追加蓄積のため、本年度は「フェニトイン」及び「スルピリド」について試験を実施した。フェニトインは、藻類への影響が NOEC 1.63 mg/L、甲殻類の影響は NOEC 3.21 mg/L となった。スルピリドは、藻類でのみ影響が認められ (NOEC 50 mg/L)、甲殻類では 100 mg/L で影響がなかった。魚類においては、両物質とも影響を示さなかった。

多摩川流域の環境中濃度の 1x から 10000x の混合試験液にて短期慢性毒性試験を実施した結果、藻類では影響が見られず、甲殻類と魚類においては、環境中の濃度とは大きく乖離しているが、環境中の 10000 倍高い濃度で影響が認められた。この濃度は、藻類に対するメフェナム酸を除いて、少なくとも 7 種の医薬品における各生物試験の NOEC 以下であった。したがって、藻類に対しては個別医薬品による相殺作用が、甲殻類及び魚類に対しては相加あるいは相乗作用による複合影響あったと考えられる。試験に用いた個別物質に対する生物影響について情報を追加し、実環境水を用いた生物試験を実施することで、実態に基づいた生態影響評価を行うことが必要である。

A. 研究目的

環境中に放出された医薬品が生態系に及ぼす影響について評価を行う際に必要となる情報を得るために、生物への毒性影響の視点から評価手法について検討を行った。

今年度は、昨年度に引き続き、多摩川流域から検出された医薬品 2 種について、藻類・甲殻類・魚類を用いた生態毒性試験を実施し、医薬品の環境影響評価における慢性試験相当のデータの追加蓄積を行った。また、これ

までに藻類、甲殻類及び魚類を用いた短期慢性毒性試験を実施している医薬品で、かつ、環境中濃度が測定されている医薬品の中から、検出濃度の高い上位 14 種類を混合し、下水処理場の排水に含まれる医薬品の複合影響を求めるために、混合液を用いて藻類、甲殻類及び魚類を用いた生態影響試験を実施し、個別毒性値と、全毒性値に関する情報を得た。

## B. 研究方法

### 1. 慢性試験相当のデータの追加蓄積

#### 1. 1 対象物質の選定

検討対象とする医薬品は、代表的な都市河川である多摩川において実施された水中の医薬品に関する調査において検出報告のある物質を参考に選定を行った。検討対象とした医薬品 2 種（「フェニトイン」及び「スルピリド」）を下記に示す。なお、平成 21 年度及び平成 22 年度に本研究課題にて実施した物質である、「ジクロフェナクナトリウム」、「メフェナム酸」、「フェノフィブラート」、「カルバマゼピン」、「クロタミトン」、「エピナスチン塩酸塩」については、今回の試験対象から除外した。

#### 1. 2 試験溶液の調製

選定した医薬品を生物試験に供する際には、藻類試験では OECD にて推奨されている標準培地（OECD 培地）、甲殻類と魚類試験では飼育水（調温清浄濾過水）に直接溶解して使用した。医薬品の混合液を調製する際には、各物質をアセトンに溶解し、乾燥後、標準培地、または飼育水に溶解して使用した。

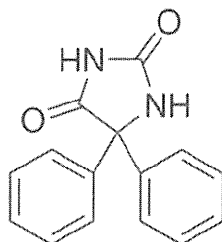
### フェニトイン phenytoin

IUPAC: 5,5-diphenylimidazolidine-2,4-dione

C15H12N2O2

CAS number: 57-41-0

ヒダントイン系の抗てんかん薬



### スルピリド Sulpiride

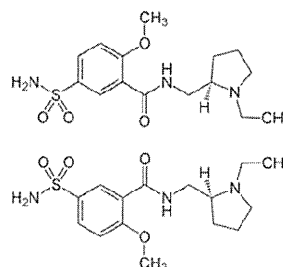
IUPAC: (RS)-N-[(1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl]-2-methoxy-5-sulfamoylbenzamide

C15H23N3O4S

CAS number: 15676-16-1

定型抗精神病薬

（統合失調症・うつ病及び胃潰瘍・十二指腸潰瘍治療薬）



#### 1. 3 短期慢性毒性試験

##### 1) 藻類

試験には、これまで多くの試験で利用されており、かつ試験データの蓄積も多い、浮遊性単細胞の緑藻類のムレミカヅキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*) を用いることとした。試験方法としては、標準培地（OECD 培地）中での藻類細胞増殖を指標とした藻類生長阻害試験（OECD テストガイドライン TG201 及び化審法の藻類試験法）に従って行った。試験の概要は、藻類の標準培地中で藻類を培養し、培地中に対象医薬品を添加した場合と添加しない場合との間で、増殖した細胞数にどのような変化が生じるか観察を行った。その細胞数の変化から増殖速度を計算し、曝露した医薬品濃度との関係から藻類生長への影響を評価する手法である。試験条件の概要について表 1 に示す。

