

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

(医薬品等規制調和・評価研究事業))

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 26 年度分担研究報告書

ヒト用医薬品の地下水中存在実態調査および地下水汚染性の評価

研究分担者 東京都健康安全研究センター 鈴木俊也

研究協力者 東京都健康安全研究センター 小杉有希

研究協力者 東京都健康安全研究センター 渡邊喜美代

研究要旨

ヒト用の医薬品等 (PPCPs) 19 種類を対象に東京都多摩地域の地下水中存在実態を調査した。地下水 187 か所のうち、検出された PPCPs (検出率) は、クロタミトン (43%)、DEET (35%)、カンデサルタン (33%)、カルバマゼピン (33%)、アマンタジン (27%)、スルピリド (12%) およびアセトアミノフェン (9%) であった。検出最高濃度は、クロタミトンの 119 ng/L、各 PPCPs の検出濃度の平均値は、3 - 14 ng/L であった。それら検出された PPCPs の検出濃度の最高値は、多摩地域の下水処理場の流入水中 PPCPs の検出濃度の平均値の 2.367~0.004 であった。一方、下水漏洩の指標であるスクラロースの地下水中の検出率は 33% と、DEET やカンデサルタンと同程度であった。また、スクラロースが検出された地下水 61 か所のうちの 60 か所からいずれかの PPCPs が検出された。スクラロースの検出濃度について、最高濃度が 1295 ng/L、平均濃度が 129 ng/L とどちらも PPCPs に比べて高かった。スクラロースが検出された地下水について、地下水中のスクラロースの濃度を下水中スクラロース濃度で除して漏洩下水の混入の割合を求めた場合、その割合が最も高かった地下水は 0.96 であり、ほぼ全量が漏洩下水によるものと推察される地下水も存在したが、地下水への漏洩下水の混入割合は約 10% と試算された。

PPCPs の地下水汚染性の評価について、農薬用に開発され欧米で既に活用されている 3 シミュレーションモデル (Gustafson、Jury および Cohen のモデル) を PPCPs に適用し、それらによる判定結果と実態調査結果を比較することにより、有用性を評価した。今回対象とした PPCPs の地下水汚染性の判定結果は、カンデサルタンを除き、地下水中の存在実態調査結果と良く一致したことから、これらの 3 つのシミュレーションモデルは、PPCPs の地下水汚染の可能性を評価する上で、有用なモデルであると考えられる。

## A. 研究目的

これまでの研究では、ヒト用の医薬品 (PPCPs) の都市河川水等の表流水を対象とした実態調査が主であった。前年度の予備調査で、PPCPs の一部が ng/L のレベルで検出される地下水が東京都多摩地域に存在することが明らかになった。そこで、今年度は調査地点を増やし、地下水中の存在実態レベルを調査することとした。また、都市域の地下水から PPCPs が検出される原因について、下水漏洩が示唆される調査結果が報告されており、それらの報告の中で下水漏洩の指標としてスクラロース等の人口甘味料が有用であるとされていることから、本調査においても PPCPs とスクラロースの調査を実施した。

下水流入水中から  $\mu\text{g/L}$  レベルで検出される PPCPs のうち、地下水から検出されるものは一部である。下水流入水が漏洩した場合、あるいは期限切れや飲み残しの PPCPs が投棄された場合、河川水等の表流水への混入のみならず、地下水汚染を引き起こす可能性の有無を予測することは、環境影響評価をする上で、必要なことと考えられる。そこで、欧米で既に活用されている農薬の地下水汚染性を評価するモデルが、PPCPs の地下水汚染性を予測するためのツールとして利用可能かどうかを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 1 調査対象の PPCPs

調査対象の PPCPs は、OTC として汎用されている解熱鎮痛消炎剤や抗アレルギー薬、高血圧治療薬や糖尿病治療薬等の生活習慣病の治療薬、精神科用薬、抗生物質および既に海外等で検出事例がある PPCPs 等合わせて 19 成分とした (Table 1)。また、下水漏洩の指標として人工甘味料スクラロースも調査対象とした。

### 1. 2 調査対象の地下水

調査対象の地下水は、東京都多摩地域の飲用井戸水および専用水道原水 (地下水) とし、調査期間 (件数) は 2010 年 5 月から 2011 年 1 月 (95 件) および 2013 年 9 月から 12 月 (92 件) であった。地下水は、アセトンで洗浄した褐色共栓ガラスビンに採水し、採水後に冷暗所に保存し、2 日以内には 1.3 試験溶液の調製で示す方法により試験溶液を調製し、測定まで冷凍庫内に保管した。

### 1. 3 試験溶液の調製

固相カートリッジは、アセトニトリル 10 mL、精製水 5 mL の順でコンディショニングした HLB plus (日本ウォーターズ) を使用した。地下水試料 500 mL を流速 20 mL/min で HLB Plus に通水し、PPCPs 成分を吸着させた。HLB Plus に活性炭カートリッジ AC-2 を連結し、30 分間空気を通気させることにより乾燥させた。HLB Plus からの PPCPs の溶出はメタノール 5 mL を通水方向と逆方向から流しながら約 1 分間かけて行った。メタノール溶液を窒素気流下 40°C で 0.5 mL に濃縮し、カルバマゼピン- $d_{10}$  5  $\mu\text{L}$  を内部標準として加え、これを LC/MS または LC/MS/MS 用の試験溶液とした。

### 1. 4 LC/MS および LC/MS/MS の分析条件

試験溶液中の PPCPs の分析は LC/MS で、スクラロースの分析は LC/MS/MS で行った。

LC/MS の分析条件はつぎのとおりであった。HPLC : 2690 (日本ウォーターズ製)、注入量 : 10~20  $\mu\text{L}$ 、カラム : XTerra MSC18 (2.1 x 150 mm、5  $\mu\text{m}$ 、日本ウォーターズ)、カラム温度 : 40°C、移動相 : 0.1% ギ酸含有 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (5 min 間保持) --- (リニアグラジエント) --- 0.1% ギ酸含有 90%  $\text{CH}_3\text{CN}$  (45 min)、流速 : 0.2 mL/min. MS : ZMD (日本ウォーターズ製)、ソースブロッ

ク温度：120°C、デソルベーション温度：250°C、キャピラリー電圧：3 kV、その他の条件はTable 1を参照。

LC/MS/MSの分析条件のつぎのとおりであった。HPLC：Acquity UPLC（日本ウォーターズ製）、注入量：10 µL、カラム：Acquity UPLC BEH C18（2.1 x 50 mm、1.7 µm、日本ウォーターズ）、カラム温度：40°C、移動相：5mM 酢酸アンモニウム-メタノール

(100:0) - リニアグラジエント (12 min) - 5mM 酢酸アンモニウム-メタノール (0:100) - 3 min 間保持、流速：0.2 mL/min. MS/MS: Xevo TQ MSD (日本ウォーターズ製)、ソースブロック温度：150°C、デソルベーション温度：300°C、キャピラリー電圧：2.5 kV、コーン電圧：30 V、コリジョン電圧：12 eV、プレカーサーイオン→プロダクトイオン：：395→359、および397→361。

#### 1. 5 土壌試料

本実験に使用した土壌（黒ボク土および沖積土）は、平成25年8月に公益財団法人東京都農林水産振興財団 東京都農林総合研究センターから提供を受けた。土壌試料は2 mm メッシュの篩にかけ、水分含量およびPPCPs類の分解試験に用いた。また、室温で2日間乾燥し、風乾細土を調製し、最大容水量、陽イオン交換容量および土壌有機炭素量を調べた（Table 2）。

#### 1. 6 土壌の物理化学的性状

##### 1. 6. 1 水分含量

生土および風乾細土の水分含量は、土壌を105°Cで12時間乾燥させ、乾燥前後の土壌重量から算出した。

##### 1. 6. 2 最大容水量

乾土10 gを円錐形に折りたたんだろ紙にとり、円錐形のガラスロートに入れ、精製水100mLを流し、ロートの下方から流れ出た精製水量を測定することにより求めた。な

お、乾土を入れない場合をブランクとした。

##### 1. 6. 3 陽イオン交換容量 (CEC)

風乾細土5 gを容量80 mLのポリエチレン製の注射型容器（フリッター付）に採り、1 mol/L酢酸アンモニウム100 mLを容器の上部から流した。ついで、80%メタノール50 mLを流し、容器に付着または細土内に残留している酢酸アンモニウムを洗浄した。その後、10%塩化カリウム水溶液を50 mLずつ2回流し、溶出液を得た。溶出液は精製水で100倍に希釈し、イオンクロマトグラフでアンモニアイオンを測定した。イオンクロマトグラフ（ICS3000、ダイオネクス社）の分析条件はつぎのとおり。カラム：CS12A、ガードカラム：CS12G、カラム温度：35°C、溶離液（流速）：0.02 Mメタンサルホン酸（1.0 mL/min）、検出器：電気伝導度、サプレッサー：CSRS300 4 mm。

