

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) 統合的な試験と評価のアプローチによる新医薬品の環境リスク評価フレームワークの開発に関する研究

(英語) Study on development of framework for environmental risk assessment of new pharmaceuticals by integrated approaches to testing and assessment (IATA)

研究開発実施期間: 令和4年4月1日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 山田隆志
(英語) Yamada Takashi

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・第三室長
(英語) National Institute of Health Sciences, Division of Risk Assessment, Section 3 Chief

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動態予測手法の高度化

環境動態予測モデルの評価においては、産総研一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、出荷量を2016～2018年の平均または2017～2019年の平均に更新して河川水中医薬品濃度の予測を行った。その結果、河川への負荷量が多く、水中半減期が長い医薬品の予測濃度は、実測濃度とよく一致したことから、河川水中医薬品濃度を予測において、モデルの有用性が示された。ただし、河川への負荷量が少ない、または水中半減期が短い医薬品は過少予測となる傾向が見られた。また河川水中濃度分布の推定においては、下水処理場放流水の実測データがなく、予測値との相関性が検証出来なかったことや、病院排水等については実測データがなく、点源排出源としてモデルによる推計に反映できなかったこと等が残された課題となった。これらの解決策として、水中半減期や下水処理場放流水、病院排水からの負荷量のデータを正確に予測するための実測データの入手が必要と考えられる。

代謝物・分解物の探索に関しては、国内処方量に比べて検出率・濃度が低い医薬品、スクラロースと比べて希釈率が高い医薬品の中から10医薬品を選定し、LC/MS/MS一斉分析条件の確立および河川水試料等の分析を行った。その結果、アセトアミノフェン、ジフェンヒドラミン分解物を除く8物質が検出さ

れ、特にセレコキシブカルボン酸はセレコキシブと比べて最大 200 倍程度の高濃度で検出され、原体と高い相関を示すことが明らかとなった。一方で、医薬品の代謝物・分解物に関しては、入手できる標準品が限られていることから、対象物質の拡大が困難であった。これらは、対象物質の選定における課題であり、その解決策として、ノンターゲット分析の活用を含めた新規分析手法の開発・導入を検討することが考えられた。

(2) 効率的な試験戦略に基づくヒト用医薬品の生態毒性試験の実施

テーマ（１）において検出されたヒト用医薬品のうち、テーマ（３）の毒性データベースで信頼性が十分な慢性毒性データがないもの、テーマ（１）で検討した代謝物・分解物のうち標準品が比較的安価で入手できるもの、そして過去の毒性試験で非常に強い毒性が検出されたヒト用医薬品と類似した作用・構造を有するもの計 15～18 物質について、工業化学物質や農薬の評価、ならびに欧米の環境リスク評価ガイドライン、厚生労働省「新医薬品開発における環境影響評価に関するガイダンス」にも記載のある典型的な水生生物 3 種を用いた試験を実施した。試験には、過去の研究と同様に、効率的に（Ⅱ）慢性毒性データを取得するため、ムレミカヅキモを用いた藻類生長阻害試験（OECD TG201）、ニセネコゼミジンコを用いたミジンコ繁殖試験（OECD TG211 相当）、ゼブラフィッシュを用いた胚・仔魚期短期毒性試験（OECD TG212）の 3 種の短期慢性毒性試験を利用した。また、一部の医薬品については、動物福祉を考慮してニジマスエラ細胞試験（OECD TG249: RTgill W1 Cell Line Assay）を実施して、魚類急性毒性試験（OECD TG203）やゼブラフィッシュ魚類胚毒性試験（OECD TG236, FET）の結果と比較した。

その結果、生物種によって異なるが、信頼できるデータのなかった 15～18 物質の短期慢性毒性試験データを取得することができたほか、6 物質についてエラ細胞試験結果を取得でき、FET 試験や急性毒性試験結果と比較することができた。本研究で取得したデータの中で毒性が強かったのは、強毒性が予測されたエペリゾンに類似したトルペリゾン、チクロピジンに類似したクロピドグレルやプラスグレルのほか、胃炎・胃潰瘍治療剤のテプレノンについて、またミジンコについては、抗うつ剤のセルトラリン、痛風・高尿酸血症治療薬のアロプリノールとその代謝物のオキシプリノールについて比較的強い毒性が検出された。一方で、抗ウィルス剤のバラシクロビルとその代謝物のアシクロビル、さらには利尿剤のプロセミドとイソソルビドとその代謝物の D-ソルビトール、抗てんかん薬のフェノバルビタール、セフェム系抗生物質のセフメタゾールなどは 100 mg/L 程度の高い濃度でも、3 生物ともに有害影響は確認されなかった。また、エラ細胞試験を実施した 6 物質については、FET や急性毒性試験と大きな差が認められるなど、この試験の適用範囲については特にヒト用医薬品については十分に注意すべきであることがわかった。

