

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）
「ヒト用医薬品の環境影響評価ガイドラインとリスク管理等に関する研究」
平成25年度研究報告書

都市部の河川水中ヒト用医薬品の実測濃度と予測濃度との関係に関する研究

研究分担者 川元 達彦 兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学部
研究協力者 矢野 美穂 兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学部
研究協力者 前田 絵理 兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学部

研究要旨

今までの研究結果として、欧州医薬品審査庁（EMA）の環境影響評価ガイドライン第I相のヒト用医薬品の予測濃度（PEC）と実測濃度（MEC）を比較検討した結果、大部分の医薬品でPEC>MECの関係にあったが、一部の医薬品〔エピナスチン（抗アレルギー薬）、カンデサルタン（高血圧症治療薬）、スルピリド、ロラゼパム（精神科用薬）〕でMECがPEC（希釈係数DF=10）を超える結果が得られている。本研究では、比較的使用量の多い5種類の医薬品（ベザフィブラート、クロフィブリン酸、インドメタシン、ケトプロフェン、フェニトイン）を対象とし、異なる二つの都市部河川水中のMECを年4回測定してPECと比較検討を行った結果、5医薬品でPEC>MECの結果が得られた。即ち、これらの5医薬品は、すべての採水時期及び地点でPECの希釈係数（DF）10でMECがPECを超えないことが明らかとなった。ヒト用医薬品の都市河川水中のPECの算出方法として、河川の実態に即した希釈係数（DF）を考慮する必要性が示唆された。

A. 研究目的

今までの研究結果として、欧州医薬品審査庁（EMA）の環境影響評価ガイドライン第I相のヒト用医薬品の予測濃度（PEC）と実測濃度（MEC）を比較検討した結果、大部分の医薬品でPEC>MECの関係にあったが、一部の医薬品〔エピナスチン（抗アレルギー薬）、カンデサルタン（高血圧症治療薬）、スルピリド、ロラゼパム（精神科用薬）〕でMECがPEC（希釈係数DF=10）を超える結果が得られている。

本研究では、5種類の医薬品等を対象とし、都市河川水中濃度を測定してPECとの関係を解析し、今までの研究で得られた知見の再現性を調査し、医薬品の環境影響評価ガイド

ラインの精緻化を図ることを目的とした。

B. 研究方法

1. 都市河川水中医薬品の存在実態調査

1. 1 対象医薬品

調査対象とした医薬品は、先行研究と同様の下記の5種類とした。

ベザフィブラート、クロフィブリン酸、インドメタシン、ケトプロフェン、フェニトイン

1. 2 調査対象の河川水

調査対象の河川水は、兵庫県内のA河川流域の河川水及びB河川流域の河川水とした。河川水の調査は2012年6月から12月までの間の計4回とし、水試料の採水は各河川で2地点とした。

1. 3 試験溶液の調製

河川水試料は褐色ガラス瓶に採取し、氷冷下で持ち帰り、分析に供した。2種類の固相カートリッジ PS-2 と HLB (いずれも日本ウォーターズ社製) をアセトニトリル 10mL、精製水 5mL でコンディショニングし、PS-2 と HLB を直列に接続した。試料水 500mL にギ酸 (LC/MS/MS 用) 0.5mL を添加して pH を約 3 に調整した後、PS-2 側から流速 20mL/min で通水した。通水後、それぞれの固相カートリッジに活性炭カートリッジ AC-2 (日本ウォーターズ社製) を連結して、通気により 30 分間乾燥を行った。乾燥後の PS-2、HLB をアセトニトリル 5mL でバックフラッシュし、溶出液を合わせ、窒素気流下で約 1mL まで濃縮を行った。濃縮液をフィルター (Millex FH 13mm) でろ過し、洗液を合わせて、精密な目盛り付き濃縮管内で窒素気流下、0.5mL 以下まで濃縮を行った。この試料を 0.1%ギ酸含有 10%アセトニトリルで 1.0mL まで正確にメスアップを行った。このうちの 0.5mL をバイアル (不活性化ガラスインサート使用) に移し、内部標準物質 (カルバマゼピン-d₁₀ 10mg/L) 5 μ L を添加して測定試料とした。これを LC/MS/MS 用試験溶液とした。

1. 4 LC/MS/MS の分析条件

HPLC : Acquity UPLC (日本ウォーターズ製)、注入量 : 10 μ L、カラム : Waters Acquity BEC C18 (2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m、日本ウォーターズ)、カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C、移動相 : 0.1% ギ酸含有 5% CH₃CN (5 min 間保持) — (リニアグラジエント) — 0.1% ギ酸含有 95% CH₃CN (15 min)、流速 : 0.4 mL/min.

MS/MS : TQD (日本ウォーターズ製)、キャピラリー電圧 : 2.0 kV/ -2.5kV、脱溶媒温度 : 400 $^{\circ}$ C、脱溶媒ガス流量 : 800L/hr、コーンガス流量 : 50L/hr、コーン電圧 : 20-50 V、イオン源温度 : 150 $^{\circ}$ C、測定モード : ESI

C. 研究結果及び考察

1. 都市河川水中のヒト用医薬品等の存在実態調査

1. 1 A 河川流域における実態調査

A 河川流域の 2 地点 (A1、A2) について、河川水中の医薬品の濃度を 2012 年に 4 回調査を行った。医薬品等の濃度は、ベザフィブラート : 0.003~0.203 μ g/L、クロフィブリン酸 : <0.002~0.061 μ g/L、インドメタシン : <0.010~0.196 μ g/L、ケトプロフェン : <0.002~0.121 μ g/L、フェニトイン : <0.002~0.014 μ g/L であった (図 1 左図)。また、EMEA の環境影響評価ガイドラインより求めた第 I 相の PEC 値よりも高い MEC 値を示した医薬品は認められず (表 1、2)、これらの医薬品については希釈係数 (DF) を 10 の値とすることが適切と考えられた。

1. 2 B 河川流域における実態調査

B 河川流域の河川水についても A 河川と同様、2 地点 (B1、B2) について 2012 年に 4 回調査を行った。医薬品の濃度は、ベザフィブラート : <0.003~0.020 μ g/L、クロフィブリン酸 : <0.002~0.002 μ g/L、インドメタシン : <0.010~0.055 μ g/L、ケトプロフェン : <0.002~0.005 μ g/L、フェニトイン : <0.002~0.010 μ g/L であった (図 1 右図)。EMEA の環境影響評価ガイドラインより求めた第 I 相の PEC 値よりも高い MEC 値を示した医薬品は認められず (表 3、4)、希釈係数 (DF) では 10 の値とすることが適切と考えられた。

D. 結論

本研究では、比較的使用量の多い 5 種類 (ベザフィブラート、クロフィブリン酸、インドメタシン、ケトプロフェン、フェニトイン) の医薬品を対象とし、異なる二つの都市部河川水中の MEC を年 4 回測定して PEC と比較検討を行った結果、5 医薬品で PEC>MEC の結果が得られた。即ち、これらの 5 医薬品は、すべての採水時期及び地点で PEC の希釈係

数 (DF) 10 で MEC が PEC を超えないことが明らかとなった。ヒト用医薬品の都市河川水中の PEC の算出方法として、河川の実態に即した希釈係数 (DF) を考慮する必要性が示唆された。