##### 1. 6. 4 土壌有機炭素量 (OC)

風乾細土を容器に採り、CNコーダー MT-700（ヤナコ分析工業製）で測定した。

##### 1. 7 土壌吸着平衡定数

OECDのTG106に準じて測定した。すなわち、風乾細土約1 gを容量50 mLのガラス製共栓遠沈管に採り、PPCPsの0.01 mol/L塩化カルシウム溶液25 mL（0.1 mg/L～10 mg/L）を加え、室温で24時間振とうした後、3000 rpmで10分間遠心分離し、上清を得た。上清1 mLにギ酸10 µL、内部標準としてカルバマゼピン-d<sub>10</sub>体100 mg/Lアセトン溶液10 µLを加え、LC/MSで測定した。土壌吸着平衡定数(K<sub>d</sub>、cm<sup>3</sup>/g)は次式により求めた。

$$K_d = (\text{土壌吸着量}(\%) \times 25 \text{ mL}) / ((100 - \text{土壌吸着量}(\%)) \times \text{土壌乾燥重量}(g))$$

有機炭素補正土壌吸着平衡定数(K<sub>oc</sub>、cm<sup>3</sup>/g)は次式により求めた。

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\text{土壤有機炭素量 (\%)}}$$

### 1. 8 容器内分解試験

OECDのTG307に準じて行った。すなわち、土壤試料(約10 g)をプラスチック製の容器にとり、水分含量が最大容水量の50%になるように滅菌精製水を加え、暗所、18°Cで1週間プレインキュベーション後、PPCPsを添加し(最終濃度:10 mg/kg乾燥土)、暗所、18°Cでインキュベーションし、経時的にPPCPsの残存量を測定した。また、2週間ごとに滅菌精製水を加えて土壤水分含量を調整した。土壤からのPPCPsの抽出は、アセトニトリル10 mLを加え、超音波装置で30分間処理後、振とう器で30分間抽出した。遠心分離(3000 rpm、10分)後、アセトニトリル層の一部を採り、窒素ガス気流下で乾固後、0.1%ギ酸-アセトニトリル(10:90、v/v)に溶解し、内部標準としてカルバマゼピン-d<sub>10</sub>体100 mg/Lアセトン溶液10 μLを加えたものを試験溶液とした。試験溶液中のPPCPsの分析はLC/MSで行った。

容器内分解試験における土壤中のPPCPsの半減期は1次反応式より求めた。

$$C = C_0 \cdot e^{-\lambda t}$$

$$T_{1/2} = 0.693/\lambda$$

C: t時間後の土壤中PPCPsの濃度

C<sub>0</sub>: 土壤中PPCPsの初期濃度

λ: 定数

T<sub>1/2</sub>: 半減期(日)

### 1. 9 地下水汚染のシミュレーションモデル

農薬の地下水汚染を評価するためのシミュレーションモデルとして、つぎの3モデルを使用することとした。これらモデルは

地下水から検出される農薬を汚染の可能性を判定することができる。

#### 1) Gustafson' s criteria

Ground water ubiquity score (GUS)を次式により求め、各クライテリアと照らし合わせ、地下水汚染性を判定した (Fig. 1)。

$$GUS = \log T_{1/2} \cdot (4 - \log K_{oc})$$

GUS < 1.8 : 地下水汚染性無し

GUS 1.8 - 2.8 : 地下水汚染性疑われる

GUS 2.8 > : 地下水汚染性有り

#### 2) Jury' s criteria

つぎの不等式を満たすものは地下水汚染の可能性ありと判定される。これは地下水汚染を引き起こす可能性の高いフィールド (high risk) のクライテリアである (Fig. 2)。

$$K_{oc} < 5.8 T_{1/2} - 27$$

#### 3) Cohen' s criteria

つぎの条件を満たすものは地下水汚染の可能性ありと判定される (Fig. 3)。

$$K_{oc} < 500 \text{ cm}^3/\text{g} \quad \text{かつ} \quad T_{1/2} > 14 \text{ dyas}$$

上記の各モデルのクライテリア (Fig. 1、2 および 3 の判定基準線) の右下側に位置する PPCPs は地下水汚染の可能性があると判定される。

### C. 結果および考察

#### 1. 多摩地域地下水中の PPCPs の存在実態調査

近年、PPCPs が、米国等の諸外国や東京都23区内の地下水中から数~数十 ng/Lの濃度で検出されることが報告されている。

それら地下水からの PPCPs の検出原因として、米国等の場合には、下水処理水の灌漑用水や余剰汚泥の肥料等としての再利用が、また、東京都 23 区内の場合には、下水道管からの下水漏洩が示唆されている。

東京都多摩地域では、下水道普及率がほぼ 100%と高いことから、区部と同様な原因により、地下水から PPCPs が検出される可能性がある。そこで、今回、東京都多摩地域における地下水中の PPCPs 存在実態を把握するために、多摩地域の下水処理場の流入水中から検出される PPCPs を調査対象とし存在実態調査を実施した。

多摩地域地下水中の PPCPs の調査結果を Table 1 に、地下水の試験溶液の LC/MS クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示す。地下水 187 か所のうち、検出された PPCPs (検出率)はクロタミトン(43%)、DEET(35%)、カンデサルタン(33%)、カルバマゼピン(33%)、アマンタジン(27%)、スルピリド(12%)、アセトアミノフェン(9%)であった。検出最高濃度は、クロタミトンの 119 ng/L で、各 PPCPs の検出濃度の平均値は、3 - 14 ng/L であった。それら検出された PPCPs の検出濃度の最高値は、多摩地域の下水処理場の流入水中 PPCPs の検出濃度の平均値の 2.367~0.004 であった。

近年、スクラロースやアセスルファミカリウム等の人工甘味料が下水漏洩のインジケーターになり得ることが既に報告されており、PPCPs が検出される地下水中のそれら人工甘味料の調査が有望であると思われた。PPCPs の試験溶液の調製法によりスクラロースとアセスルファミカリウムの添加回収率を調べたところ、スクラロースおよびアセスルファミカリウムの添加回収率は、それぞれ 103%および 1.5%であり、スクラロースは PPCPs の試験溶液の調製方法で同時に抽出可能であることがわかった。また、PPCPs 測定用の LC/MS ではスクラロースを

数 ng/L まで分析することが不可能であったことから、LC/MS/MS により高感度分析することとした。

地下水中のスクラロースの検出率は、33%と DEET やカンデサルタンと同程度であった (Table 1)。また、スクラロースが検出された地下水 61 か所のうちの 60 か所からいずれかの PPCPs が検出された (Fig. 5)。スクラロースの検出濃度については、最高濃度が 1295 ng/L、平均濃度が 129 ng/L と、どちらも PPCPs に比べて高かった。また、スクラロースが検出される地下水は多摩地域に点在していた (Fig. 6)。スクラロースが検出された地下水について、地下水中のスクラロースの濃度を下水中スクラロース濃度で除して漏洩下水の混入の割合を求めた場合、その割合が最も高かった地下水は 0.96 であり、ほぼ全量が漏洩下水によるものと推察される地下水も存在したが、地下水への漏洩下水の混入割合は約 10%と試算された。

以上の結果より、多摩地域の地下水から PPCPs が ng/L レベルで検出され、その主原因は下水漏洩であることが示唆された。今後 PPCPs の環境影響評価をする上で、都市域においては広域の下水道の普及率が高いことから、下水道管からの下水漏洩による地下水へ影響についても考慮する必要があると考えられる。

## 2. PPCPs の地下水汚染性の評価

東京都多摩地域地下水中の PPCPs の存在実態調査結果より、流入下水(生水)中から検出される PPCPs が全て地下水から検出されるわけではなかった (Table 1)。下水が漏洩した場合の他に、飲み残しや期限切れの PPCPs が土壌に捨てられた場合、どのような PPCPs が地下水汚染を引き起こすのかを評価する必要があると考えられる。そこで、平成 23 年度に引き続き、欧米で既

に利用されている農薬の地下水汚染の可能性を予測するためのシミュレーションモデルを用いて、PPCPsの地下水汚染性を評価することとした。

今年度は、多摩地域の地下水から検出される PPCPs (アマンタジン、カルバマゼピン、カンデサルタン、クロタミトン) および人工甘味料のスクラロースを対象とした。多摩地域で代表とされる2種類の土壌、黒ボク土と沖積土を用いて PPCPs 等の土壌吸着平衡定数 (Koc) を調べた (Table 3)。アマンタジンおよびカンデサルタンの Koc は黒ボク土、沖積土ともに他の PPCPs に比べて高く、カルバマゼピンおよびクロタミトンの Koc は 22-57 cm<sup>3</sup>/g であった。また、スクラロースの Koc は黒ボク土、沖積土ともに 3 cm<sup>3</sup>/g と、PPCPs に比べると小さく、土壌への吸着は少ないことがわかった。一方、土壌中の半減期については、カンデサルタンの 13.1-20.0 日を除き、32 日よりも大きかった。

各シミュレーションモデルによる判定結果を Table 3 に示す。アマンタジンは Jury のモデルで、沖積土において non-leacher と判定されたが、これは正確な半減期が求められなかったことによるものと考えられ、その他のモデルでは、leacher と判定された。カルバマゼピンおよびクロタミトンは、いずれのモデルにおいても leacher と判定された。カンデサルタンの場合には、non-leacher と判定される場合が多かった。下水漏洩の指標であるスクラロースは、いずれのモデルにおいても leacher と判定された。また、平成 23 年度に実施した PPCPs の地下水汚染の可能性評価の結果において、対象とした PPCPs は、クラリスロマイシンを除き全て non-leacher と判定された。これらの PPCPs は地下水中からは検出されおらず、存在実態調査の結果と良く一致し

た (Table3)。

以上の結果から、今回対象とした PPCPs の地下水汚染性の判定結果は、カンデサルタンを除き、地下水中の存在実態調査結果と良く一致したことから、これらのシミュレーションモデルは、PPCPs の地下水汚染の可能性を評価する上で、有用なモデルであると考えられる。

#### D. 健康危機情報

なし

#### E. 成果発表

##### 1. 論文発表

Suzuki T., Kosugi Y., Hosaka M., Nakae D., Nishimura T; Occurrence and behavior of the chiral anti-inflammatory drug naproxen in an aquatic environment. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 33, No. 12, pp. 2671-2678, 2014.