これらの生態毒性試験結果とテーマ（１）の測定結果とを比較して 3 生物ごとにその比である毒性単位(Toxic Unit: TU)を算出してスクリーニングレベルのリスク評価を実施したところ、藻類についてはクラリスロマイシンやアジスロマイシン、ロキシスロマイシンなどのマクロライド系抗生物質の TU の値が最大で 0.1 を上回り 1 に近いものがあるなど、既往研究と同様に比較的风险が高いグループであることがわかった。一方、ミジンコについては、チクロピジンなどの TU の値が最大で 0.01-0.1 の間になることがわかったほか、魚類については、TU の値は 0.01 を上回る医薬品、地点はなかったが、胚・仔魚期の（Ⅱ）慢性試験であることやホルモン剤による内分泌かく乱作用による繁殖などへの影響は考慮されていないことから、十分に注意が必要である。なお、ミジンコや藻類に対する環境省の KATE や米国環境保護庁の ECOSAR による生態毒性予測値と実測値との比較を行い、その際に毒性を過小評価する可能性のある医薬品の種類や、ターゲットとなるオーソログの有無が重要な役割を果たし、ミジンコや藻類にオーソログが存在する場合は予測値の利用には十分な注意が必要であることが示された。

(3) ヒト用医薬品の総合的な環境リスク評価系構築および研究統括

公開中の環境毒性データベースに収載したヒト用医薬品の水生生物（藻類、甲殻類、魚類）に対する生態毒性試験データについて、キュレーションを行った。更に化学構造、試験データに関して情報を整理したほか、医薬品を分類する解剖治療化学分類（ATC 分類）や医薬品作用機序の項目の整理、修正、追加した。また、環境省による公開試験データおよび国立環境研究所実施の新規試験データの追加を行った。本データベースは OECD が開発し世界的に利用される QSAR Toolbox へ搭載が可能な仕様で作成されており、OECD に OECD QSAR Toolbox への搭載を提案し、承認を受けることに成功した。本データベースがより広く活用され、リードアクロスや予測モデルの検証などに貢献することが期待できる。

2016 年に厚生労働省が発表した「新医薬品開発における環境影響評価に関するガイダンス」の評価フローでは、医薬品を $\log Kow$ 3.5 でふり分け、3.5 以上で医薬品は生態毒性試験の対象となり、未満の場合は環境中予測濃度（PEC）を計算する。更に計算した PEC を、生態毒性試験実施の閾値である action limit と比較してリスク評価を行うことになっている。同ガイダンスの評価フローに従って PEC の評価対象となる医薬品を選定し、環境モニタリングによる実測値（MEC）と比較することで PEC 値の妥当性を評価した。医薬品の年間処方量を元に、同ガイダンスに示された計算方法を用いて PEC を計算した。PEC は対象となった 44 医薬品のほぼすべてで、MEC（中央値）を上回った。MEC（95%ile 値）を採用すると 29.5%の医薬品で MEC が PEC を上回ったが、その範囲は一桁以内であったため、95%ile 値に対して PEC は MEC を大きく過小評価していないことが示された。MEC（95%ile 値）が PEC を上回った医薬品は、OTC としても広く販売されているためであると考えられた。また、MEC（95%ile 値）に対して PEC が 2 桁の範囲で上回った 13.6%の医薬品では、代謝や環境中での分解などの影響が考えられ、これらを考慮することにより PEC を精緻化できる可能性が示された。

次に action limit の妥当性評価を行った。厚生労働省のガイダンスでは、action limit として $0.01\mu\text{g/L}$ が用いられており、この値は欧州医薬品庁の環境リスク評価のガイドラインの action limit と同じ数値である。環境毒性データベースから無影響濃度（NOEC）が収載された医薬品を、藻類について 323 物質、甲殻類について 383 物質、魚類について 307 物質を抽出した。化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）の予測無影響濃度（PNEC）の計算方法を元に、データベースから抽出した水生 3 生物種の NOEC を 10 で除して毒性値とした。Action limit 未満に毒性値を有することは、評価フローに従い「action limit > PEC」で環境リスクなしとされても、実際にはリスクがあることを意味する。これに該当したのは、藻類に対して 0.62%，甲殻類 1.04%，魚類 2.28%と僅かな医薬品であった。妥当性評価のため、他の値として action limit $0.1\mu\text{g/L}$ を仮定すると、藻類 2.48%，甲殻類 3.13%，魚類 4.89%であった。同ガイダンスの評価フローではまず $\log Kow$ 3.5 がとなり「 $\log Kow \geq 3.5$ 」で生態毒性の実試験が要求される。従って、「 $\log Kow < 3.5$ 」かつ「action limit > 毒性値」の医薬品の毒性懸念が見落とされる可能性がある。該当した医薬品は、藻類に対し 0%，甲殻類 0.26%，魚類 0.33%であったが、魚類ではステロイド骨格を有する性ホルモン系の医薬品が多かった。Action limit を $0.1\mu\text{g/L}$ と仮定しても藻類 0.31%，甲殻類 1.04%，魚類 0.98%と僅かであった。以上から現状の action limit は環境リスクに対して保守的であることが示された。

