

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ヒト用医薬品の環境影響評価のための環境影響試験の実施と構造活性相関手法を用いた予測システムの開発に関する研究

(英語) Research on the development of environmental risk assessment methods for human pharmaceuticals by quantitative structure activity relationship approach and conducting the ecotoxicity tests.

研究開発実施期間: 平成31年4月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 広瀬明彦
(英語) Akihiko Hirose

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部・部長
(英語) National Institute of Health Sciences, Division of Risk Assessment, Director

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

(1) ヒト用医薬品の環境モニタリングおよび環境動態予測手法の構築

ヒト用医薬品の環境影響を評価するためには、環境動態予測手法の構築が必要である。そこで我々は国内において処方量が多い医薬品を中心に水環境中の存在実態を把握するための全国モニタリングを行い、高頻度あるいは高濃度に検出された医薬品については季節変動等の詳細な解析を行った。さらに、環境中濃度これらの医薬品についての環境動態予測のための物性パラメータを取得し、環境動態モデルの検証を行った。

医薬品モニタリングに関しては、国内処方量の多い医薬品等、111 医薬品の LC/MS/MS 分析条件の最適化および LC/MS/MS 一斉分析条件を検討した。全国の研究協力機関に河川水および下水処理場放流水の採水を依頼し、2018～2022 年に掛けて 25 都道府県の調査を実施した。採水試料は速やかに前処理を行い、LC/MS/MS により河川水・下水処理場放流水など合計 700 試料を分析した。その結果、調査対象とした 111 医薬品のうち 91 医薬品が検出され、濃度分布と季節変動に関する情報を取得した。全国を 4 地域に分けて検出率・検出濃度を比較した結果、地域による違いは見られなかったが、幾つかの水系では季節変動が見られ、秋・冬に濃度が高く、春・夏に濃度が減少する医薬品が多かった。医薬品の用途による使用量や河川流量の季節変動により、水環境中濃度にも季節変動が見られると考えられる。

環境動態モデルの検証に関しては、産総研－水系暴露濃度予測モデル「AIST-SHANEL Ver. 3.0 (250 mメッシュ全国水系版)」を用いて全国の河川水中医薬品濃度の予測を行い、AIST-SHANEL がヒト用医薬品に適用できるかどうか検証した。その結果、河川への負荷量が一定量以上の医薬品に関しては、水中半減期が極端に短いものでない限り、AIST-SHANEL により河川中濃度を予測可能と思われた。

(2) 効率的な試験戦略の検討とヒト用医薬品の生態毒性試験の実施

既存の生態毒性試験データや定量的構造活性相関 (QSAR) モデル、専門家の知見などを高度に統合して、QSAR やカテゴリーアプローチ等の *in silico* 手法による環境毒性評価の適用範囲拡大・予測精度向上のために有用な医薬品構造クラスを特定し、優先順位等を設定した。その上で、補助事業分担者が日本国内河川においてモニタリングを実施している医薬品のうち、検出頻度や検出濃度が高い物質を優先して、生態毒性試験データが存在しない医薬品を抽出した。これらの情報を総合し、補助事業代表者らと共同で令和元年度はサルタン系高血圧症治療薬 4 種を含む 8 物質、2 年度はより広い薬効を有する中枢性筋弛緩薬エペリゾンや抗凝固剤チクロピジン、X線造影剤イオパミドールを含む 10 物質、3 年度はスルファ系抗菌剤 2 種や、昆虫忌避剤 DEET、人工甘味料の成分スクラロースなどを含む 10 物質、合計で 28 物質について選定するとともに、適切な慢性もしくは亜慢性試験法、ならびに対象生物種の選定を行った。

まず、対象医薬品の環境中からのモニタリングを実施する補助事業分担者からの情報も得て、試験の対象となった 28 種の医薬品について、生態試験実施中に減衰が予測される水中濃度のモニタリングのための定量分析手法を確立した。必要に応じて固相抽出などの前処理を実施した後、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (LC/MS/MS) を利用し、定量を行った。