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
なし

**G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)**

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

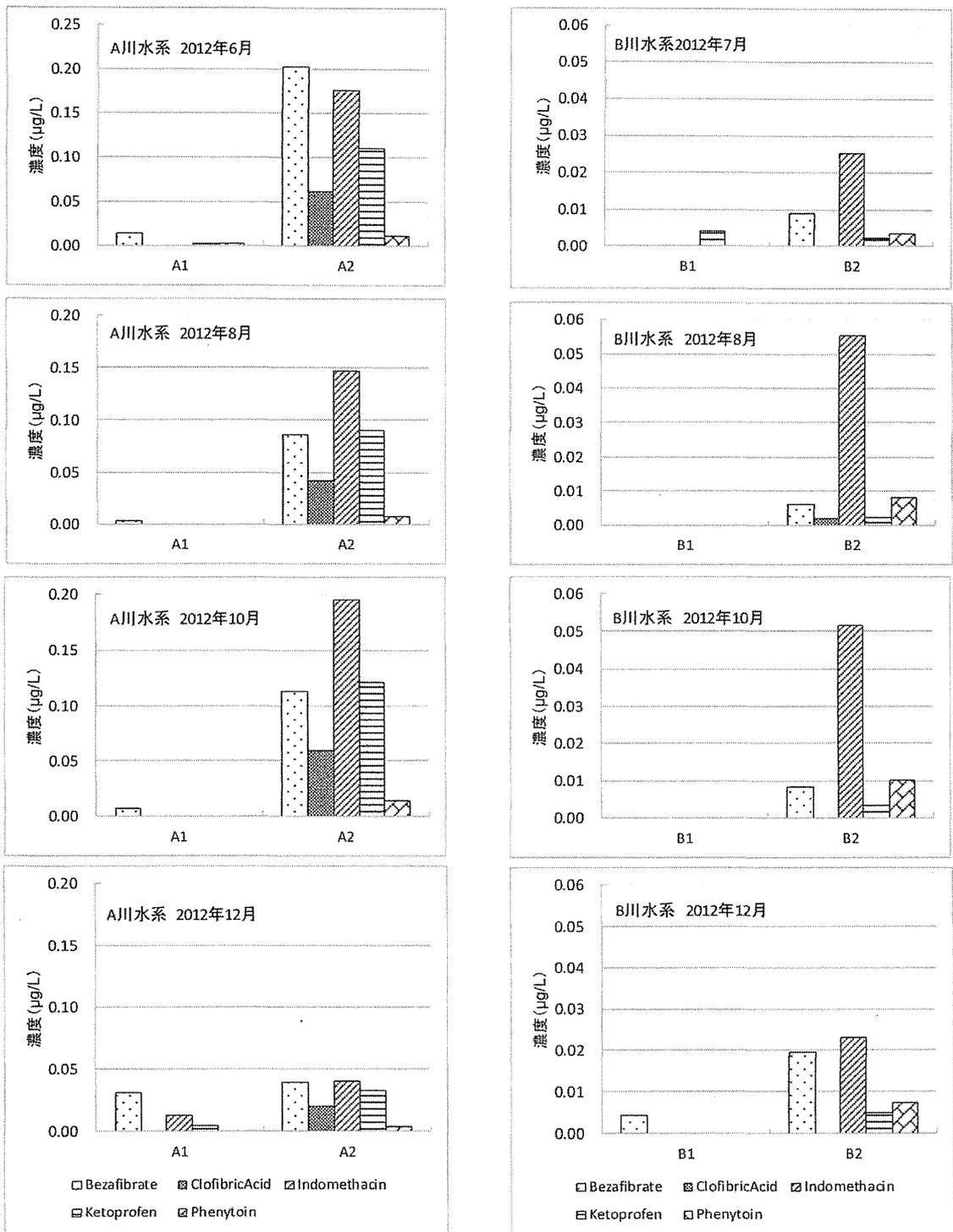


図1 A河川流域（左図）及びB河川流域（右図）の河川水中の医薬品等の存在実態

表1 A河川流域の河川水中の医薬品等のMEC及びPEC

PPCPs	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	Dose max (mg/day)	PEC ($\mu\text{g/L}$)			MECmax* ($\mu\text{g/L}$)	MEC/PEC*100(%)		
			DF=1	DF=2	DF=10		DF=1	DF=2	DF=10
Bezafibrate	0.003	400	20	10	2	0.203	1.0	2.0	10.2
ClofibrinAcid	0.002	1500	75	37.5	7.5	0.061	0.1	0.2	0.8
Indomethacin	0.01	75	3.75	1.875	0.375	0.196	5.2	10.4	52.2
Ketoprofen	0.002	150	7.5	3.75	0.75	0.121	1.6	3.2	16.2
Phenytoin	0.002	300	15	7.5	1.5	0.014	0.1	0.2	0.9

MEC: 2012年6、8、10、12月

PEC: EMEA, Phase I

表2 A河川流域の河川水中の医薬品等のMEC/PECの変動

PPCPs	MEC/PEC*100 (%)							
	A1				A2			
	6月	8月	10月	12月	6月	8月	10月	12月
Bezafibrate	0.7	0.2	0.4	0.4	10.2	4.4	5.7	5.7
ClofibrinAcid	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.6	0.8	0.8
Indomethacin	0.0	0.0	0.0	0.0	46.8	39.5	52.2	52.2
Ketoprofen	0.3	0.0	0.0	0.0	14.8	12.2	16.2	16.2
Phenytoin	0.2	0.0	0.0	0.0	0.8	0.5	0.9	0.9

PEC: EMEA, Phase I, Dilution factor 10

表3 B河川流域の河川水中の医薬品等のMEC及びPEC

PPCPs	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	Dose max (mg/day)	PEC ($\mu\text{g/L}$)			MEC _{max} * ($\mu\text{g/L}$)	MEC/PEC*100 (%)		
			DF=1	DF=2	DF=10		DF=1	DF=2	DF=10
Bezafibrate	0.003	400	20	10	2	0.020	0.1	0.2	1.0
ClofibricAcid	0.002	1500	75	37.5	7.5	0.002	0.0	0.0	0.0
Indomethacin	0.01	75	3.75	1.875	0.375	0.055	1.5	3.0	14.8
Ketoprofen	0.002	150	7.5	3.75	0.75	0.005	0.1	0.1	0.7
Phenytoin	0.002	300	15	7.5	1.5	0.010	0.1	0.1	0.7

MEC:2012年7、8、10、12月

PEC: EMEA, Phase I

表4 B河川流域の河川水中の医薬品等のMEC/PECの変動

PPCPs	MEC/PEC*100 (%)							
	B1				B2			
	7月	8月	10月	12月	7月	8月	10月	12月
Bezafibrate	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	0.3	0.4	1.0
ClofibricAcid	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Indomethacin	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	14.8	13.8	6.2
Ketoprofen	0.6	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.5	0.7
Phenytoin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5	0.7	0.5

PEC: EMEA, Phase I, Dilution factor 10

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）
「ヒト用医薬品の環境影響評価ガイドラインとリスク管理等に関する研究」
平成25年度研究報告書

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 （独）国立環境研究所 環境リスク研究センター 鎌迫 典久
研究協力者 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 鈴木 俊也

研究要旨

ヒト用医薬品の生態系に対するリスク低減を目的とした環境影響評価ガイドラインの作成に必要な情報の収集と整理を行う。今年度は、水生生物に対する医薬品の複合影響を評価するため、多摩川河川中において検出濃度の高い医薬品 10 種を検出濃度比に基づいて混合し、藻類、ミジンコ、魚類を用いた短期慢性影響試験を実施した。同時に、10 種の医薬品のうち、個別のデータを保有していないクラリスロマイシン、ジフェンヒドラミン、アセトアミノフェン、エトドラクについても個別に試験を実施した。そして、個別の医薬品の影響が相加的、あるいは独立的に作用すると仮定したときの予測影響値と、実際の混合溶液の影響値を比較した。

その結果、藻類とミジンコでは相加作用を仮定した Concentration addition (CA) 法と独立作用を仮定した Independent action (IA) 法による用量反応曲線がほぼ重なり、藻類ではクロリスロマイシン、ミジンコではジフェンヒドラミンが支配的に影響していることが予測された。実際の混合溶液試験の結果、藻類は予測値と一致したが、ミジンコは濃度反応曲線の傾きが予測より緩やかであった。一方、魚類では IA 法より CA 法による予測値の方が大きな影響を示したが、実際の混合溶液試験の濃度反応曲線は IA 法と CA 法による予測曲線の間に表示された。この時、ジフェンヒドラミンとケトプロフェンによる寄与が大きかったと推定された。

今後も様々な組み合わせや成分比による検証が必要であるが、今回検証した複数の医薬品の影響は、特定の医薬品が支配的に影響している可能性が高く、個別の医薬品の影響から CA 法あるいは IA 法によって予測できる可能性が示された。

A. 研究目的

ヒト用医薬品の環境に対する負荷の推定と影響の評価を行い、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必要な情報の収集と整理を行う。医薬品の生物に対する影響を評価する環境影響試験として、藻類・甲殻類・魚類を用いた短期慢性影響試験を用いる。