##### 2. 学会発表

Suzuki T., Kosugi Y., Hosaka M., Nakae D., Nishimura T. : Environmental risk assessment of selected human pharmaceuticals in urban river water in Tokyo, SETAC North America, 35th Annual Meeting, Vancouver (2014. 11).

鈴木俊也, 小杉有希, 保坂三継, 中江 大, 西村哲治; 地下水汚染のシミュレーションモデルによる PPCPs の地下水への浸透性の評価, 第 23 回環境化学討論会、京都 (2014. 5)

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

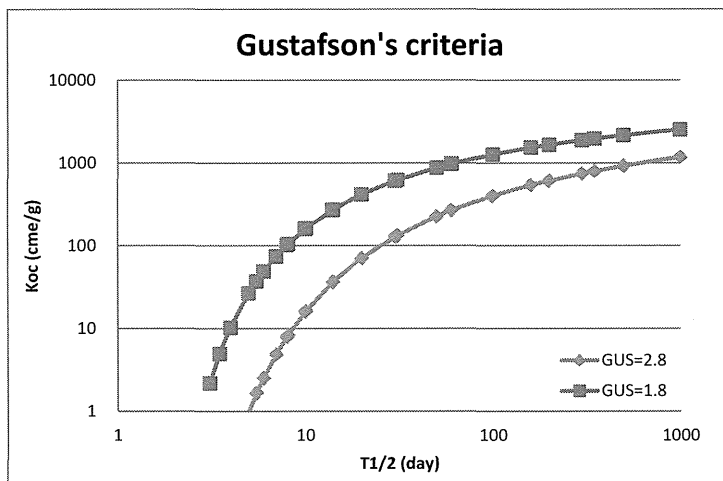


Fig.1 Simulation Model of Gustafson.

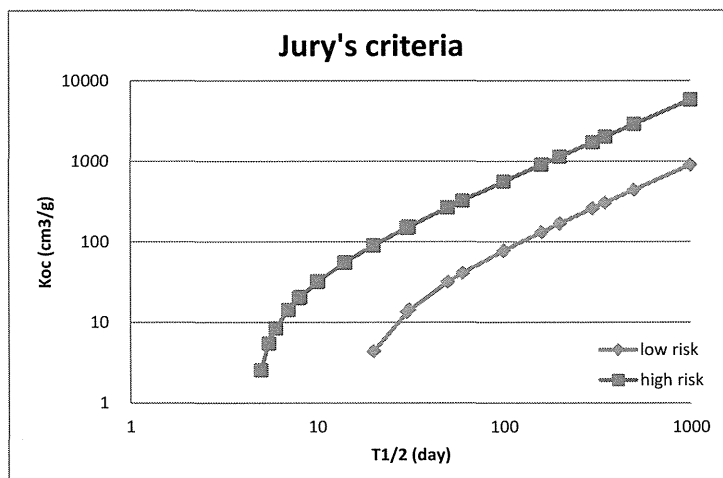


Fig.2 Simulation Model of Jury.

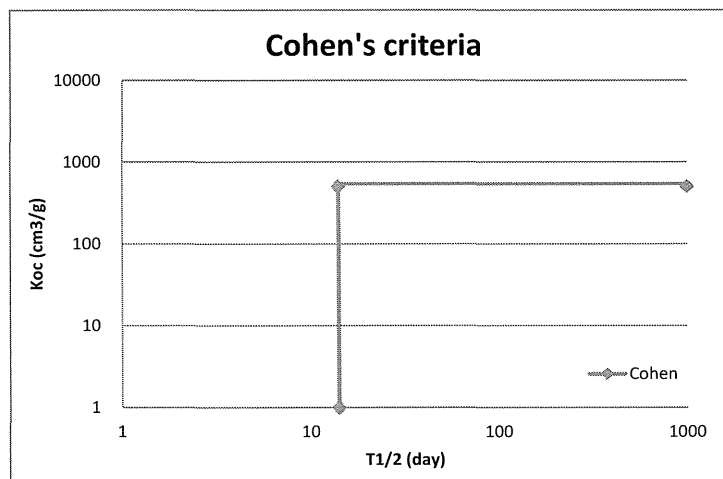


Fig.3 Simulation Model of Cohen.

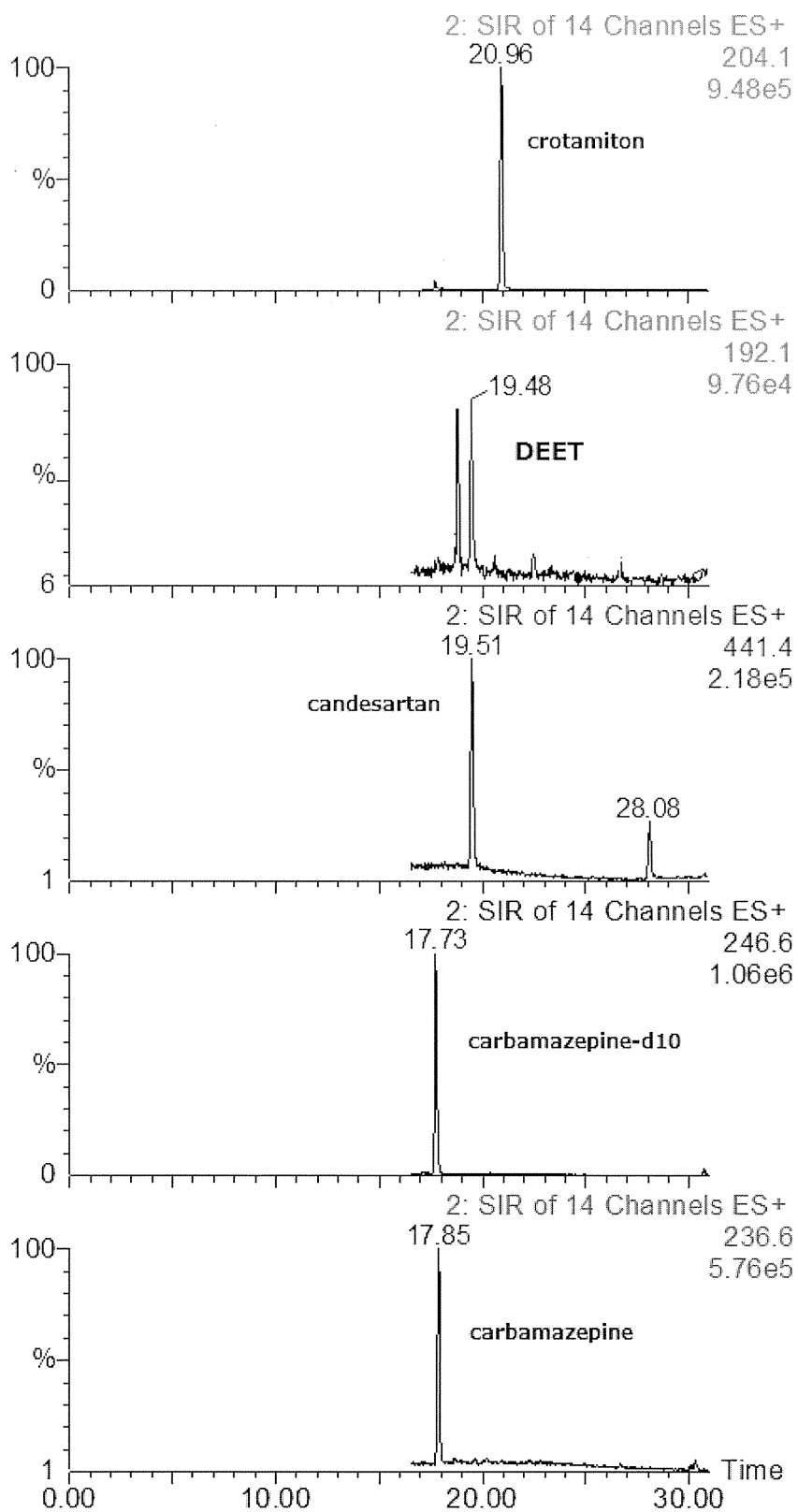


Fig. 4 LC/MS-SIM chromatogram of the extract of groundwater in Tama district in Tokyo