上記の QSAR 予測結果などを活用しながら、対象医薬品の生態毒性試験の計画を立て、予備試験である Range finding test を実施した後、試験法ガイドライン等に基づいて適切な試験を実施し、結果を解析して補助事業代表者に試験データを提供した。試験法は、藻類はムレミカツキモ (*Raphidocelis subcapitata*) を用いた OECD テストガイドライン No. 201 に準拠して藻類生長阻害試験を実施して 72 時間後の半数影響濃度 (EC50) や無影響濃度 (NOEC) を算出した。甲殻類については、工業化学物質などを対象とした慢性試験として一般的なオオミジンコを用いた繁殖阻害試験 (OECD テストガイドライン No. 211) は 21 日を要することから、初年度の 10 物質についてはオオミジンコの遊泳阻害試験 (OECD テストガイドライン No. 202) を実施して半数影響濃度を求めるとともに、全ての物質についてニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) を用いたやや短期 (7-8 日) の繁殖試験を実施し、同様に繁殖の無影響濃度 (NOEC) と遊泳阻害の半数影響濃度 (EC50) を求めた。魚類はゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いた OECD テストガイドライン No. 212 の胚・仔魚期短期毒性試験を基本として、ふ化率、仔魚期生存率などを指標として無影響濃度 (NOEC) を求めた。仔魚期からの初期生活段階において影響が顕著となる可能性がある物質について、補助事業代表者とも相談しながら、ゼブラフィッシュを用いた OECD テストガイドライン No. 210 の初期生活段階試験 (流水式曝露装置を利用した 40 日の試験) を 1 物質 (抗 A 型インフルエンザウイルス剤やパーキンソン症候群治療薬のアマンタジン) について実施し、ふ化や致死に加え、体重や体長などの成長の NOEC を求めた。

試験実施の結果、マクロライド系抗生物質のロキシシロマイシンや非ステロイド性消炎・鎮痛薬のセレコキシブ、抗リウマチ薬のサラズスルファピリジンは藻類に対して、中枢性筋弛緩薬エペリゾン、抗凝固剤チクロピジンは藻類とミジンコの 2 種に対して、河川水中からの検出濃度よりは十分に低いものの、NOEC が 0.1 mg/L 以下の GHS 分類の区分 1 相当の比較的強い毒性が検出された。一方で、X線造影剤イオパミドールやイオヘキソール、人工甘味料のスクラロースなど最高濃度区でも魚類、ミジンコ、藻類の 3 生物群いずれについても影響が認められない医薬品もあった。特に魚類胚・仔魚への影響が検出された物質は半数よりも少なく、アマンタジンをはじめサルタン系高血圧症治療薬などについては最高濃度区 (100~1000 mg/L ないし水溶解度限度) でも影響が認められなかった。しかしながら、アマンタジンも仔魚期からさら

に延長して成長を調べた初期生活段階試験結果では、5 mg/L よりも高い濃度で影響が認められたことから、作用機序や検出濃度などの情報に基づいてより長期の試験実施を検討する必要もある。なお、KATE や ECOSAR などの既存の生態毒性の QSAR では予測結果が適用範囲外になったり、予測結果と実測毒性値との間に乖離が認められたりする物質も多く、ヒト用医薬品の作用や構造は多様であることから、今後も生態毒性試験データの充実化を進める必要がある。

(3) ヒト用医薬品の総合的な環境影響評価系構築

まず、生態毒性に関するデータベースについてその更新を行った。各試験についてキュレーションを実施し、化学構造や試験データに関する情報を整理した。欧州医薬品庁 (EMA)、米国食品医薬品局 (FDA)、製薬企業公開情報、環境省農薬評価書あるいは文献から、当該の試験データを追加した結果、598 種の医薬品についての総数として 4314 試験が本データベースには含まれる。本データベースは QSAR Toolbox への搭載が可能で、生態毒性試験に関するデータの共有と毒性予測をサポートするプラットフォームを完成することができた。