平成 23 年度調査において、医薬品の複合

影響について検討するため、多摩川流域で検出濃度の高い上位 14 種類を混合し、環境中濃度の 1 倍から 10,000 倍の混合溶液を短期慢性影響試験に供したところ、10,000 倍においてミジンコ及び魚類に対し影響が認められた。この濃度は、毒性データのある 7 種の医薬品については、藻類に対するメフェナム酸の NOEC を除いて、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、甲殻類および魚

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た。

しかし、この実験時では、混合したすべての医薬品について毒性データが揃っていなかったこと、混合溶液中の各医薬品の実測値が得られていなかったことから、正確に複合影響に関して考察することはできなかった。そこで本年度は、これらの課題をクリアした上で、複合影響に関して検討を行った。

平成 23 年度と同様、多摩川河川中において検出濃度の高い医薬品 10 種を検出濃度比に基づいて混合し、藻類、ミジンコ、魚類を用いた短期慢性影響試験を実施した。このときばく露濃度について把握するため分析をおこなった。同時に、10 種の医薬品のうち、個別のデータを保有していない医薬品についても個別に試験を実施した。そして、個別の医薬品の影響が相加的、あるいは独立的に作用すると仮定したときの予測影響値と、実際の混合溶液の影響値を比較し、環境中にありうる複数の医薬品の影響が、個別の医薬品の影響から予測可能かどうか考察を行った。

B. 研究方法

1. 対象医薬品

研究協力者である鈴木俊也氏の報告から、多摩川流域 6 下水処理場の放流水又は多摩川水系河川水中で検出濃度の高い上位 10 種を選定した。各医薬品の最高検出濃度、CAS 番号、分子量、構造式、用途を表 B-1 にまとめた。このうち、エピナスチン（塩酸塩）とクロタミトンは平成 22 年度、スルピリドとフェニトインは平成 23 年度、ベザフィブラートとケトプロフェンは平成 24 年度に、既に個別試験を実施しているため、本年度は残りのクラリスロマイシン（東京化成工業(株)）、ジフェンヒドラミン（塩酸塩、東京化成工業(株)）、アセトアミノフェン（和光純薬工業(株)）、エトドラク（和光純薬工業(株)）の 4 種について、新たに個別試験を実施した。

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調温・活性炭濾過水道水（飼育、試験用水として使用）に溶解して調製した。

個別試験においては最高濃度を 100 mg/L とし、適宜公比 2 で希釈して試験に供した。溶解度の高いアセトアミノフェンおよびジフェンヒドラミン塩酸塩については、換水時に直接試験用水に溶解、あるいは最高濃度の 100 倍で超純水に溶かしたストック溶液を作製し、適宜試験用水に添加して調製した。クラリスロマイシンおよびエトドラクについては、ミジンコ及び魚類試験では、アセトンで 100 倍ストック溶液を作製し、換水前日に必要量を試薬瓶に取って蒸散させたところに試験用水を入れ、超音波振とう 30 分後、一晚スターラー攪拌して調製した。藻類試験では直接、OECD 培地に溶解させ、1 日～数日スターラー攪拌して調製した。

混合溶液試験においては、アセトンに溶けにくい、スルピリド、ジフェンヒドラミン、エピナスチンを除いて、環境検出濃度の 1,000,000 倍になるようアセトンに溶解させてストック溶液を作製した。これを換水時に適量、試薬瓶に取って蒸散させたところに試験用水を入れ、30 分超音波振とう（魚類試験はさらに一晚スターラー攪拌）して溶解させ、別途調製したスルピリド、ジフェンヒドラミン、エピナスチンを加えて最高濃度溶液を調製した。

試験濃度は、事前に予備検討を行った結果、藻類は検出濃度の 100 倍から、ミジンコは 1600 倍から、魚類は 30,000 倍から 5 濃度に 2 倍希釈して調製した。

表 B-1 対象医薬品 10 種

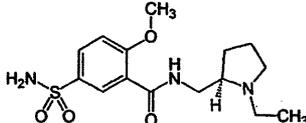
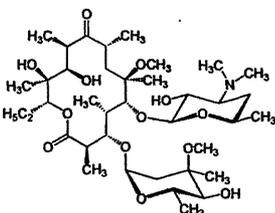
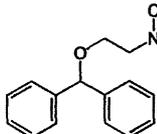
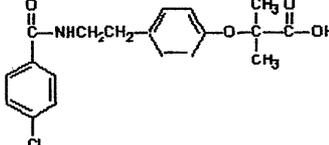
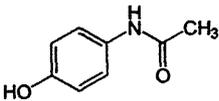
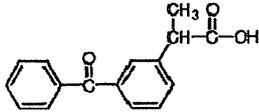
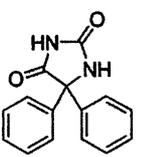
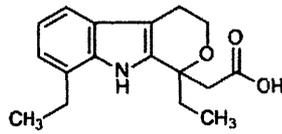
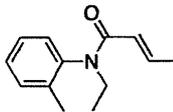
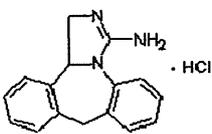
	最高検出 濃度 (ppb)	CAS No.	分子量	構造式	用途
(±)Sulpiride	1.959	15676-16-1	341.43		向精神薬
Clarithromycin	1.291	81103-11-9	747.95		抗生物質
Diphenhydramine HCl	1.209	147-24-0	291.82		抗ヒスタミン薬
Bezafibrate	0.974	41859-67-0	361.82		高脂血症薬
Acetaminophen	0.671	103-90-2	151.16		解熱鎮痛薬
Ketoprofen	0.630	22071-15-4	254.28		解熱鎮痛薬
Phenytoin	0.561	57-41-0	252.27		抗てんかん薬
Etodolac	0.463	41340-25-4	287.35		解熱鎮痛薬
Crotamiton	0.447	483-63-6	203.28		鎮痒薬
Epinastine HCl	0.415	108929-04-0	285.78		抗アレルギー薬

表 B-2 短期慢性毒性試験概要

試験条件	藻類生長阻害試験	ミジンコ繁殖試験	魚類胚・仔魚期毒性試験
供試生物	ムレミカツキモ (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>)
供試生物の齢	2-4日前培養した 指数増殖期の細胞	生後24時間以内の幼体	受精後4時間以内の 受精卵
ばく露方式	止水式, 連続振とう100 rpm	半止水式	半止水式
試験期間	72時間	最大8日間 ^a	9日間
水温 (°C)	23±2°C	25±1°C	26±1°C
光条件	86-90 μmol/m ² /s (60-120 μmol/m ² /s) 白色蛍光, 連続光	10-20 μmol/m ² /s (室内光レベル), 白色蛍光, 16時間明: 8時間暗	
試験用水 (対照区)	OECD藻類培地	活性炭ろ過水道水	活性炭ろ過水道水
試験容器	300 mL容ガラス製三角 フラスコ	50 mL容ガラス製カップ	80 mL容ガラス製カップ
試料量/容器	100 mL	15 mL	50 mL
生物数/容器	5000 cells/mL	1個体	20個体
繰り返し	6連 (対照区) 3連 (濃度区)	10連	4連
濃度区	5-6濃度区 (最大100 mg/Lとする、最高濃度より公比2で試験用水により希釈)		
給餌	なし	毎日1頭あたりクロレラ溶液 0.05mL, YCT 0.05mL	なし
換水	なし	隔日	隔日
エンドポイント	生長速度	産仔数, 供試個体の死亡 率	ふ化率, ふ化後生存 率, 生存指標 ^b

a: 供試個体の6割以上が3腹 (3回) 産仔した時点で終了、b: 生存指標=ふ化率×ふ化後生存率

3. 短期慢性毒性試験

3.1 藻類

試験生物として浮遊性単細胞の緑藻類のムレミカツキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*) を用いた。試験方法は、OECDテストガイドライン 201 および化審法の藻類生長阻害試験法に従った。医薬品を溶解させた標準培地に藻類をばく露し、細胞濃度の経時変化を測定することで生長速度を算出し、