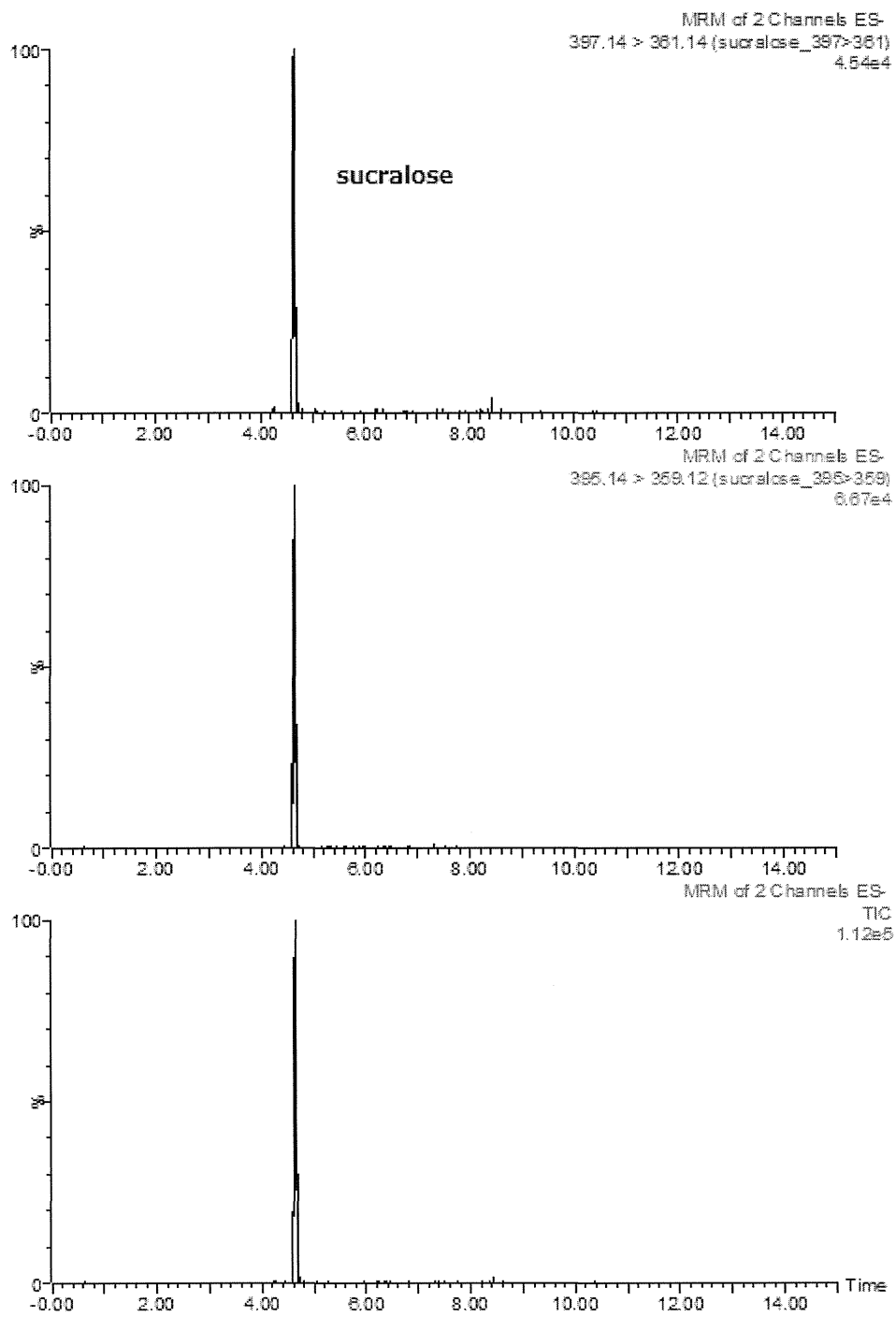


Fig. 5 LC/MS/MS chromatogram of the extract of groundwater in Tama district in Tokyo

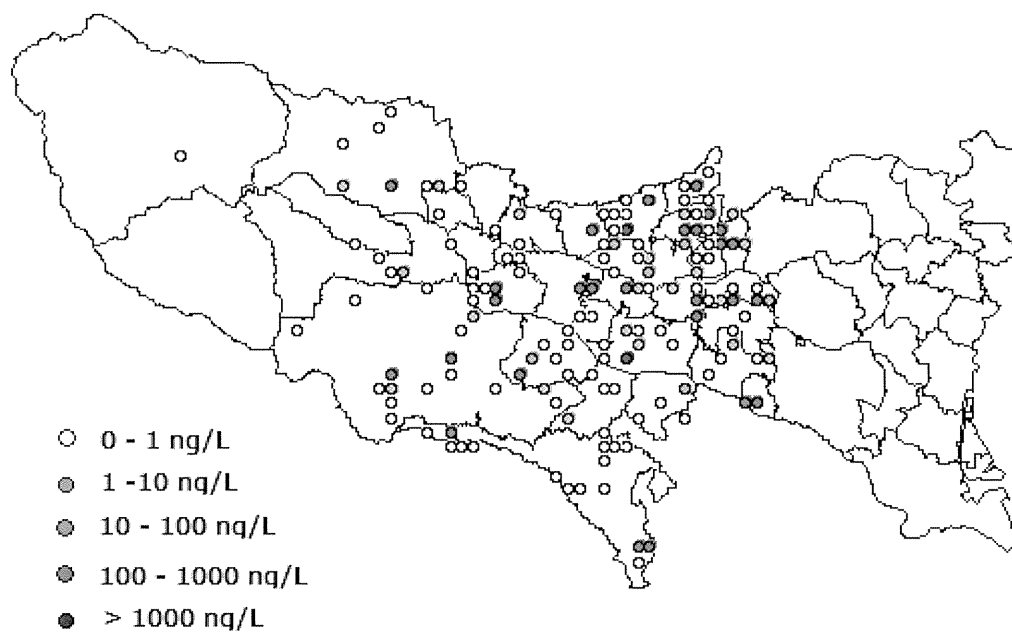


Fig.6 Distribution of sucralose in groundwater at Tama District in Tokyo.

	Andosol	alluvial soil
Water content (%)	29	24
Maximum water holding capacity	1.0	0.8
Cation exchange capacity (meq/100 g)	50.6	23.8
Organic carbon (%)	5.6	2.9

Table 1. LC/MS conditions, method detection limits (MDL), and monitoring results in groundwater at the Tama district in Tokyo.

No PPCPs	MS				Groundwater *				STP		Ratio Groundwater Max/ STP
	ESI mode	Cone Volt (V)	Monitor Ion (m/z)	MDL (ng/L)	Frequency of Detection (n=187)	Conc. (ng/L)			Ave. Conc. of influent of STP ** (ng/L)	Conc. of effluent of STP *** (ng/L)	
						Min	Max	Average			
1 sulpiride	Posi	50	342	2	22	2	6	3	1390	5	0.004
2 acetoaminophen	Posi	30	152	5	17	5	32	13	3980	44	0.008
3 amantadine	Posi	30	152	1	50	1	33	3	260	421	0.127
4 epinastine	Posi	50	250	1	0	ND	ND	-	160	826	
5 diphenhydramine	Posi	50	167	1	0	ND	ND	-	1530	1134	
6 clarithromicine	Posi	50	748	5	0	ND	ND	-	-	912	
7 carbamazepine	Posi	30	237	1	62	1	58	6	260	87	0.223
8 losartan	Posi	30	423	3	0	ND	ND	-	150	103	
9 rolapepam	Posi	30	321	5	0	ND	ND	-	40	22	
10 candesartan	Posi	30	441	1	61	1	84	7	210	105	0.400
11 DEET	Posi	30	192	1	65	1	71	4	-	30	2.367
12 crotamiton	Posi	30	204	1	80	1	119	11	-	870	0.137
13 diclofenac	Posi	30	296	10	0	ND	ND	-	150	70	
14 nateglinide	Posi	30	318	5	0	ND	ND	-	260	3	
15 mefenamic acid	Posi	20	224	3	0	ND	ND	-	620	12	
16 fenofibrate	Posi	30	361	5	0	ND	ND	-	110	ND	
17 ibuprophen	Nega	20	205	10	0	ND	ND	-	560	ND	
18 triclocarban	Nega	10	313	10	0	ND	ND	-	-	ND	
19 triclosan	Nega	10	287	10	0	ND	ND	-	-	ND	
20 sucralose	Nega	30	397-361 395-359	2	61	2	1295	129	-	1349	0.960
21 carbamazepine-d10	Posi	30	247	-	-	-	-	-	-	-	

\* Sampling period from May 2010 to Jan. 2011 and from Sep. 2013 to Dec. 2013.

\*\* Sampling period from Apr. 2004 to Mar. 2005; inflow of STPs: n=36.

\*\*\* Sampling period from Oct. 2013 to Jan. 2014; inflow of STPs: n=12.

Table3 Evaluation of Leachability of PPCPs by the simulation models.