##### 2) 甲殻類

甲殻類のミジンコは、標準的な生態影響試験生物種として広く用いられている。

表1 毒性試験概要

	藻類生長阻害試験	ミジンコ繁殖阻害試験	ゼブラフィッシュ胚・仔魚期短期毒性試験
供試生物	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Danio rerio</i>
試験タイプ	止水式	半止水式	半止水式
試験期間	72 時間	対照区における個体の60%以上が3回産仔するまでの期間（最長8日）	9 日間
水温（℃）	23±2℃	25±1℃	26±1℃
光質	白色蛍光	白色蛍光	白色蛍光
光強度	86±8.6 μE/m <sup>2</sup> /s (400±40 ft-c 或いは 4306lux)。通常用いているレベル	通常用いているレベル	通常用いているレベル
明暗周期	連続照射	16 時間明：8 時間暗	16 時間明：8 時間暗
試験容器の大きさ	500mL	50mL	80 mL
試験容量	100mL	15mL	50 mL
試験溶液の換水頻度	無し	隔日	隔日
供試生物の齢	4-7 日	24 時間齢未満の幼体で、全ての個体が8時間以内に産まれていること	受精後4時間以内の受精卵
供試生物数/試験容器	5000 cells/mL	1 個体	20 個体
連数/濃度区	3 連/濃度区 6 連/対照区	10 連	4 連
供試生物数/濃度区	-	10 個体	80 個体
餌料源	-	クロレラ、ムレミカヅキモ、YCT	-
給餌法	-	一頭当たり YCT 50 μL と懸濁したクロレラ 30 μL 及びムレミカヅキモ 20 μL を毎日給餌	-
振盪速度	連続振盪 100cpm	なし	なし
曝気	曝気しない	曝気しない	曝気しない
希釈水及び対照区	OECD 培地	活性炭濾過上水	活性炭濾過上水
試験濃度区	4~6 濃度区 + 対照区		
希釈系列	最高濃度のストック溶液を希釈水により公比 2（適宜）で希釈		
エンドポイント	生長（細胞数、増殖速度）	生残と産仔数	孵化率、孵化後生存率、生存率、生存指標

表 2 試験に用いた混合液の濃度及び物質の個別生物影響

混合した物質名	下水処理場排水濃度 (µg/L)*		物質ごとの個別影響 (NOEC mg/L)**		
	1x	10000x	藻類	甲殻類	魚類
Mefenamic acid	0.12	1200	0.6	3.9	1.3
Ketoprofen	0.26	2600	-	-	-
Dichlofenac	0.1	1000	25	2	2.5
Etodolac	0.19	1900	-	-	-
Salicylamide	0.11	1100	-	-	-
Indomethacin	0.17	1700	-	-	-
Clofibric acid	0.1	1000	-	-	-
Benzafibrate	0.49	4900	-	-	-
Fenofibrate	0.02	200	0.2	0.2	0.2
Epinastine HCl	0.14	1400	2.3	2.8	48.2
Phentytoin	0.11	1100	1.6	3.2	18
Carbamazepine	0.08	800	4.3	10	50
Amantadine	0.25	2500	-	-	-
Sulpiride (±)	1.39	13900	50	100	100

\*平成22年度「医薬品の環境影響評価ガイドラインに関する研究」より引用

\*\*平成21年度からの本研究による生物試験データより

- 未実施のためデータ無

一般的な繁殖試験としては、ミジンコの繁殖（産仔数）に及ぼす影響を把握するオオミジンコ (*Daphnia magna*) 繁殖試験 (OECD TG211) があるが、ばく露期間が21日間と長期である。そこで、本調査においては、短期間（8日間）で試験を実施することのできるニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) を用い、試験を実施した。試験手法としては、カナダ環境省によるミジンコ亜急性毒性試験 “Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*” に準じ、一定期間（7～8日）にメスが産む仔虫の数が、被験物質の存在下で変化（減少）することを影響の指標として評価した。試験の詳細については表1に示す。

### 3) 魚類

我が国における魚類の生態影響試験につ

いては、化審法テストガイドラインにヒメダカ (*Oryzias latipes*) を用いた魚類急性毒性試験がある。慢性毒性相当の試験については、卵からふ化後約30日までばく露した際の試験魚の成長や行動に及ぼす影響を把握する魚類初期生活段階毒性試験 (OECD TG210) 及び受精卵から卵黄が吸収されるまでの胚仔魚の発生、成長、生残に及ぼす影響を把握する魚類の胚・仔魚期短期毒性試験 (OECD TG212) が、OECDで提示されている。本調査では、魚類胚・仔魚期短期毒性試験を適用して、慢性影響に相当する毒性値を得ることとした。また、使用する魚種としては、受精卵から胚仔魚への孵化に8～10日を要するヒメダカに対して、4日前後で孵化し試験期間が9日間で実施可能なゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いて試験を実施した。受精卵から摂餌を開始する

までの胚の段階である9日間を対象として、被験物質の存在下において孵化及び胚の生存がどのように変化するかを指標として評価するOECDテストガイドライン「魚類の胚・仔魚期における短期毒性試験 (Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages [TG212])」に準じて試験を実施した。評価指標としては、受精卵の孵化をみる「孵化率」、孵化後の仔魚の生残をみる「孵化後生存率」、受精卵からの試験期間中の生存個体数をみる「生存率」を扱うこととした。また、「孵化率」×「孵化後生存率」を生存指標として示した。試験の詳細については表1に示す。