対照区と比べて生長速度がどのくらい阻害されるかを影響の指標として評価した。試験条件の概要は表 B-2 に示す。

3.2 甲殻類

短期間 (最大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*) を試験生物として用い、繁殖試験を実施した。試験方法は、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（6～8日）に供試個体が産む仔虫の数が、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。試験条件の概要は表B-2に示す。

3. 3 魚類

試験生物としてゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用い、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) を実施した。試験方法はOECD TG212に準じ、試験期間は平均ふ化日数約4日に5日を加えた9日間とした。評価指標として、受精卵のふ化をみる「ふ化率」、ふ化後の仔魚の生残をみる「ふ化後生存率」、受精卵からの試験期間中の生存個体数をみる「生存率」を用い、これらを総合する指標として、「ふ化率」と「ふ化後生存率」の積を生存指標として示した。試験条件の詳細は表B-2に示した。

4. ばく露濃度の分析

試験中のばく露濃度を知るため、藻類は試験開始時および終了時、ミジンコ及び魚類は溶液調整時および換水後（2日後）の各試験溶液を分析に供した。ばく露中に濃度が指数関数的に減衰すると仮定し、次式によって平均濃度 C を算出した。

$$C = \frac{C_0 - C_1}{\log C_0 - \log C_1} \quad \text{式(1)}$$

C : 平均濃度、

C_0 : ばく露開始時または溶液調整時の濃度、 C_1 : ばく露終了時または換水後の濃度

各試験時に採取した試験溶液は、研究協力者である東京都健康安全研究センターの鈴木俊也氏に送付し、LC/MS による分析を依頼した（分析方法の詳細は鈴木氏による報告書を参照）。

5. 複合影響の予測

個別物質の影響が相加的に作用すると仮定した Concentration addition (CA) 法、独立的に作用すると仮定した Independent action (IA) 法により、混合溶液の影響を予測する。予測値は Backhaus ら¹の示す計算手順によって以下のように算出した。

CA 法は、濃度 C を $x\%$ 影響値 EC_x で割った毒性単位 TU を足し算することで、混合液の毒性単位を求められると仮定している。式(2)のように表され、TU の総和が1になるとき、混合溶液は $x\%$ の影響を示す。

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{x_i}} = 1 \quad \text{式(2)}$$

c_i : 混合溶液中の物質 i の濃度

EC_{x_i} : 物質 i 単独で $x\%$ の影響を及ぼす濃度

このとき混合液中の物質 i の成分比 p_i が一定であれば、 $x\%$ の影響を示すときの混合液の濃度を $EC_{x_{mix}}$ とすると、 c_i は式(3)で表され、これにより式(2)は式(4)に書き直される。

$$c_i = p_i EC_{x_{mix}} \quad \text{式(4)}$$

$$EC_{x_{mix}} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_{x_i}} \right)^{-1}$$

p_i : 混合溶液中の物質 i の（成分比）濃度比

$EC_{x_{mix}}$: 混合溶液で $x\%$ の影響を及ぼす濃度

IA 法はそれぞれの影響は独立的な事象で起きると仮定しており、濃度 C_{mix} の混合液

¹ Backhaus *et al.* (2000) *Aquatic toxicology*, 49, 49-61.

の影響は式(5)のように表現される。

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)] \quad \text{式(5)}$$

$E(c_{mix})$: i 個の物質の合計濃度 c_{mix} ($=\sum c_i$)
における混合溶液の影響%

$E(c_i)$: 混合溶液中の物質 i の、濃度 c_i に
おける単独影響%

まず、CA法の式(4)から $x\%$ ($x=1\sim99$) 影響を示す混合溶液の濃度 $EC_{x_{mix}}$ を算出した。この混合液中の各物質 i の濃度を式(3)によって算出し、式(5)に代入することで、CA法において $x\%$ の影響を示す混合溶液がIA法において及ぼす影響 $E(c_{mix})$ を算出した。これを $x=1\sim99\%$ についてそれぞれ算出することで濃度反応曲線を得た。

C. 研究結果

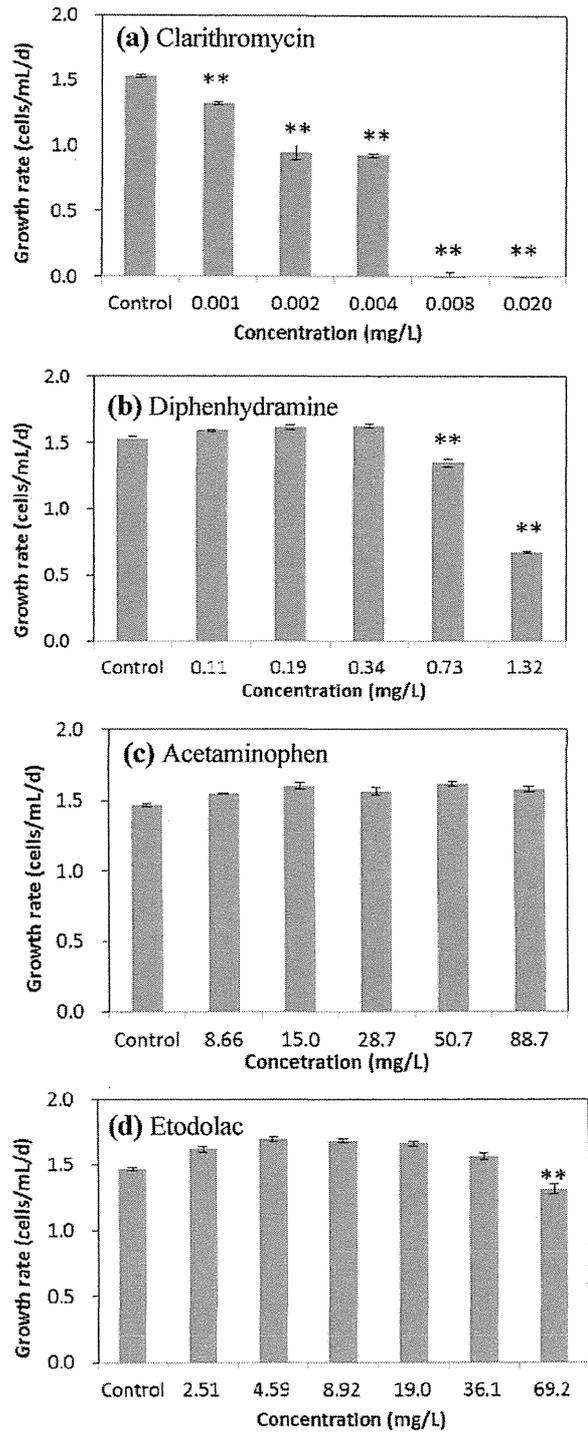
1. 個別医薬品試験

1. 1 藻類生長阻害試験

クラリスロマイシン、ジフェンヒドラミン(塩酸塩)、アセトアミノフェン、エトドラクの試験における72時間生長速度を図C-1に示した。

クラリスロマイシンは、最小濃度 $1 \mu\text{g/L}$ においても対照区に対して有意な差が見られたため、最大無影響濃度 NOEC は $1 \mu\text{g/L}$ 未満であった。これは環境中検出最高濃度より高い結果であり、環境中においてクラリスロマイシンが藻類に影響を及ぼし得る濃度で存在する可能性が示された。プロビット法により算出した5%影響濃度 EC_5 (対照区に対して生長速度が5%減少) は $1 \mu\text{g/L}$ 、50%影響濃度 EC_{50} は $99 \mu\text{g/L}$ であった(表C-1)。

ジフェンヒドラミンは NOEC が 0.34 mg/L 、 EC_{50} は 1.3 mg/L であった。アセトアミノフェンは設定最高濃度 100 mg/L においても生長阻害影響を示さなかった。エトドラクは



図C-1 藻類の72時間生長速度

(a) クラリスロマイシン, (b) ジフェンヒドラミン, (c) アセトアミノフェン, (d) エトドラク (Mean±SD, **: $p < 0.01$ 対照区との有意差あり)

100 mg/L (実測 69 mg/L) において有意な生長阻害がみられたため、NOEC は 36 mg/L となる。EC50 は 147 mg/L と推定されたが、これは外挿値となり水溶解度以上であると考えられる。10 種の医薬品のうち、最も影響が大きい (NOEC 等が小さい) のは、クラリスロマイシンであり、次いでケトプロフェン、ジフェンヒドラミンであった。その他はすべて mg/L レベルであり、環境中検出最高濃度 (表 C-1) の 1000 倍以上高いことが分かった。