PPCPs	Koc		T <sub>1/2</sub>		Gustafson's criteria *				Jury' criteria **				Cohen's criteria		Monitoring result in field***
	(cm <sup>3</sup> /g)		(day)		Jugement				Jugement				Jugement		
	Andosol	alluvial soil	Andosol	alluvial soil	Andosol	alluvial soil	Andosol	alluvial soil	Andosol	alluvial soil	Andosol	alluvial soil	Andosol	alluvial soil	
clarithromycin	867	847	>56	>56	1.9	1.9	ML	ML	298	298	Nl	NL	NL	NL	ND
diclofenac	449	847	1.0	0.6	0.0	-0.2	NL	NL	-21	-24	NL	NL	NL	NL	ND
ibuprofen	382	481	11.0	13.6	1.5	1.5	NL	NL	37	52	NL	NL	NL	NL	ND
mefenamic acid	456	827	1.0	2.1	0.0	0.3	NL	NL	-21	-15	NL	NL	NL	NL	ND
triclocarban	24039	14340	>56	>56	-0.7	-0.3	NL	NL	298	298	NL	NL	NL	NL	ND
amantadine	116	403	>32	>32	2.9	2.1	L	ML	159	159	L	NL	L	L	D
sucralose	3	3	>32	>32	5.3	5.3	L	L	159	159	L	L	L	L	D
carbamazepine	48	54	>32	>32	3.5	3.4	L	L	159	159	L	L	L	L	D
cadexartan	358	414	13.1	20.0	1.6	1.8	NL	ML	49	89	NL	NL	NL	L	D
crotamiton	22	57	>32	>32	4.0	3.4	L	L	159	159	L	L	L	L	D

NL:non-leacher, L: leacher, ML: marginal-leacher

\* Gustafson's criteria:  $(4 - \log Koc) * \log T_{1/2}$

\*\* Jury' criteria :  $5.8 * T_{1/2} - 27$

\*\*\* ND: not detected, D: detected

「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 鏑迫 典久

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数物質による影響を検証するために、モードオブアクションが異なる医薬品を混合ばく露し、ミジンコにどのような影響を与えるのか検討を行った。また、医薬品の野生生物に対する後遺症については調べられた例がほとんどない。医薬品が環境中に必ずしも連続的に一定濃度で排出されるとは限らず、断続的に排出された場合は、連続ばく露で得られた NOEC、LOEC では過大に評価している可能性がある。そこである濃度でばく露された生物を無薬剤の系に移し、回復の有無を調べる試験(回復試験)を実施し、回復可能な最大濃度 (Returnable Point, RP) と回復不可能な最小濃度(No Returnable Point, NRP)が、従来の NOEC、LOEC に変わる指標として使用できるかどうか検討を行った。

ケトコナゾールとロバスタチンの混合ばく露ではそれぞれの個別ばく露よりも産仔数の増加が確認された。また Isoblogram curve のグラフから相殺作用の影響があることが示された。医薬品 6 物質について行った回復試験では、ばく露された個体は、ばく露をやめることによって対照区と同程度に回復する濃度区としない濃度区が確認された。

テーマ 1:複合ばく露

A. 研究目的

平成 25 年度までの検討から多摩川から検出された医薬品を 3 種の短期慢性影響試験を用いて評価したところ、環境中濃度よりも高い濃度で影響が認められている。よって単独ばく露での生態影響は低いことが予想されるが、環境中では複数の薬剤が同時に存在していることを考慮し、複合ばく露による慢性影響を確認する必要があると考えられる。昨年度は現実の環境汚染実態を考慮して、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、そのカクテルについて短期慢性影響試験を行った。その結果、

ミジンコでは 1 種類の物質が支配的に影響していたため、単独ばく露と変わらない結果となった。平成 26 年度は、複数物質による影響を検証するために、モードオブアクションが異なる医薬品を複合ばく露し、ミジンコにどのような影響を与えるのか検討を行う。また薬物動態学的相互作用や薬力学的相互作用による相加・相乗・相殺作用の可能性についても検討する。

B. 研究方法

1. 対象医薬品

複合ばく露に使用する医薬品の選定には、

人体に対して禁忌とされている組み合わせを参考にした。今回は相互作用(副作用)が確認されているケトコナゾール (アゾール系抗真菌薬) とロバスタチン(HMG-CoA 還元酵素阻害薬) を選択した。

ケトコナゾールはチトクローム P4503A4 の阻害剤であり、3A4 はヒトの肝臓に多くに含まれる P450 である。真菌症の治療薬として使用されている。

ロバスタチンは、HMG-CoA 還元酵素阻害薬でありコレステロール生合成系の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素を阻害することにより、細胞内コレステロールプールの減少、細胞膜上 LDL レセプター数の増加が起り、血中 LDL-コレステロールレベルを低下させる作用がある。これらを同時に服用すると、血中の薬物濃度が最大 20 倍以上上昇する。そのため、これらの併用は禁忌とされている。構造式等を表 1(報告書末に記載)に示す。甲殻類の脱皮ホルモンもコレステロールから合成されており、ミジンコにおいても何らかの効果を示すことが期待される。

## 2. 短期慢性毒性試験概要

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慢性毒性試験 “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(ただし、繰り返しを n=8 で実施)。試験条件の概要を表 2 に試験手順を図 1B-1(報告書末に記載)に示した。

## 3. 試験濃度設定

個別の医薬品の短期慢性毒性試験を行い半数影響濃度(Median Effect Concentration, EC50), 最大無影響濃度(No observed effect concentration, NOEC), 最低影響濃度(Lowest

表 2. 短期慢性毒性試験条件

供試生物	ニセネコゼミジンコ ( <i>Ceriodaphnia dubia</i> )
供試験生物齢	生後 24 時間以内
ばく露方法	半止水式
水温	25±1°C
pH	6.5~8.5
溶存酸素	飽和の 60%以上
明暗周期	明期 16 時間、暗期 8 時間

observed effect concentration, LOEC)を算出した。ロバスタチン(LVS)、ケトコナゾール(KET)それぞれの EC50 を考慮し、複合ばく露試験の濃度を設定した。

個別試験の濃度設定は対照区、溶媒対照区、ロバスタチン 3 濃度区(50 µg/L, 100 µg/L, 200 µg/L)、ケトコナゾール個別試験 3 濃度(100 µg/L, 200 µg/L, 400 µg/L)とした。複合試験は表 3 に示す濃度設定で実施した。

表 3. 複合試験濃度設定

KET+LVS (µg/L)		
A	400	400
	200	200
	100	100
	50	50
B	400	100
	200	50
	100	25
	50	12.5
C	400	25
	200	12.5
	100	6.25
	50	3.125
D	50	50
	50	12.5
	50	3.125
E	100	100
	100	25
	100	6.25
F	200	200
	200	50
	200	12.5
G	400	400
	400	100
	400	25

### C. 研究結果

#### 個別医薬品試験と複合試験結果

ケトコナゾール、ロバスタチンの個別試験結果を図 1C-1, 1C-2, EC50 を表 4 に示す。ケトコナゾールは NOEC : 200  $\mu\text{g/L}$  , LOEC : 400  $\mu\text{g/L}$  , EC50 : 363  $\mu\text{g/L}$  であった。ロバスタチンは NOEC : 50  $\mu\text{g/L}$  , LOEC : 100  $\mu\text{g/L}$  , EC50 : 88  $\mu\text{g/L}$  であった。

複合試験の A 液の結果を図 1C-3, B 液の結果を 1C-4, C 液の結果を 1C-5 に EC50 を表 4 に示す。図 1C-5 から分かるように、最高濃度区で KET の影響がある濃度にも関わらず、LVS が添加されることによって影響の低減が確認された。

また、A, B, C 液の KET 濃度は同じに設定しているため、ケトコナゾールの濃度を固定した場合の試験と同等の結果を得られた。ケトコナゾールの濃度を固定した結果を D, E, F, G とし図 1C-6, 1C-7, 1C-8, 1C-9 に、それぞれの EC50 を表 4 に示した。

図 1C-10, 図 1C-11, 図 1C-12 に CA・IA モデル結果を示した。図 1C-10 では複合試験結果が LVS 側に、図 1C-11 では KET 側によっていた。図 1C-12 では LVS の濃度が低かった為、数値が外挿値となったが、参考に載せておく。