## 2. 混合試験液を用いたバイオアッセイ

### 2.1 混合試験液の調製

多摩川流域の6か所の下水処理場排水から検出された医薬品の中から、0.1µg/L以上の濃度で検出される14種類を混合し、実環境中濃度の1から10000倍の試験液を調製した(表2)。

### 2.2 生物試験

2.1にて調製した混合試験液を用い、藻類生長阻害試験、ニセネコゼミジンコ繁殖試験、ゼブラフィッシュ胚・仔魚期短期毒性試験の3種の生態毒性試験を実施した。各試験の詳細は、「1.3 短期慢性毒性試験」にて記載したとおりである。

## C. 研究結果

### 1. 短期慢性毒性試験によるデータ蓄積

#### 1.1 藻類生長阻害試験結果

藻類生長阻害試験の結果を示す。統計解析は「エコトックス」を用いて行った。図中の星印\*、\*\*は多重比較の結果、それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ の水準で対照区と比較して有意な差が見られたことを示す。また、エラーバーは±標準誤差を示す。

#### 1) フェニトイン

フェニトインの藻類への影響について、

図1に示す。試験の結果、フェニトインの藻類生長への阻害作用は、最大無作用濃度 (NOEC) が1.63mg/L (設定濃度)、50%生長阻害濃度 (EC50) は水溶解度以上 (42 mg/L) と計算された。

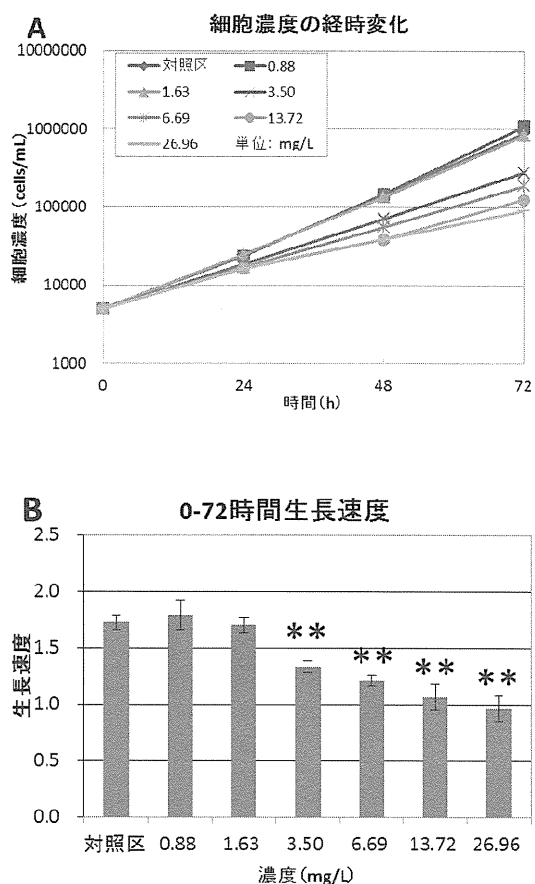


図1 フェニトイン濃度と藻類増殖との関係 (A: 細胞濃度、B: 生長速度)

#### 2) スルピリド

スルピリドの藻類に対する影響について、藻類の成長速度と曝露濃度との関係を図2に示す。試験の結果、スルピリドの藻類生長への阻害作用は、最大無作用濃度 (NOEC) が50mg/L、50%生長阻害濃度 (NOEC) が

50mg/L、50%生長阻害濃度（EC50）は、設定濃度（100mg/L）以上と計算された。

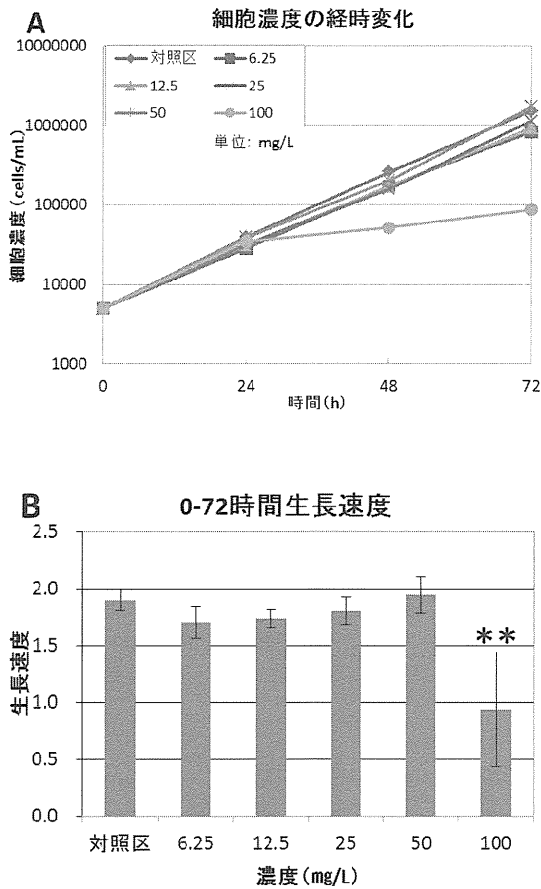


図2 スルピリド濃度と藻類増殖との関係 (A: 細胞濃度、B: 生長速度)