本データベースに含まれる藻類の試験データとの比較を行うために、該当医薬品について生態毒性 QSAR モデルである KATE2020 version 1.1 (KATE) と ECOSAR version 1.11 (ECOSAR) の藻類慢性毒性への適用を行った。QSAR モデルの適用範囲について厳格に適用し、その結果、253 種の医薬品について、2 種類の QSAR モデルの少なくともいずれかが適用可能なものは 120 種であった。なお、ECOSAR の適用数は 70 種に対し、KATE は 86 種であった。QSAR モデルでの推計値と試験における実測値の比較では、一致率[上下二桁以内 (0.01~100 倍) であるものを一致とする]は、ECOSAR では 92.9% (65 種)、KATE では 79.1% (68 種) であった。過少評価に繋がる推計値が実測値の 100 倍を超えるものは、ECOSAR では 5.7% (4 種)、KATE では 9.3% (8 種) であった。すなわち、推計値が著しく高くなりリスクが過少に評価されるケースは、いずれの QSAR モデルにおいてもわずかであることが示唆された。

さらに、ケミカルクラスごとの推計値について一致率を検討した結果、KATE ではケミカルクラスによる違いが判明した。抗ヒスタミン薬のジフェンヒドラミンなどが含まれる「CN_X amine unreactive NH,N<」クラスでは、適用された 16 種のすべてが一致し、予測精度が高いことが確認された。一方で「CNOS_X basic aromatic n unreactive」クラスでは、47 種中の 6 種で QSAR の推計値は実測値と比べて 100 倍よりも高く、その毒性は過少に予測された。そこで、これらの知見に基づきケーススタディを実施した。ジフェンヒドラミンの推計値は実測値に対して 1.27 倍で、QSAR モデル作成に用いた参照物質の情報を解析した結果、このクラスでの高い一致率の背景が解明された。抗けいれん薬であるラモトリギンについては、推計値が実測値に対して 0.85 倍で一致する結果であったが、「CNOS_X basic aromatic n unreactive」クラスであるため、信頼性を担保する必要があった。ケーススタディでは、類似構造で実測値がある物質のピリメタミン (抗感染症薬) を、参照物質に追加して参照することにより、信頼性を確保することが可能となった。これらのケーススタディの結果から、評価対象の物質だけでなく、類似構造物質の化学構造や実測値および推計値をよく比較し、QSAR が信頼性の高い推計値を与えるかについて、専門家が注意深く評価する必要があることが示唆された。

一方で QSAR に適さない医薬品については、生態毒性データベースから類似物質情報を収集し、カテゴリアプローチによるリードアクロスの適用を行った。まず対象となる物質について、対象疾患、作用機序および医薬品分類である Anatomical Therapeutic Chemical Classification System (ATC 分類) の情報を収集した。この結果、藻類の慢性毒性についての影響が大きい医薬品カテゴリーとあまり大きくない医薬品カテゴリーについての情報が得られた。医薬品分類ごとにさらに検討した結果、推計値と実測値がよく一致するグループが、抗生物質などを中心に複数見出された。そこで、マクロライド系抗生物質を例に、

リードアクロスを行った。エリスロマイシンの藻類における慢性毒性値は類似構造のアナログであるロキシシロマイシンの慢性毒性値から推計することができた。

以上の検討結果に基づき、医薬品の生態毒性における藻類の慢性毒性値をスクリーニングレベルで予測するためのワークフローをまとめた。そのなかには *in silico* 手法として QSAR と医薬品カテゴリーに基づくカテゴリーアプローチが含まれ、結果として試験実施数を低減することが可能になる。さらに、これらの検討手法は甲殻類や魚類を用いた生態毒性試験において応用可能である。

(1) Development of Environmental Monitoring and Simulation Methods for Human Pharmaceuticals in Japanese River Water

To assess the environmental impact of human medicines, development of environmental fate prediction method in the rivers are necessary. Therefore, we have conducted a monitoring survey of pharmaceuticals in Japanese water environment. Further, we also evaluated a chemical fate prediction model and applied human pharmaceuticals.