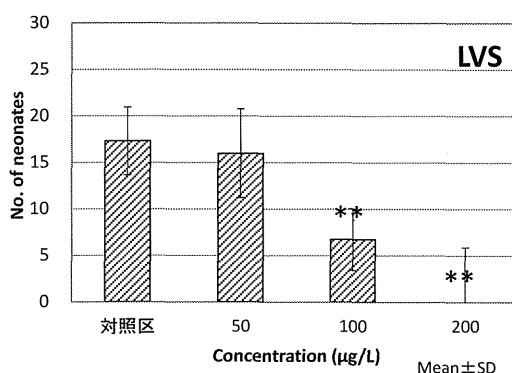


図 1C-2. LVS の試験結果

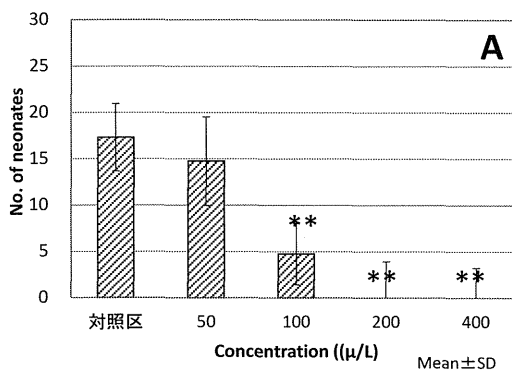


図 1C-3. 複合試験 A 液の試験結果

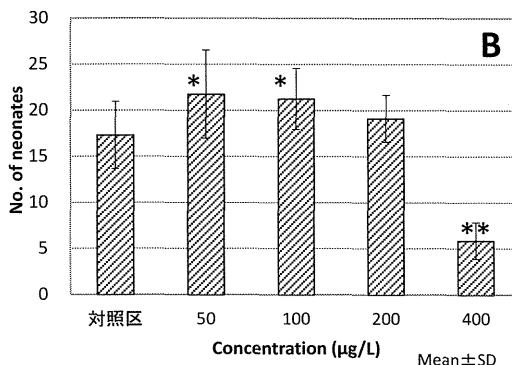


図 1C-4. 複合試験 B 液の試験結果

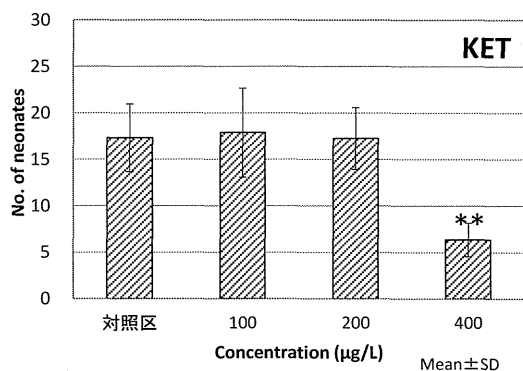


図 1C-1. KET の個別試験結果

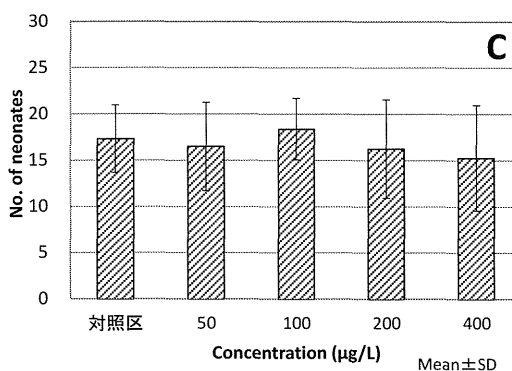


図 1C-5. 複合試験 C 液の試験結果

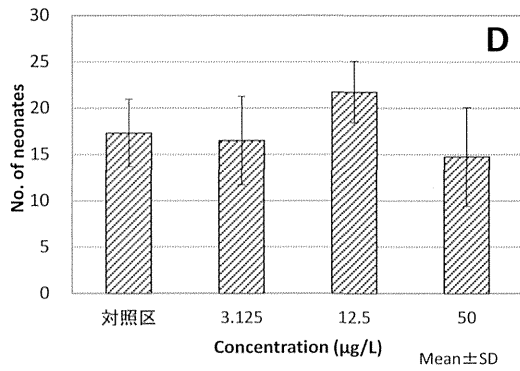


図 1C-6. 複合試験 D 液の試験結果

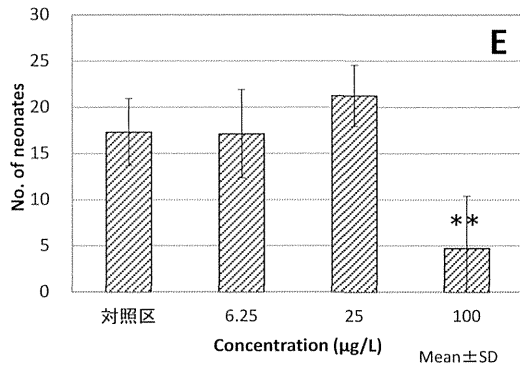


図 1C-7. 複合試験 E 液の試験結果

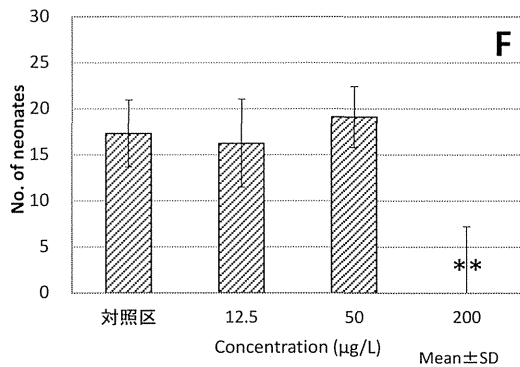


図 1C-8. 複合試験 F 液の試験結果

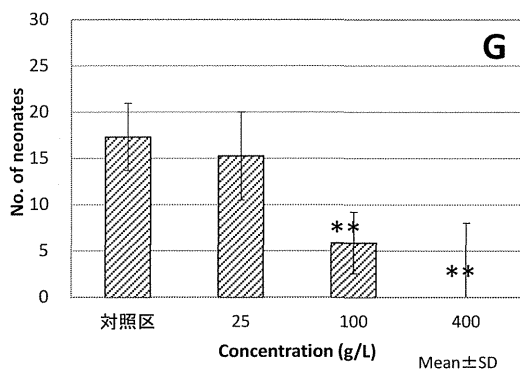


図 1C-9. 複合試験 G 液の試験結果

表 4. 各設定濃度区の EC50

	KET	LVS
KET	360	0
LVS	0	88
A	79	79
B	370	110
C	18000	1100
D	50	3200
E	100	75
F	200	85
G	400	68

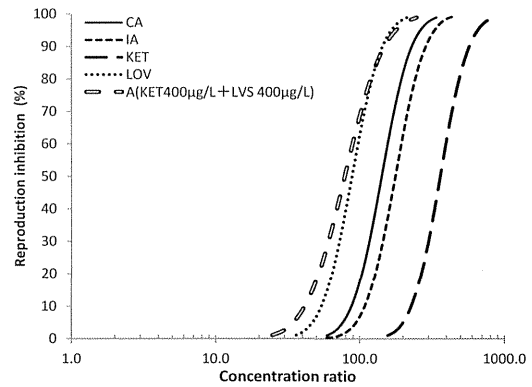


図 1C-10. A 液の Dose response curve

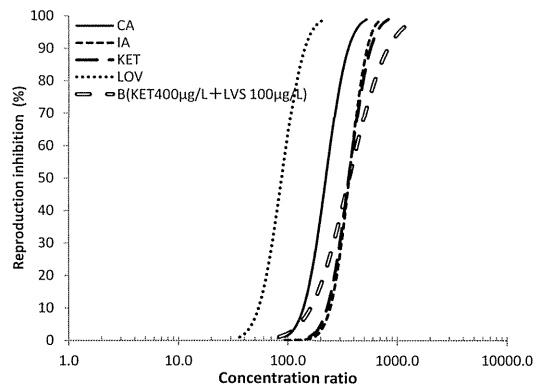


図 1C-11. B 液の Dose response curve

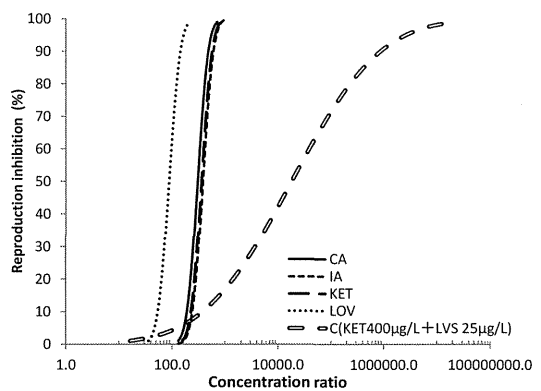


図 1C-12. C 液の Dose response curve



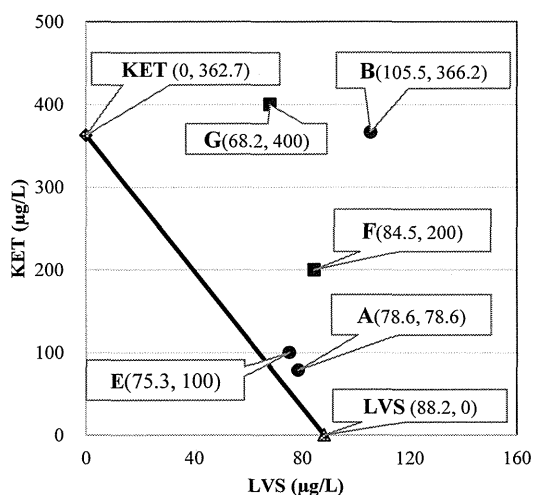


図 1C-13. Isobologram of KET and LVS

#### D. 考察

KET のみの単独ばく露と KET と LVS の複合ばく露の結果から、LVS を添加することによる産仔数の増加が確認された。このことから MOA の異なる医薬品の組み合わせによる相殺の影響が考えられた。そこでそれぞれの医薬品の EC50 を縦横軸にし、混合した医薬品の EC50 をプロットした Isobologram curve を図 1C-13 に示した。この図から相殺傾向が示された（表 4 より EC50 が外挿値となった結果は記載していない）。CA・IA モデルを用いた Dose response curve の図から LVS の濃度が高いと LVS のみの影響が強くなって、濃度が低いと KET と相殺するため影響が弱くなることが考えられた。

### テーマ 2:回復試験

#### A. 研究目的

医薬品の野生生物に対する後遺症については調べられた例がほとんどない。医薬品が環境中に必ずしも連続的に一定濃度で排出されるとは限らず、断続的に排出された場合は、連続ばく露で得られた NOEC、LOEC では過大に評価している可能性がある

る。そこである濃度でばく露された生物を無薬剤の系に移し、回復の有無を調べる試験(回復試験)を実施し、回復可能な最大濃度 (Returnable Point, RP) と回復不可能な最小濃度(No Returnable Point, NRP)が、従来の NOEC、LOEC に変わる指標として使用できるかどうか検討を行った。

今回は医薬品に対して比較的鋭敏に影響が観察できるミジンコ繁殖阻害試験を改良し、産仔数をエンドポイントとした時の回復する濃度(RP)と回復しない濃度(NRP)を求め、この RP をリスク評価に使用することが可能か検討する。

#### B. 研究方法

##### 1. 対象医薬品

平成 25 年度研究報告書で多摩川流域において検出された物質である 6 物質(ジフェンヒドラミン塩酸塩(DHH)、アセトアミノフェン(ACT)、ケトプロフェン(KEP)、フェニトイン(PHT)、エトドラク(EDC)、エピナスチン塩酸塩(ETP)について試験を行った。構造式等を表 1 に示した。