### 1. 2ニセネコゼミジンコ繁殖試験

ニセネコゼミジンコ繁殖試験の結果を示す。棒グラフは各実験区における平均総産仔数を表し、エラーバーは標準偏差を意味する。総産仔数は試験終了時まで試験個体が試験期間中に産んだ生存仔虫の総数とした。統計解析は「エコトックス」を用い、図中の星印\*、\*\*は多重比較の結果、それぞれ  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$  の水準で対照区と比較して有意な差が見られたことを示す。

### 1) フェニトイン

フェニトインの甲殻類への影響について、ミジンコの産仔数と曝露濃度との関係を図3に示す。本試験では、最高濃度の26.2 mg/L及び13.1 mg/Lにおいて、すべての試験個体が抱卵の度に脱卵したため、産仔数はほぼ0であった。1濃度下の7.0 mg/Lにおいても3個体で脱卵が起り、対照区と比べて有意に産仔数が減少した。したがってNOECは3.2 mg/L、EC50は7.2 mg/L (95%信頼区間: 6.1-8.5 mg/L)であった。

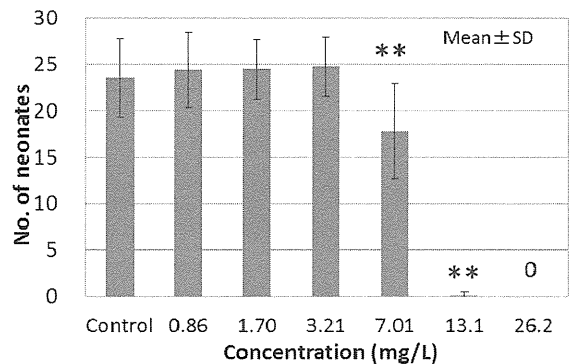


図3 フェニトイン濃度とミジンコ産仔数との関係

### 2) スルピリド

スルピリドの甲殻類への影響について、ミジンコの産仔数と曝露濃度との関係を図4に示す。

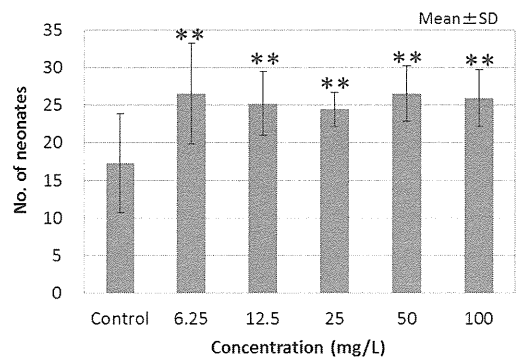


図4 スルピリド濃度とミジンコ産仔数との関係

4に示す。本試験では、対照区に対し、曝露区において産仔数が有意に増加したが、濃度依存的な傾向はなかったため、曝露による影響ではないと考えられる。本試験における NOEC は設定濃度の 100mg/L、EC50 は設定濃度以上であった。

### 1. 3ゼブラフィッシュ胚・仔魚期短期毒性試験

ゼブラフィッシュを用いた試験の結果を示す。グラフは各曝露濃度区における孵化率、孵化後の生存率、生存率、生存指標の平均を表し、エラーバーは標準偏差を示す。統計解析は「GraohPad Prism」を用い、グラフ中の星印\*、\*\*はDunnett testによる多重比較の結果、それぞれ危険率が $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ の水準で対照区と比較して有意な差が見られたことを示す。

#### 1) フェニトイン

フェニトインの魚類への影響について、ゼブラフィッシュの孵化率、孵化後生存率、生存率、及び生存指標と曝露濃度との関係を図5に示す。なお、孵化率は、5日目の孵化率について対照区と比較し、NOEC及びEC50については、生存指標（孵化率×孵化後生存率）から算出した。

本試験において、フェニトインがゼブラフィッシュの孵化率、孵化後生存率、生存率及び生存指標に及ぼす影響は、最高濃度（18mg/L）で確認されなかった。NOEC及びEC50はそれぞれ18mg/L（設定濃度）、 $>18\text{mg/L}$ （設定濃度）であった。

#### 2) スルピリド

スルピリドの魚類への影響について、ゼブラフィッシュの孵化率、孵化後生存率及び繁殖率と曝露濃度との関係を図6に示す。なお、孵化率は、5日目の孵化率について対照区と比較し、NOEC及びEC50については、生存指標から算出した。