表 C-1 藻類試験結果まとめ

Unit: mg/L	NOEC	EC5	EC50
(±)Sulpiride ^a	50	61	99
Clarithromycin	<0.001	0.001	0.003
Diphenhydramine	0.34	0.55	1.3
Bezafibrate ^a	>100	>100	>100
Acetaminophen	>89	>89	>89
Ketoprofen ^a	0.038	0.012	0.150
Phenytoin	1.6	0.98	27
Etodolac	36	55	147 ^b
Crotamiton	5.2	11	68
Epinastine	2.3	2.4	3.8

a: 設定濃度より算出, b: 水溶解度以上

1. 2 ミジンコ繁殖試験

図 C-2 にクラリスロマイシン、ジフェンヒドラミン (塩酸塩)、アセトアミノフェン、エトドラクの個別試験におけるミジンコの産仔数を示した。

クラリスロマイシンは最低濃度の 0.57 mg/L で有意差がしたが、続く 2 濃度区において有意差がつかなかったため、NOEC は 4.6 mg/L とした。NOEC における繁殖阻害率 (対照区の産仔数に対する、産仔減少率) は 12% であった。EC25 は通常、NOEC と LOEC の間になるが、プロビット法による推定値は水溶解度以上の 84 mg/L であった。

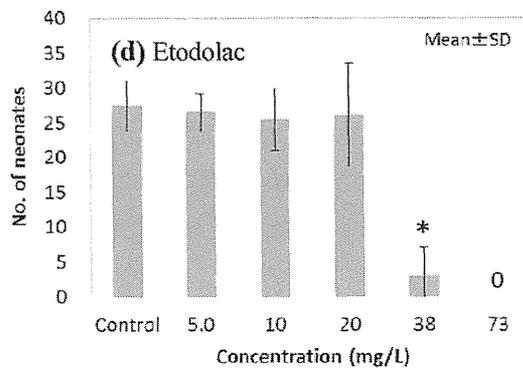
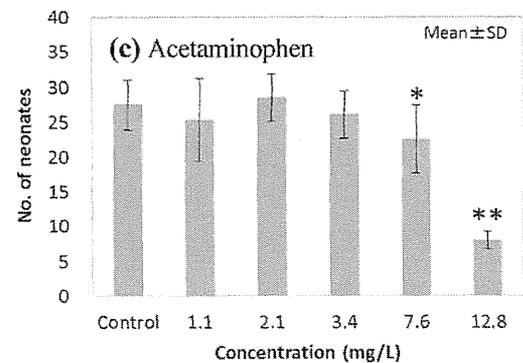
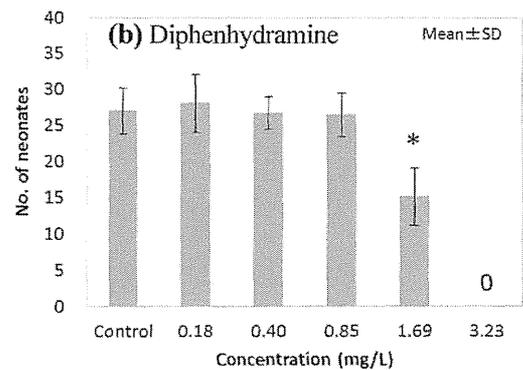
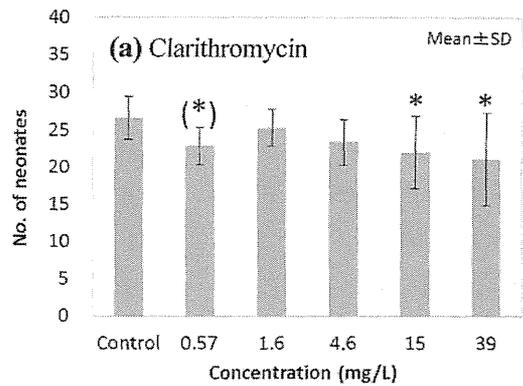


図 C-2 ミジンコの産仔数

(a) クラリスロマイシン, (b) ジフェンヒドラミン, (c) アセトアミノフェン, (d) エトドラク (Mean ± SD, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 対照区との有意差あり)

表 C-2 ミジンコ試験結果まとめ

Unit: mg/L	NOEC	EC25	EC50
(±)Sulpiride ^a	>100	>100	>100
Clarithromycin	5	84 ^a	>84 ^a
Diphenhydramine	0.85	1.4	1.7
Bezafibrate ^a	25	41	53
Acetaminophen	3.4	7.2	10
Ketoprofen ^a	25	25	32
Phenytoin	3.2	6.8	8.1
Etodolac	20	20	26
Crotamiton	6.2	6.6	7.9
Epinastine	2.8	3.9	4.7

a: 設定濃度より算出 (実測濃度なし), b: 水溶解度以上

ジフェンヒドラミンは最高濃度3.2 mg/Lにおいて供試個体がすべて死亡した。NOECは0.85 mg/L、EC25は1.4 mg/L、EC50は1.7 mg/Lであり、濃度反応曲線の傾きが大きくなった。

アセトアミノフェンのNOECは3.4 mg/L、EC25は7.2 mg/L、EC50は10 mg/Lであった。

エトドラクはジフェンヒドラミンと異なり、最高濃度区においても供試個体の死亡率は10%以下であったが、産仔が観察されなかった。NOECおよびEC25は5 mg/L、EC50は26 mg/Lと推定された。

10種の医薬品データをまとめると(表C-2)、最も影響が大きいのはジフェンヒドラミンであり、ついでエピナスチン、フェニトイン、アセトアミノフェンであった。ジフェンヒドラミンのNOECは環境中検出濃度の約1000倍、その他は10,000倍以上高いことが分かった。

1. 3 魚類短期毒性試験

図C-3にクラリスロマイシン、図C-4にジフェンヒドラミン、図C-5にアセトアミノフェン、図C-6にエトドラクの試験結果を示した。クラリスロマイシン、アセトアミノフェン、エトドラクは、ふ化率、ふ化後生存率、生存率および生存指標のすべてのエンドポ

イントにおいて、最高濃度でも影響を示さなかった。一方、ジフェンヒドラミンは、ふ化率には影響しなかったが、ふ化後の生存に影響があり、ふ化後生存率、生存率および生存指標のNOECは9.4 mg/Lであった。生存率のEC10は10.3 mg/L、EC50は16.3 mg/Lであった(表C-3)。

10種の医薬品の結果をまとめると(表C-3)、最高濃度を100 mg/Lまたは水溶解度としたとき、魚類に対して影響を示したのはジフェンヒドラミン、ケトプロフェン、クロタミトン、エピナスチンの4種のみであった。このうち、ふ化率に影響したのはケトプロフェンとクロタミトンのみであった。最も影響の大きい、ジフェンヒドラミンにおいても、NOECは環境中検出濃度の約9000倍であり、その他は30,000~15,000倍であった。

1. 4 プロビット法による濃度反応モデルの推定

各医薬品および各生物試験において、x%の影響を及ぼす濃度EC_x、あるいは濃度C_iにおける影響E(C_i)を推定するため、プロビット法によって濃度反応モデル式(式(6))を推定した。式中の回帰式z=ax+βにおける係数αおよびβを表C-4にまとめた。魚類についてはふ化に影響しなかった医薬品の方が多かったため、生存率に関してのみ算出した。最高濃度においても影響の見られなかった医薬品・生物については、両者を0とした。以下、複合影響の推定において、これらの回帰式に従い、EC_xやE(c_i)を算出する。

$$p = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^z e^{-\frac{1}{2}x^2} dx \quad \text{式(6)}$$

p: 確率 (阻害率または死亡率), x: log 濃度,
z: pの標準正規分布の値 (z=ax+β)