##### 2. 回復試験概要

まずテーマ 1 と同じ短期慢性毒性試験を行った。(繰り返し数を n=10 で実施)。この試験が試験成立条件を満たした場合、試験に使用した *C.dubia* の親個体をそのまま飼育水に移して産仔数を数えた(図 2B-2 報告書末に記載)。この行程を回復試験とした。

また、以下のように回復を定義した。まず回復期間中に対照区のみジンコの産仔数が最大になった時の産仔数を求め、ばく露歴がある試験区がその産仔数以上になった場合回復したと判断し、その日を回復日とした。

対照区で産仔数が最大になるのはおおよそ 7-10 日齢であり、11 日齢以降は産仔数は減少していた。このことから、試験開始後 7-10 日間における 2 日間の平均産仔数を

算出したところ、平均産仔数が8±1.1頭であった。この結果から、回復期間における2日間の平均産仔数が7頭以上であった日を回復したとし、回復日を算出した

### 3. 試験濃度設定

平成 25 年度研究報告書の繁殖試験結果を参考にし、各医薬品の最高濃度を決めた。公比は2とし対照区+5濃度区の計6濃度区とした。

## C. 研究結果

### 1. 繁殖試験結果

各医薬品の試験結果を図 2C-1～2C-6 に示した。表 5 に NOEC, LOEC, EC50 をまとめた。DHH は 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L で産仔に有意差があり、4 mg/L では全供試個体が死亡した。ACT は 5 mg/L, 10 mg/L で有意差が確認された。KTP は 6.25 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L で有意差があり、50 mg/L で全個体が死亡した。PHT は 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L で有意差が確認された。EDC は 15 mg/L, 30 mg/L, 60 mg/L で有意差が確認された。EPT は 10 mg/L で有意差が確認された。

どの結果も統計的有意差がついた濃度区があることから回復試験を行った。DHH と KTP の最高濃度で\*がついている濃度区は、供試個体は生存しているが産仔が無かったことを示している。

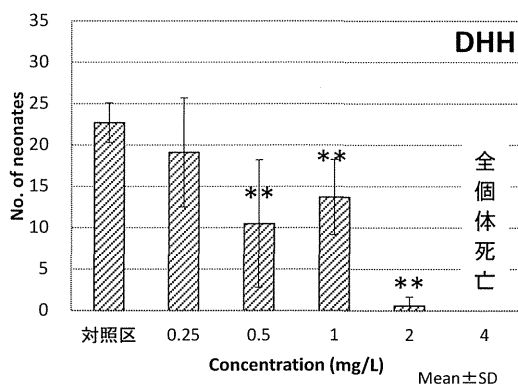


図 2C-1-1. DHH の繁殖試験結果

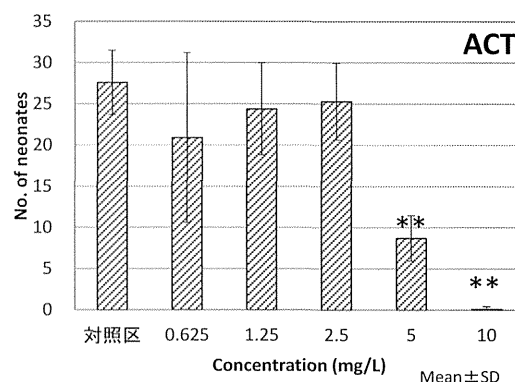


図 2C-2. ACT の繁殖試験結果

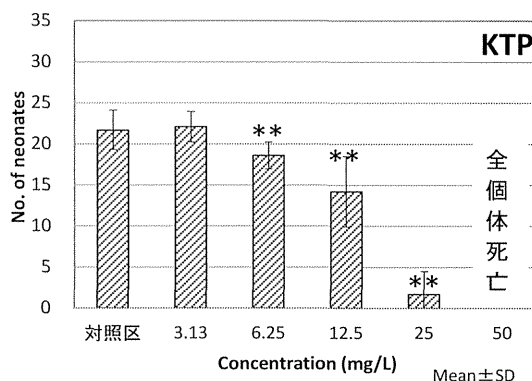


図 2C-3. KTP の繁殖試験結果

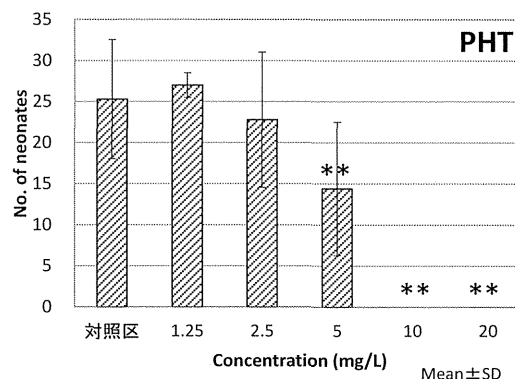


図 2C-4. PHT の繁殖試験結果

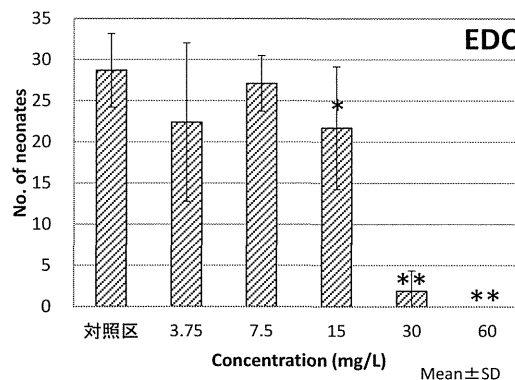


図 2C-5. EDC の繁殖試験結果

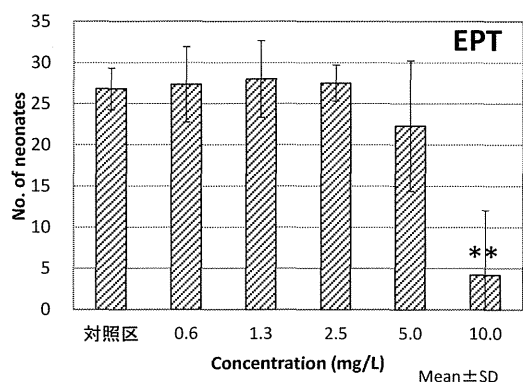


図 2C-6. EPT の繁殖試験結果

表 5. 6物質の NOEC, LOEC, EC50 値 (mg/L)

物質名	NOEC	LOEC	EC50
DHH	0.25	0.5	0.65
ACT	2.5	5.0	3.4
KTP	3.1	6.3	13
PHT	2.5	5.0	4.9
EDC	7.5	15	16
EPT	5.0	10	7.9

## 2. 回復試験結果

回復試験の結果を図 2C-7～図 2C-12 に示す。2 日間の平均産仔数が 7 頭以上であった日を網掛けで示した。DHH は 0.5 mg/L, 1 mg/L とともに 9-10 日で 2 日間の平均産仔数を上回ったことから、9 日目(回復期間開始 3 日目)に回復した。2 mg/L では 11 日目(回復期間開始 5 日目)に回復した。ACT は 5 mg/L, 10 mg/L で 8 日目(回復期間 2 日目)に回復した。KTP は 25 mg/L で 7 日目(回復期間開始 1 日目)に回復し、6.25 mg/L, 12.5 mg/L で 9 日目(回復期間 3 日目)に回復し、高濃度の方が低濃度より回復が早かった。PHT は 5 mg/L で 7 日目(回復期間開始 1 日目)に回復し、10 mg/L, 20 mg/L では 2 日間の平均産仔数が 7 頭を超えず、回復しなかった。EDC は 15 mg/L で 7 日目(回復期間開始 1 日目)に回復し、30 mg/L, 60 mg/L で 9 日目(回復期間開始 3 日目)に回復した。EPT は 10 mg/L で 7 日目(回復期間開始 1 日目)に回復した。

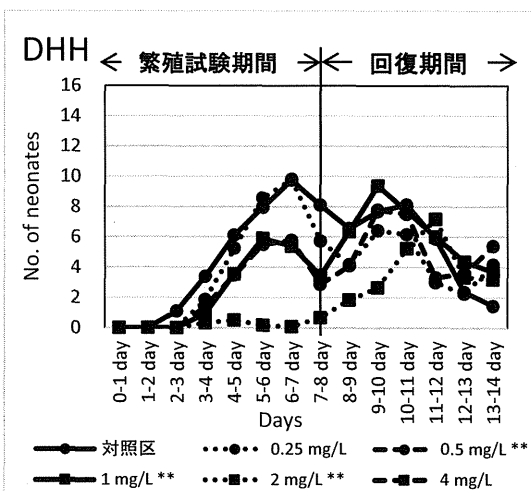
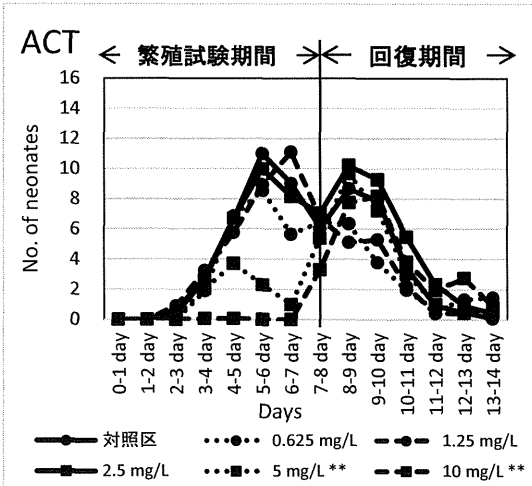