スルピリドがゼブラフィッシュ胚・仔魚期に対して及ぼす影響について調べた結果、

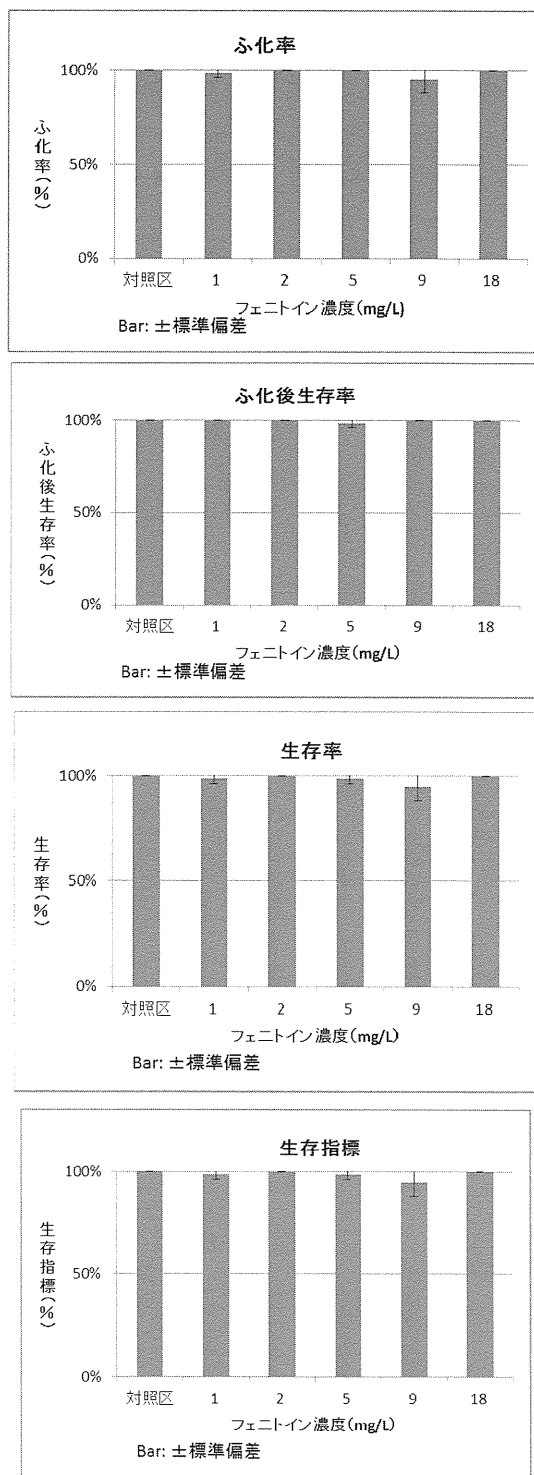


図5 ゼブラフィッシュの孵化率、孵化後生存率、生存率、及び生存指標と曝露濃度との関係（フェニトイン）

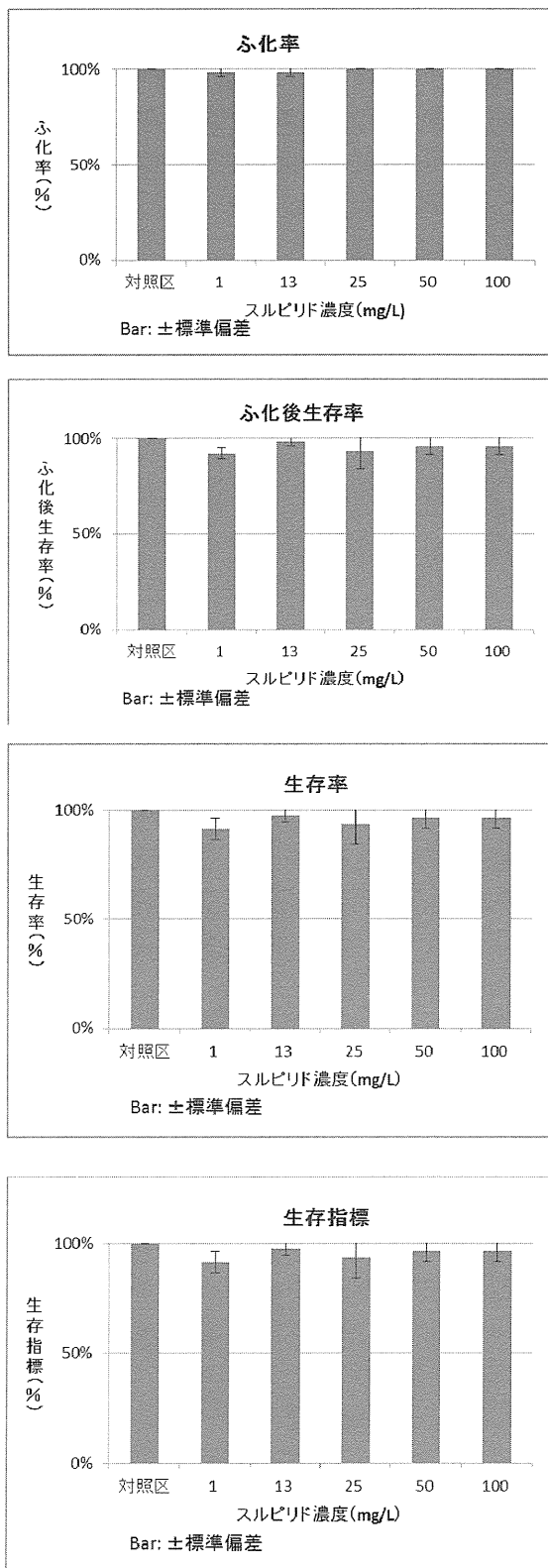


図6 ゼブラフィッシュの孵化率、孵化後生存率、生存率、及び生存指標と曝露濃度との関係 (スルピリド)