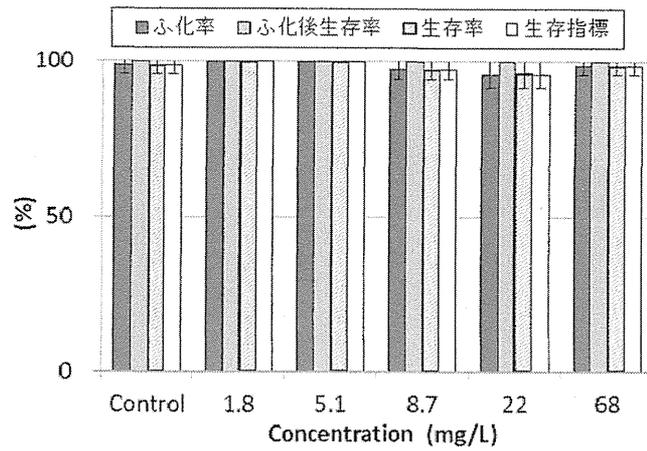


図 C-3 魚類の心化率・心化後生存率・生存率・生存指標：クラリスロマイシン
(Mean ± SD (n=4))

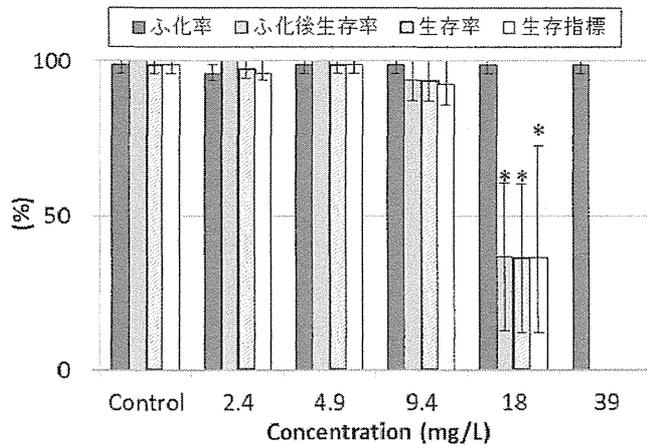


図 C-4 魚類の心化率・心化後生存率・生存率・生存指標：ジフェンヒドラミン
(Mean ± SD (n=4), **: $p < 0.01$ で対照区との有意差あり)

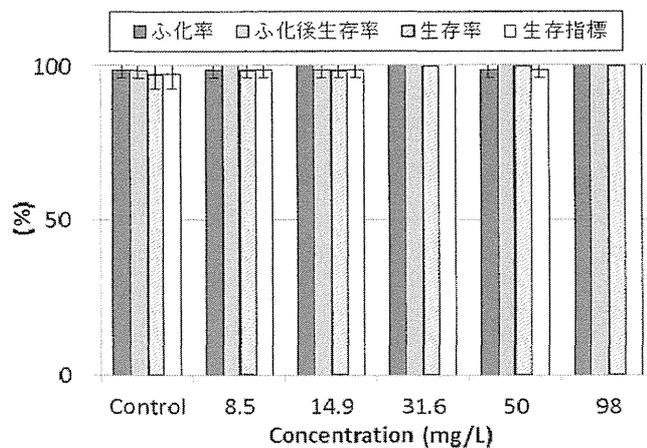


図 C-5 魚類の心化率・心化後生存率・生存率・生存指標：アセトアミノフェン
(Mean ± SD (n=4))

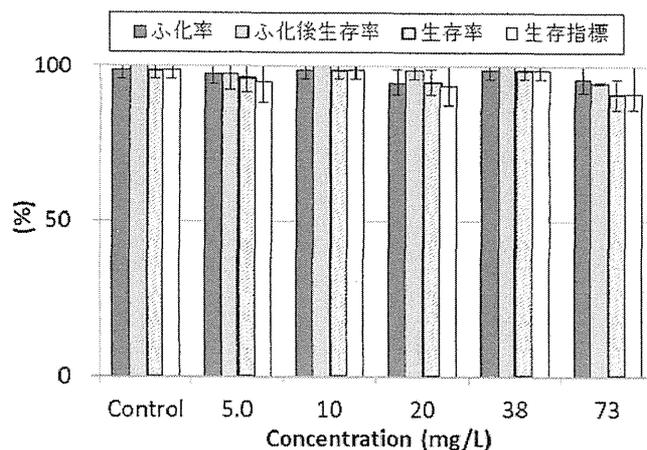


図 C-6 魚類のふ化率・ふ化後生存率・生存率・生存指標：エトドラク (Mean±SD (n=4))

表 C-3 魚類試験結果まとめ

	NOEC (mg/L)			EC10 (mg/L)			EC50 (mg/L)		
	Hatchability	Post-hatch survival	Survival	Hatchability	Post-hatch survival	Survival	Hatchability	Post-hatch survival	Survival
(±)Sulpiride ^a	>100	>100	>100	-	-	-	-	-	-
Clarithromycin	68 ^b	68 ^b	68 ^b	-	-	-	-	-	-
Diphenhydramine	>39	9.4	9.4	-	7.8	10.3	-	12.6	16.3
Bezafibrate ^a	>100	>100	>100	-	-	-	-	-	-
Acetaminophen	>98	>98	>98	-	-	-	-	-	-
Ketoprofen ^a	12.5	6.25	6.25	16.1	5.2	6.6	33.5	14.5	14.0
Phenytoin	18	18	18	-	-	-	-	-	-
Etodolac	73	73	73	-	-	-	-	-	-
Crotamiton	51	25	25	28	39	30	102	57	51
Epinastine	>98	48	48	-	51	32	-	101	96

a: 設定濃度より算出 (実測濃度なし), b: 水溶解度以上, “-”: 最高濃度においても影響が10%未満であったため算出なし。

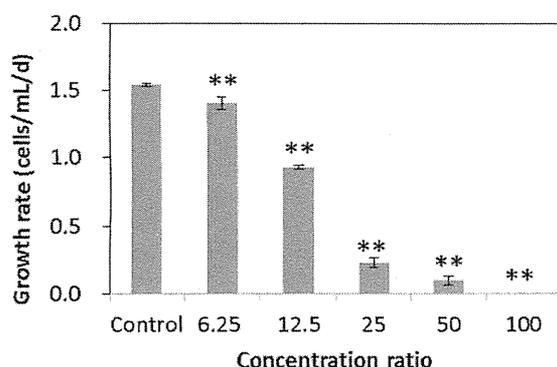
表 C-4 医薬品 10 種の各生物試験におけるプロビットモデルの回帰係数 α 、 β

	Algae		Daphnid		Fish (survival)	
	α	β	α	β	α	β
(±)Sulpiride	7.786	-15.55	0	0	0	0
Clarithromycin	2.64	6.665	0.393	-1.43	0	0
Diphenhydramine	4.623	-0.45	7.546	-1.799	6.414	-7.775
Bezafibrate	0	0	5.86	-10.1	0	0
Acetaminophen	0	0	4.136	-4.213	0	0
Ketoprofen	1.623	1.487	6.768	-10.16	3.925	-4.495
Phenytoin	1.14	-1.633	8.798	-7.979	0	0
Etodolac	3.799	-8.243	5.614	-7.97	0	0
Crotamiton	2.118	-3.877	9.15	-8.202	5.441	-9.287
Epinastine	7.777	-4.539	9.031	-6.049	2.653	-5.261

2. 医薬品混合溶液の試験結果

2. 1 藻類生長阻害試験

10種の医薬品を環境中検出濃度比で混合してばく露した試験における72時間生長速度を図C-7に示した。環境中検出濃度の6.25倍から100倍の5濃度区でばく露した結果、最小濃度の6.25倍においても阻害率9%で有意差がついたため、最小影響濃度 LOEC は6.25倍であった。このとき、阻害率が10%未満であるので、NOEC は LOEC の半値の3.13倍であると推定された。EC5 はプロビット法により4.7倍、EC50 は14.7倍と算出された。



図C-7 混合溶液試験における藻類の72時間生長速度 (Mean±SD, **: $p < 0.01$ で対照区との有意差あり)