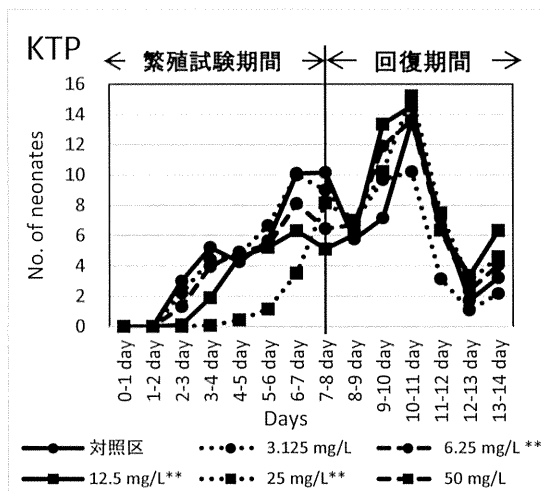
図 2C-7. DHH の繁殖試験と回復試験結果



2日間の移動平均産仔数(ACT)

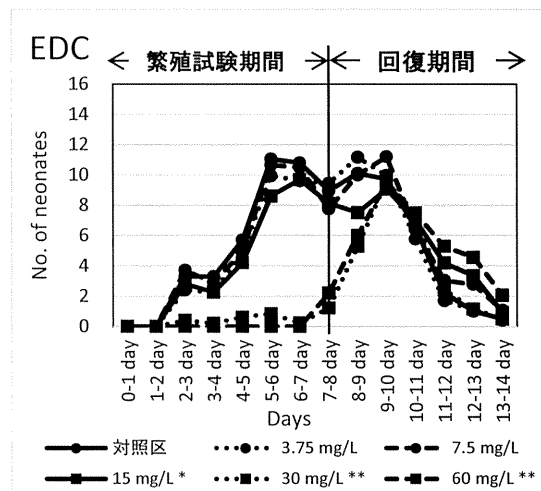
濃度	対照区	0.625 mg/L	1.25 mg/L	2.5 mg/L	5 mg/L**	10 mg/L**
0-1 day	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1-2 day	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-3 day	0.6	0.0	0.9	0.4	0.2	0.0
3-4 day	2.8	1.9	3.3	2.7	2.1	0.1
4-5 day	6.7	6.9	5.8	6.7	3.7	0.1
5-6 day	11.0	8.6	9.0	10.0	2.3	0.0
6-7 day	9.0	5.7	11.1	8.2	1.0	0.0
7-8 day	6.1	6.5	6.7	7.1	5.4	3.3
8-9 day	8.7	6.3	5.1	10.2	9.7	7.8
9-10 day	7.9	3.8	5.3	9.3	7.2	8.2
10-11 day	3.4	1.9	2.2	5.5	3.1	3.8
11-12 day	0.9	0.6	0.4	2.3	1.0	1.9
12-13 day	0.5	1.3	0.4	0.9	0.4	2.8
13-14 day	0.1	1.5	0.7	0.4	0.4	0.9

図 2C-8. ACT の繁殖試験と回復試験結果



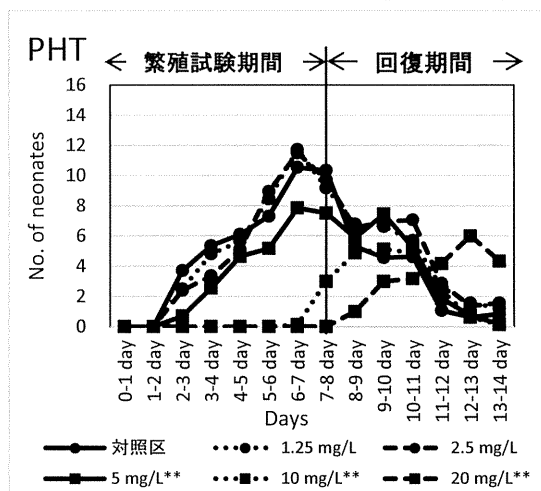
濃度	対照区	3.125 mg/L	6.25 mg/L**	12.5 mg/L**	25 mg/L**	50 mg/L
0-1 day	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1-2 day	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-3 day	3.0	2.2	1.3	0.1	0.0	死亡
3-4 day	5.2	4.4	4.0	1.9	0.1	
4-5 day	4.3	4.8	4.9	4.6	0.4	
5-6 day	5.7	6.7	5.4	5.2	1.1	
6-7 day	10.1	10.0	8.1	6.3	3.5	
7-8 day	10.2	9.0	6.5	5.1	8.1	
8-9 day	5.8	6.8	6.7	6.1	7.0	
9-10 day	7.2	9.7	11.9	13.4	10.2	
10-11 day	13.6	10.2	13.6	14.6	15.2	
11-12 day	7.1	3.1	6.4	6.4	7.5	
12-13 day	1.7	1.1	2.4	3.4	3.0	
13-14 day	3.2	2.2	4.1	6.3	4.6	

図 2C-9. KTP の繁殖試験と回復試験結果



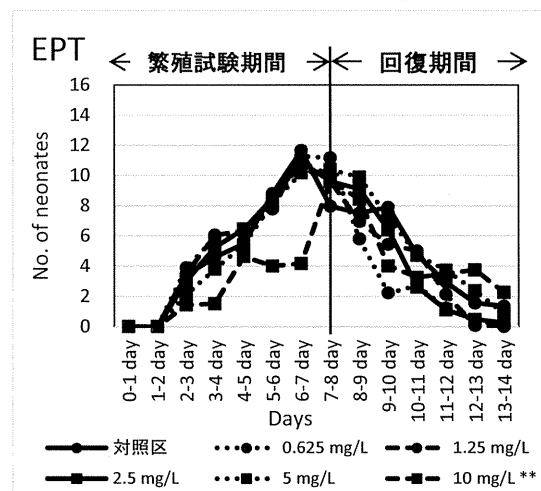
濃度	対照区	3.75 mg/L	7.5 mg/L	15 mg/L*	30 mg/L**	60 mg/L**
0-1 day	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1-2 day	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-3 day	3.3	2.4	3.7	2.8	0.4	0.0
3-4 day	3.3	2.3	2.9	2.3	0.2	0.0
4-5 day	5.7	4.9	5.0	4.2	0.6	0.0
5-6 day	11.1	9.9	10.7	8.6	0.8	0.0
6-7 day	10.8	9.6	10.5	9.7	0.2	0.0
7-8 day	9.0	9.4	7.8	8.1	1.2	2.2
8-9 day	10.1	11.2	10.0	7.5	5.3	6.0
9-10 day	9.7	10.0	11.2	9.1	9.6	9.5
10-11 day	6.5	5.8	6.4	7.0	7.2	7.5
11-12 day	2.2	1.7	3.0	4.2	2.4	5.3
12-13 day	1.0	1.1	2.8	3.3	1.1	4.6
13-14 day	0.5	0.4	1.1	0.9	0.5	2.1

図 2C-11. EDC の繁殖試験と回復試験結果



濃度	対照区	1.25 mg/L	2.5 mg/L	5 mg/L**	10 mg/L**	20 mg/L**
0-1 day	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1-2 day	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-3 day	3.7	2.5	2.4	0.7	0.0	0.0
3-4 day	5.4	4.8	3.4	2.6	0.0	0.0
4-5 day	6.1	5.7	5.1	4.6	0.0	0.0
5-6 day	7.3	8.4	8.9	5.2	0.0	0.0
6-7 day	10.5	11.7	11.5	7.8	0.1	0.0
7-8 day	10.3	9.2	9.7	7.5	3.0	0.0
8-9 day	5.3	6.8	6.5	5.9	4.9	1.0
9-10 day	4.6	6.6	6.9	7.4	5.1	3.0
10-11 day	4.6	5.7	7.1	5.2	4.9	3.2
11-12 day	1.1	2.6	2.9	1.9	2.4	4.2
12-13 day	0.6	1.6	1.4	0.7	0.6	6.0
13-14 day	0.8	1.2	1.6	0.2	0.1	4.3

図 2C-10. PHT の繁殖試験と回復試験結果



濃度	対照区	0.625 mg/L	1.25 mg/L	2.5 mg/L	5 mg/L	10 mg/L**
0-1 day	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1-2 day	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2-3 day	3.4	3.9	3.5	3.0	2.1	1.4
3-4 day	4.6	5.9	6.1	5.3	3.8	1.5
4-5 day	5.5	6.2	6.4	6.5	5.4	4.6
5-6 day	8.8	7.8	8.0	8.5	8.2	4.0
6-7 day	11.7	11.3	11.1	10.9	10.2	4.2
7-8 day	8.0	11.2	9.6	9.6	10.4	9.7
8-9 day	7.5	5.8	6.9	9.1	9.9	8.4
9-10 day	7.9	2.2	5.4	6.4	7.2	4.0
10-11 day	4.7	2.7	5.0	2.6	4.7	3.3
11-12 day	2.9	1.2	2.1	1.1	3.7	3.5
12-13 day	1.6	0.4	0.1	0.5	2.4	3.8
13-14 day	1.3	0.1	0.0	0.3	0.8	2.3

図 2C-12. EPT の繁殖試験と回復試験結果