スルピリドがゼブラフィッシュ胚・仔魚期に対して及ぼす影響について調べた結果、胚すなわち、孵化への影響は確認されなかった。また、孵化後の生存についても影響が見られなかった。本試験におけるNOECは100mg/L (設定濃度)、EC50は>100 mg/L (設定濃度)と計算された。

#### 1. 4 生物試験結果まとめ

多摩川流域から検出された医薬品2種 (フェニトイン、スルピリド) を対象として、ムレミカヅキモ生長阻害試験、ニセネコゼミジンコ繁殖試験、及びゼブラフィッシュ胚・仔魚期短期毒性試験を実施した。

表3に示すように、フェニトインに対する短期慢性毒性試験の結果、藻類では、3.5 mg/Lで生長阻害が確認された。甲殻類では7.0mg/Lで産仔数が減少した。魚類の試験では、本試験の指標において、影響が認められなかった。一方、スルピリドに対する試験では、最高濃度 (100mg/L) で藻類の生長阻害が確認されたが、甲殻類及び魚類では、本試験の指標に対して影響が認められなかった。

#### 2. 混合試験液を用いたバイオアッセイによる影響評価

##### 2. 1 藻類への影響

藻類生長阻害試験の結果を図7に示す。統計解析は「エコトックス」を用いて行い、図中の星印\*、\*\*は多重比較の結果、それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ で対照区と比較して有意な差が見られたことを示す。また、エラーバーは±標準誤差を示す。

環境中濃度の10000倍濃度で混合した試験液を用い、藻類生長阻害試験を実施した。本研究では、藻類の生長に対する影響は確認されなかった。



表3 生物影響まとめ

試験生物	指標及び影響	フェニトイン (mg/L)		スルピリド (mg/L)	
		NOEC	EC50	NOEC	EC50
藻類	生長阻害	1.6	45(溶解度以上)	50	>100
甲殻類	産仔数の減少	3.2	7.2	100	>100
魚類	生存指標*	18	>18	100	>100

\*生存指標(孵化率×孵化後生存率)

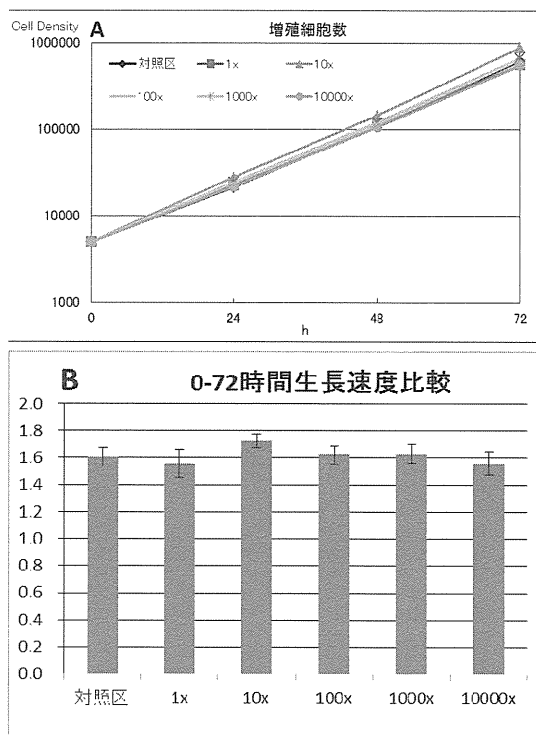


図7 藻類生長阻害試験結果  
(A: 細胞濃度、B: 生長速度)

## 2. 2 甲殻類への影響

ニセネコゼミジンコ繁殖試験の結果を図8に示す。青の棒グラフは各実験区における平均総産仔数を表す。エラーバーは平均±標準偏差を意味する。総産仔数は試験終了時まで生存した試験個体が試験期間中に産んだ生存仔虫の総数とした。図中の星印\*、\*\*はDunnett testによる多重比較の結果、それぞれ  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$  で対照区と比

較して有意な差が見られたことを示す。

今回の試験では、混合試験液の10000倍、すなわち、環境中濃度の10000倍でミジンコの産仔に対する影響が確認された。なお、今回の試験では死亡個体は確認されなかった。