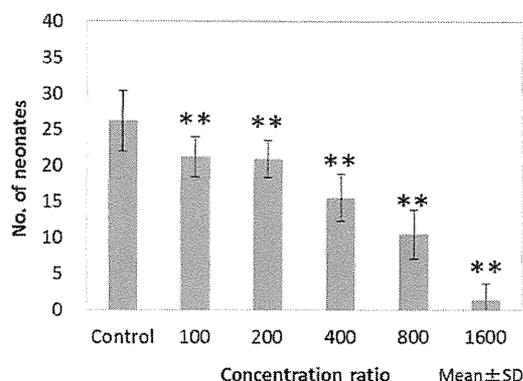
2. 2 ミジンコ繁殖試験

ミジンコ繁殖試験においては、環境中検出濃度の100倍から1600倍でばく露したところ、最低濃度区の100倍においても繁殖阻害率19%を示し、対照区との有意差がついた(図C-8)。したがってLOECは100倍、NOECは100倍未満となった。EC25は195倍、EC50は446倍であった。

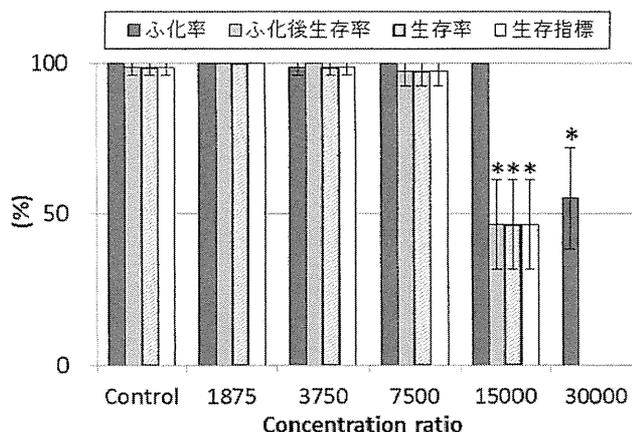
2. 3 魚類短期毒性試験

魚類短期毒性試験では、環境中検出濃度の1875倍から30000倍の5濃度区でばく露した結果、30000倍ではふ化およびふ化後の生存に影響があり、15000倍ではふ化後の生存においてのみ、影響が見られた。したがって、

ふ化率のNOECは15000倍、ふ化後生存率、生存率および生存指標のNOECは7500倍となった。生存率のEC10は9510倍、EC50は14450倍であった。



図C-8 混合溶液試験におけるミジンコの産仔数 (Mean±SD, **: $p < 0.01$ で対照区との有意差あり)



図C-9 混合溶液試験における魚類のふ化率、ふ化後生存率、生存率、生存指標 (Mean±SD, *: $p < 0.05$ で対照区との有意差あり)

2. 4 各医薬品のばく露濃度

混合溶液中の各医薬品の濃度を試験開始時と終了時、または換水の前後で測定し、平均値を式(1)より算出して表C-5に示す(開始時と終了時、換水の前後の各測定値については文末に参考データとして記載する)。環境中検出濃度を1倍として算出した設定値に対する割合も合わせて示した。

表 C-5 混合溶液中の各医薬品の平均実測値、設定値に対する実測値、1 倍濃度平均値

(a) 藻類, (b) ミジンコ, (c) 魚類

(a) Alga

Pharmaceuticals	Nominal 1x conc ^a (ppb)	Average measured concentration in the mixtures (ppm)					Measured concentration/Nominal concentration ^b (%)					Average 1x conc ^c (ppb)	Measured ^d /Nominal ^f
		Concentration ratio					Concentration ratio						
		6.25x	12.5x	25x	50x	100x	6.25x	12.5x	25x	50x	100x		
(±)Sulpiride	1.959	0.013	0.026	0.076	0.140	0.270	107%	108%	156%	143%	138%	2.553	130%
Clarithromycin	1.291	0.001	0.002	0.005	0.011	0.026	10%	13%	17%	18%	20%	0.201	16%
Diphenhydramine	1.209	0.007	0.016	0.029	0.057	0.098	96%	105%	97%	95%	81%	1.147	95%
Bezafibrate	0.974	0.006	0.010	0.026	0.064	0.130	93%	81%	108%	131%	134%	1.068	110%
Acetaminophen	0.671	0.004	0.007	0.014	0.034	0.068	93%	86%	82%	102%	101%	0.621	93%
Ketoprofen	0.630	0.003	0.007	0.017	0.032	0.075	83%	90%	105%	101%	119%	0.629	100%
Phenytoin	0.561	0.004	0.008	0.018	0.037	0.085	120%	120%	128%	134%	152%	0.734	131%
Etodolac	0.463	0.002	0.004	0.009	0.016	0.032	77%	73%	76%	68%	69%	0.336	73%
Crotamiton	0.447	0.004	0.007	0.014	0.025	0.046	132%	129%	129%	114%	102%	0.542	121%
Epinastine	0.415	0.002	0.004	0.010	0.023	0.045	75%	84%	99%	108%	109%	0.396	95%

(b) Daphnid

Pharmaceuticals	Nominal 1x conc ^a (ppb)	Average measured concentration in the mixtures (ppm)					Measured concentration/Nominal concentration ^b (%)					Average 1x conc ^c (ppb)	Measured ^d /Nominal ^f
		Concentration ratio					Concentration ratio						
		100x	200x	400x	800x	1600x	100x	200x	400x	800x	1600x		
(±)Sulpiride	1.959	0.050	0.116	0.267	0.714	2.077	26%	30%	34%	46%	66%	0.788	40%
Clarithromycin	1.291	0.055	0.137	0.377	1.085	3.263	43%	53%	73%	105%	158%	1.115	86%
Diphenhydramine	1.209	0.152	0.316	0.613	1.136	2.006	126%	131%	127%	117%	104%	1.461	121%
Bezafibrate	0.974	0.054	0.125	0.284	0.720	1.782	55%	64%	73%	92%	114%	0.776	80%
Acetaminophen	0.671	0.139	0.236	0.406	0.680	1.124	207%	176%	151%	127%	105%	1.028	153%
Ketoprofen	0.630	0.061	0.139	0.267	0.554	1.114	96%	110%	106%	110%	110%	0.672	107%
Phenytoin	0.561	0.073	0.156	0.296	0.591	1.078	131%	139%	132%	132%	120%	0.733	131%
Etodolac	0.463	0.045	0.088	0.162	0.331	0.598	96%	95%	88%	89%	81%	0.415	90%
Crotamiton	0.447	0.062	0.131	0.247	0.472	0.859	139%	147%	138%	132%	120%	0.604	135%
Epinastine	0.415	0.046	0.101	0.193	0.417	0.865	110%	121%	116%	125%	130%	0.501	121%

(c) Fish

Pharmaceuticals	Nominal 1x conc ^a (ppb)	Average measured concentration in the mixtures (ppm)					Measured concentration/Nominal concentration ^b (%)					Average 1x conc ^c (ppb)	Measured ^d /Nominal ^f
		Concentration ratio					Concentration ratio						
		1875x	3750x	7500x	15000x	30000x	1875x	3750x	7500x	15000x	30000x		
(±)Sulpiride	1.959	0.943	1.890	3.918	9.369	24.019	26%	26%	27%	32%	41%	0.591	30%
Clarithromycin	1.291	0.674	1.739	5.218	15.446	41.580	28%	36%	54%	80%	107%	0.787	61%
Diphenhydramine	1.209	1.159	2.303	4.613	9.274	17.069	51%	51%	51%	51%	47%	0.607	50%
Bezafibrate	0.974	0.707	1.572	3.628	8.743	22.789	39%	43%	50%	60%	78%	0.525	54%
Acetaminophen	0.671	2.401	4.357	7.647	13.053	23.027	191%	173%	152%	130%	114%	1.020	152%
Ketoprofen	0.630	1.331	2.286	4.622	9.344	19.421	113%	97%	98%	99%	103%	0.641	102%
Phenytoin	0.561	1.260	2.527	4.396	9.646	16.807	120%	120%	104%	115%	100%	0.627	112%
Etodolac	0.463	1.075	2.209	4.034	8.150	15.250	124%	127%	116%	117%	110%	0.550	119%
Crotamiton	0.447	1.506	2.893	5.364	10.822	19.796	180%	173%	160%	161%	148%	0.734	164%
Epinastine	0.415	0.269	0.502	0.995	2.017	3.964	35%	32%	32%	32%	32%	0.135	33%

a: Environmental detected maximum concentration, b: Nominal 1x concentration × Concentration ratio, c: Re-calculated 1x concentration from the measured values.