更に、生態毒性試験の代替として *in silico* 予測手法の適用可能性を検討した。QSAR の事例では、藻類と甲殻類への NOEC を生態毒性 QSAR モデルである KATE 2020 version 5.1 を用いて予測し、実測値との比較から良好な予測性を得た。リードアクロスでは、魚類がオーソログを有する医薬品の NOEC を保守的に予測した。これらを踏まえ、*in silico* 手法を取り入れた医薬品の慢性毒性の評価ワークフローを提案した。

- (1) The AIST-SHANEL exposure concentration prediction model for water systems was used to predict concentrations of pharmaceuticals in river water. The results showed that the predicted concentrations of pharmaceuticals with high loadings to rivers and long half-lives in water agreed well with the measured concentrations, indicating the usefulness of the model in predicting the concentrations of pharmaceuticals in river water.

Further, ten pharmaceuticals were selected as target substances from drugs with low detection rates and concentrations compared to domestic prescription amounts and drugs with high dilution rates compared to sucralose, and LC/MS/MS simultaneous analysis conditions were established and river water samples were analyzed. LC/MS/MS simultaneous analysis conditions were established and river water samples and other samples were analyzed. As a result, 8 substances except acetaminophen and diphenhydramine degradation products were detected. In particular, celecoxib carboxylic acid was detected at concentrations up to 200 times higher than those of celecoxib.

- (2) Among the human pharmaceuticals detected in subproject (1), 15 to 18 substances were tested with three typical aquatic organisms: algal growth inhibition test using *Raphidocelis subcapitata* (OECD TG201), Daphnia reproduction test using *Ceriodaphnia dubia* (equivalent to OECD TG211), and a short-term embryo and sac fry toxicity test using zebrafish (OECD TG212). In addition, for some pharmaceuticals, a rainbow trout gill cell line assay (OECD TG249: RTgill-W1 Cell Line Assay) was conducted in consideration of animal welfare, and the results were compared with the results of a fish acute toxicity test (OECD TG203) and a zebrafish embryo toxicity test (OECD TG236, FET).

As a result, we obtained short-term chronic toxicity values for 15 to 18 pharmaceuticals, depending on the species, as well as the results of fish cell line assay for six of them, which could be compared with the results of FET and acute toxicity studies. Among the data obtained in this study, the most toxic ones were tolperisone, similar to eperisone, which was predicted to be highly toxic; clopidogrel and prasugrel, similar to ticlopidine; teprenone, a drug for gastritis and gastric ulcer; and for *C. dubia*, relatively strong toxicity was found for an antidepressant sertraline, a gout and hyperuricemia allopurinol and its metabolite oxyprinol. For the six substances for which the fish gill cell line assay was conducted, significant differences from the FET and acute toxicity tests were observed, indicating that great caution should be exercised regarding the applicability domain of this test, especially for human pharmaceuticals.

Toxic Units (TU), calculated from measured environmental concentrations (MECs) and no-observed-effect concentrations (NOECs), revealed macrolide antibiotics as a relatively high-risk group for algae. Some drugs posed a moderate risk to *C. dubia*. For fish, there were no drugs or sites where the TU value exceeded 0.01 whereas (sub-)chronic study embryo and sac fry stages were used instead of the endocrine disruption effects of hormone drugs on reproduction, etc. have not been taken into consideration, and so great caution should be exercised.

(3) In 2016, the Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) issued Environmental Risk Assessment (ERA) guidance for new pharmaceuticals. Pharmaceuticals are classified by log Kow value and predicted environmental concentration (PEC): those with $\log Kow \geq 3.5$ undergo ecotoxicity testing, while for those with $\log Kow < 3.5$, PEC is calculated and compared to the action limit (AL) of 0.01 $\mu\text{g/L}$.

In this study, PEC and measured environmental concentrations (MEC) were compared for 44 pharmaceuticals with $\log Kow < 3.5$. PEC generally exceeded the median MEC. Although the 95th percentile MEC exceeded PEC in 29.5% of cases, the ratio was within the range of 1-10, indicating PEC did not significantly underestimate MEC.

Next, the validity of the AL (0.01 $\mu\text{g/L}$) was evaluated. Pharmaceuticals of concern with a predicted no-effect concentration (PNEC) below 0.01 $\mu\text{g/L}$ were few: 0.62% for algae, 1.04% for crustaceans, and 2.28% for fish, indicating the AL is conservative regarding environmental risk.

Furthermore, predictability, taking into account uncertainty and its reduction, was obtained by conducting QSAR and read-across case studies, and a new chronic toxicity assessment workflow incorporating these methods was proposed. Additionally, our ecotoxicity database for pharmaceuticals was curated, and its inclusion in the OECD QSAR Toolbox was approved.