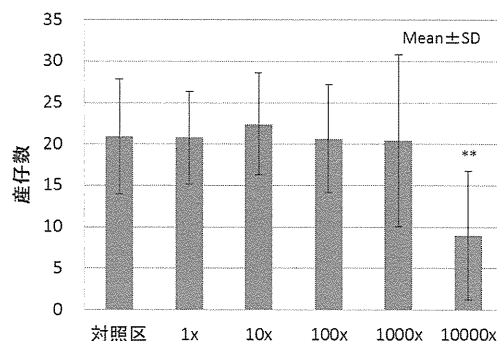


図8 ミジンコ繁殖試験の結果(産仔数)

## 2. 3 魚類への影響

ゼブラフィッシュを用いた試験の結果を示す。グラフは各曝露濃度区における孵化率、孵化後の生存率、生存率及び生存指標の平均を表し、エラーバーは標準偏差を示す。統計解析は「GraohPad Prism」を用い、グラフ中の星印\*、\*\*はDunnett testによる多重比較の結果、それぞれ  $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$  で対照区と比較して有意な差が見られたことを示す。

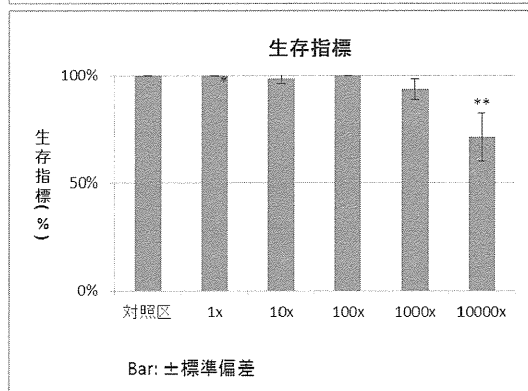
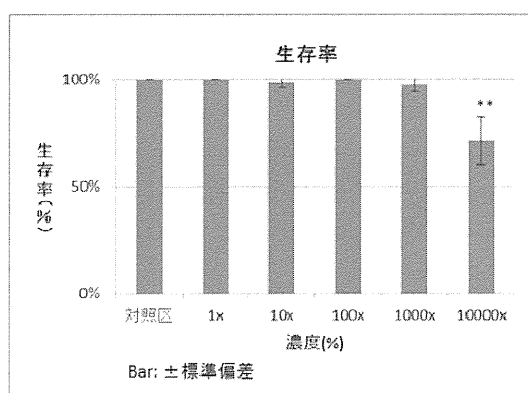
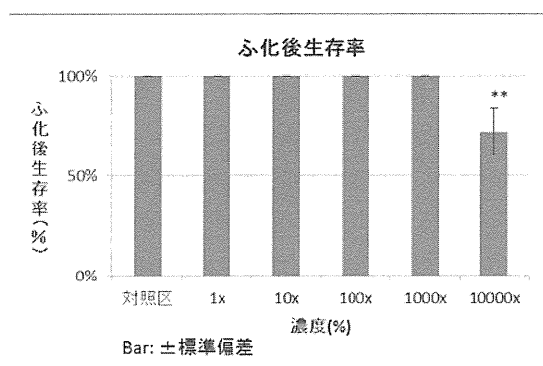
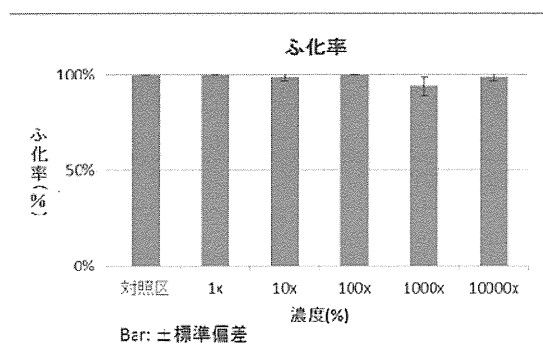


図9 ゼブラフィッシュの孵化率、孵化後生存率、生存率及び生存指標への影響

今回の試験では、医薬品混合液の 10000 倍でゼブラフィッシュの孵化後生残率、生存率、生存指標が低下し、対照区に対し有意な差が認められた。孵化率については 1000 倍で統計学的な差が認められたが、80 個中 3 個の卵の孵化が 1 日遅れたことが原因であり、最高濃度では差が認められなかったことから、孵化への影響は無いと考えられた。

## 2. 4 個別の医薬品から予測される混合試験液の影響

今回の試験では実環境中濃度の 10000 倍の混合試験液において、藻類に対する影響は見られなかったが、魚類及び甲殻類において影響が見られた。この結果と、個別の医薬品の生物影響から相加的に予測される混合試験液の影響の比較を行う。

まず、個別の医薬品の生物影響が混合試験液において相加的に影響していると仮定する。次に生物影響の見られた 10000 倍試験液における各医薬品の濃度を NOEC で除した毒性単位 TU を算出する。TU が 1 を超えた場合、生物影響があると見なせる。よって各医薬品の TU の合計値が 1 を超えた場合、混合試験液は生物影響があると予測される。

今回使用した医薬品 14 種のうち、平成 21 年度から実施してきた個別医薬品の生物影響試験の蓄積があるのは 7 種のみである。したがって、個別物質に対する生物影響の情報は十分ではないが、データのある 7 種のみ結果を表 4 に示した。これによると、藻類に対しメフェナム酸の TU が 1 を超えているため、メフェナム酸による生物影響があると予測される。甲殻類及び魚類に対しては、7 物質すべての TU が 1 以下であったため、個別物質による寄与はないと見なせる。