Regarding the environmental monitoring development, we selected 111 pharmaceuticals as target compounds, and then we have developed a simultaneous analysis method of the 111 pharmaceuticals in water samples by liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Then, we have conducted environmental monitoring of human pharmaceuticals in Japanese River Water. The sample preparation method, LC/MS/MS analytical conditions were developed and optimized in the present study. We have collected 700 river water samples during 2018 to 2022, then analyzed by the method. As a result of the environmental monitoring, we have detected 91 pharmaceuticals in the river water samples.

Regarding the evaluation of environmental fate prediction model, the concentrations of several pharmaceuticals in Japanese major rivers were calculated using a watershed model (AIST-SHANEL). Then, we compared the estimated concentrations of the human pharmaceuticals with the concentrations measured in this study. Further, we examined the parameters that is significant for the calculation results. The results obtained from the model can be applied to ecological risk assessments of pharmaceuticals of high loading flux to the rivers.

(2) Study on efficient testing strategy and ecotoxicity tests on selected human pharmaceuticals

Based on the discussion with the project leader and other subproject members, we selected 28 human pharmaceuticals with relatively high detection frequency from river water samples reported by the monitoring subproject for filling the gap of the ecotoxicity data to enhance the ecotoxicity database for pharmaceuticals. We mainly used two chronic tests, algal growth inhibition test (OECD test guideline No. 201) using *Raphidocelis subcapitata*, *Ceriodaphnia dubia* reproduction test (analogue of OECD test guideline No. 211 with *Daphnia magna*), and a sub-chronic fish toxicity test with zebrafish embryo and sac fry test (OECD test guideline No. 212). The selected pharmaceuticals included four antihypertensive drugs, an antispasmodic drug eperisone, an antiplatelet drug ticlopidine, iodinated X-ray contrast agents iopamidol and iohexol, antimicrobials such as roxithromycin and sulfamonomethoxine, an insect repellent DEET, and an artificial sweetener sucralose. Whereas iopamidol, iohexol, and sucralose were found to be nontoxic to all three organisms even at the highest tested concentrations (above solubility limit, 100 mg/L or higher), eperisone and ticlopidine were relatively toxic with no effect concentration

at lower than 0.1 mg/L for both alga and daphnid. In addition, macrolide antibiotic roxithromycin was highly toxic to alga with NOEC of lower than 1 µg/L but this concentration is much higher than the highest detected concentrations.

(3) Construction of a Holistic Model for Human Medicine Environmental Risk Assessment

Using data of publicly available information including environmental risk assessment reports by regulatory agencies, peer-reviewed journals, safety data sheets etc., a database consisting of 4314 studies of 598 human pharmaceuticals was constructed. This database that can be installed on QSAR Toolbox facilitates data sharing and supports risk assessments.

The toxicity endpoint, NOEC (chronic toxicity), was predicted with two ecotoxicity QSAR models, KAshinhou Tool for Ecotoxicity 2020 version 1.1 (KATE) and ECOSAR version 1.11 (ECOSAR). Studies with appropriate study designs were selected, and applicability of the relevant pharmaceuticals to the QSAR models was scrutinized. As a result, 120 of 253 pharmaceuticals were applicable to one or more QSAR models. The QSAR evaluations of acute and chronic algal toxicity with KATE or ECOSAR were feasible with high concordance of the predicted/measured rates (0.01 - 100), which were 79.1% (KATE) and 92.9% (ECOSAR) of substances, suggesting that toxicity endpoints were adequately predicted for most query substances. The numbers of pharmaceuticals with prediction/measure rate of >100, leading to significant underestimation of the risk, was very small. Case studies based on different concordance rates among chemical classes in the KATE QSAR model suggested necessity of attention to not only the query substance but also reference substances that were used to construct the model and structurally similar analogues. Scrutinizing these substances could improve the credibility of the QSAR results. For pharmaceuticals that had particular pharmacological mechanisms and were not suitable to the QSAR evaluation, a read-across approach was considered. In a case study in the macrolide category, NOEC of erythromycin was accurately predicted with measured NOEC of the analogue, roxithromycin.

Based on these findings, a workflow model of algal chronic toxicity in which QSAR and category approach were combined was proposed.