表 C-6 NOEC, ECx の観測値および予測値 (CA: 濃度加算法, IA: 独立作用法)

	Alga			Daphnid			Fish (Survival)		
	NOEC	EC5	EC50	NOEC	EC25	EC50	NOEC	EC10	EC50
Observed value	3.1	4.7	14.7	<100	195	446	7500	9510	14447
Predicted value									
CA	-	3.0	13.6	-	630	780	-	5393	10105
IA	-	3.5	14.3	-	645	850	-	7685	14250

藻類試験においては、クラリスロマイシンを除いて、設定値の約 7 割以上を示したが、クラリスロマイシンは試験終了時の濃度が 0.04~0.6 µg/L まで減衰した。試験開始時と終了時の濃度から式(1) により平均値を算出すると、実測値が設定値の 10~20%となった。藻類試験においてのみ個別試験中でも著しい減衰が観測された。したがって、光分解あるいは藻類に吸着したためと考えられる。

複合影響の推定では (B.5)、混合液中の成分比が分かっており、すべての濃度区において一定であることを前提としている。しかし実測値による成分比は濃度区間で差があったため、複合影響を推定する際の、各医薬品の成分比を再計算した。なるべく濃度区間の差を小さくするため、各濃度区から算出した 1 倍濃度の平均を求め、これを成分比とした。平均 1 倍濃度を基準として各濃度区の設定値を補正して実測値と比較すると、各濃度区および各医薬品の実測値は補正した設定値の 70%~130%以内であったため、成分比は一定と仮定してよいとみなす。

ミジンコ試験においては、スルピリドおよび低濃度区のクラリスロマイシンを除いて、再設定値の 7 割以上の測定値が得られた。スルピリドは換水調整時の濃度が低かったため、十分溶解していなかったと考えられる。藻類と同様に平均 1 倍濃度を計算し、設定値を再計算すると、スルピリドとクラリスロマイシンはやはり低濃度区と高濃度区において再設定値の 70%未満および 130%以上であったが、その他は 70%~130%以内の測定値が得られた。スルピリド単独の EC25 は 100 mg/L 以上、クラリスロマイシン単独の EC25 は水溶解度以上 (表 C-2) であり、今回の混合液中の最高濃度より十分低いことから、この程度の変動幅は複合影響の推定において成分比が一定と仮定しても、大きく影響しないと考えた。

魚類試験において、スルピリド、クラリス

ロマイシン、ジフェンヒドラミン、ベザフィブラート、エピナスチンの実測平均値は設定値の 5 割以下を示す濃度区があった。なお、換水前後での減衰はほとんどみられなかった。魚類試験では設定濃度が高かったため、超音波振とう後、24 時間スターラーで攪拌して調製したが、十分に溶解できていなかった可能性がある。各濃度区の実測値から算出した 1 倍濃度の平均から、設定値を再計算すると、クラリスロマイシンの低濃度区と高濃度区を除いて、設定値の 70%~130%以内であった。ミジンコ試験と同様、魚類試験においてもクラリスロマイシンは 100 mg/L で影響がなかったため、再計算値で成分比が一定と仮定しても影響しないとみなした。

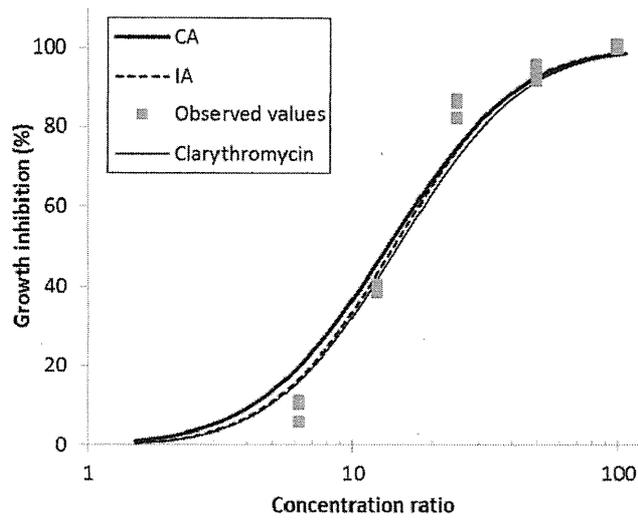
D. 考察:

1. 複合影響の予測と実測値との比較

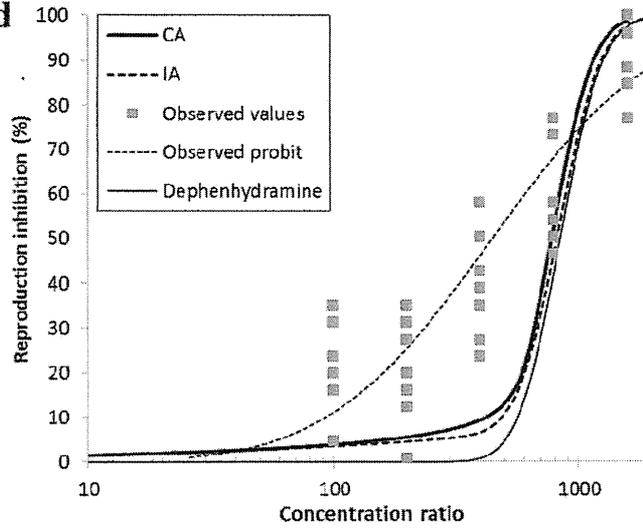
B.5 に前述した方法に従い、実測値から求めた成分比を用いて、個別医薬品の影響が相加的、あるいは独立的に作用すると仮定したときの混合溶液の予測影響値を算出した。その結果を、横軸に環境中検出濃度に対する存在比 (X 倍)、縦軸に影響度合いとして、藻類は(a) 生長阻害率、ミジンコは(b) 繁殖阻害率、魚類は(c) 死亡率をとり、濃度反応曲線を図 C-10 に示した。実際の混合溶液の影響値も各濃度区の平均値ではなく、繰り返しのデータをそれぞれプロットした。

藻類では相加作用を仮定した CA 法と独立作用を仮定した IA 法による濃度反応曲線がほぼ重なった。CA 法の予測値における各医薬品の寄与 (p_i/ECx_i) をみると、クロリスロマイシンが 90%以上寄与していた。混合液中の濃度でクラリスロマイシンが単独に作用したときの濃度反応曲線を描くと (図 C-10(a))、複合影響の予測曲線とほぼ同じであった。つまり混合溶液の影響はクラリスロマイシンによる影響が支配的であると予測された。実測値のプロットをみると、予測曲

(a) Alga



(b) Daphnid



(c) Fish

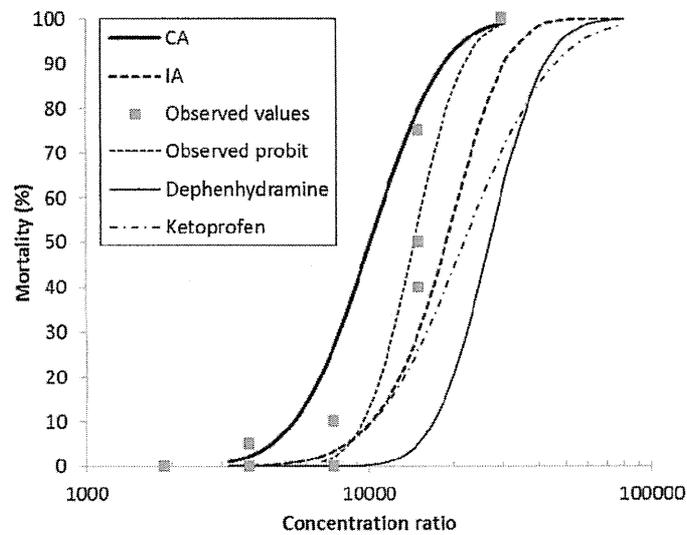


図 C-10 混合溶液試験の実測値と CA 法および IA 法による予測濃度反応曲線

(藻類では混合溶液中のクラリスロマイシン単独、ミジンコではジフェンヒドラミンと混合溶液、魚類ではジフェンヒドラミン、ケトプロフェン単独と混合溶液の濃度反応曲線も合わせて示した)