表4 各医薬品の TU (=10000 倍溶液中濃度/NOEC) とその総和

混合した物質名	TU=10000x濃度/NOEC		
	藻類	甲殻類	魚類
Mefenamic acid	2.00	0.31	0.92
Ketoprofen	-	-	-
Dichlofenac	0.04	0.50	0.40
Etodolac	-	-	-
Salicylamide	-	-	-
Indomethacin	-	-	-
Clofibric acid	-	-	-
Benzafibrate	-	-	-
Fenofibrate	1.00	1.00	1.00
Epinastine HCl	0.61	0.50	0.03
Phentytoin	0.67	0.34	0.06
Carbamazepine	0.19	0.08	0.02
Amantadine	-	-	-
Sulpiride (±)	0.28	0.14	0.14
合計	4.79	2.87	2.57

- 未実施のためデータ無

一方、TUの合計値はすべての生物種に対して1を超えており、生物影響のあった甲殻類及び魚類の試験結果との整合性が見られた。すなわち、各医薬品による相加あるいは相乗的な影響があったが、他の7種の医薬品による影響であると考えられる。反対にTUの総和が1を超えていたにも関わらず、藻類に対しては生物影響が見られなかった。原因として、各医薬品の複合影響によりメフェナム酸等による影響が相殺されたこと、あるいは藻類培地中において各医薬品が十分に溶存していなかったことが考えられる。

## 2. 5 まとめ

環境中から検出された医薬品 14 種類を混合し、実環境中濃度の1倍から10000倍の混合試験液にて毒性試験を実施した結果、甲殻類と魚類において、環境中濃度の10000

倍の濃度で生物影響が認められた。

## D. 結論

昨年度に引き続き、多摩川流域から検出された医薬品2種（フェニトイン及びスルピリド）を対象として、ムレミカヅキモ生長期阻害試験、ニセネコゼミジンコ繁殖試験及びゼブラフィッシュ胚・仔魚期短期毒性試験を実施した。

フェニトインに対する短期慢性毒性試験の結果、藻類及び甲殻類で影響が認められたが、魚類では、本試験の最高濃度（水溶解度の限度：18-27mg/L）において影響が認められなかった。抗てんかん薬については、平成22年度の研究でカルバマゼピンに対する短期慢性毒性試験を行っている。今回のフェニトインの結果は、3生物種において概ね似た結果となった。

一方、スルピリドに対する試験では、最高濃度（100mg/L）で藻類の生長阻害が確認されたが、甲殻類及び魚類については、本試験の指標に対して影響が認められなかった。スルピリドは、多摩川からの検出濃度が1µg/L以上であり、他の医薬品に比べて比較的高い値であったことから、生態影響試験の対象物質に選定したが、今回の試験では、3種の生物種に対する影響は、ほとんど無いことが分かった。今後も医薬品類の生態影響評価のためには、継続したデータの蓄積が必要であると考ええる。

実環境中から検出された医薬品 14 種をそれぞれ実環境中濃度の 1 倍から 10000 倍で混合した試験液について短期慢性毒性試験を実施した結果、藻類では影響が見られなかったが、甲殻類と魚類においては、実環境中濃度の 10000 倍の濃度において影響が認められた。10000 倍濃度において、混合した 14 種中 7 種の医薬品の個別濃度は、藻類に対するメフエナム酸を除いて NOEC 以下であった。7 種の医薬品の個別影響から相加作用を仮定して 10000 倍混合試験液の生物影響を予測したところ、すべての生物種において影響が予測された。したがって、甲殻類及び魚類に対しては、個別医薬品による相加あるいは相乗的な生物影響があったと考えられ、一方、藻類に対しては、相殺的な影響により生物影響が見られなかったと考えられた。

今後も引き続き、試験に用いた個別物質に対する生物影響について情報を追加し、実環境水を用いた生物試験を実施することで、実態に基づいた生態影響評価を行うことが必要である。

#### E. 今後の課題

これまで生態影響試験を実施した医薬品（対象 7 種程度）に加え、多摩川から検出された医薬品の個別毒性値の情報を蓄積す

る。また、多摩川流域の環境中予測濃度から求められるリスクが全体リスクを説明できているのかについて、模擬的な考察を行うため、下水処理場排水について藻類、甲殻類、魚類の慢性毒性試験を実施し、全毒性値を得るとともに、生物試験に用いた水に含まれる医薬品の濃度から推定される毒性値の総和（単純相加と仮定）を求め、下水処理場排水中における医薬品の模擬的な環境影響寄与率を求める。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし.

##### 2. 学会発表

- 1) Oka, T., Abe, R., Ogino, S., Saito, K., Watanabe, H., Suzuki, T., Nishimura, T., Tatarazako, N. (2011) Effects of pharmaceuticals in environment on aquatic organisms. SETAC North America 32<sup>nd</sup> Annual Meeting November.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.