

光異性化反応によるスリンダクの生態毒性の増強

川畑 公平¹⁾, 稲垣 昌宣¹⁾, 西 博行¹⁾

Photoisomerization-Induced Alteration of Ecotoxicological Effects of Sulindac

Kohei KAWABATA¹⁾, Masanori INAGAKI¹⁾ and Hiroyuki NISHI¹⁾

¹⁾薬学科, 薬学部,
安田女子大学

要 旨

近年、世界各地の河川や湖沼等の水環境中から医薬品を検出した事例が数多く報告されている。それに伴い、医薬品の生態系への影響や環境中での挙動が注目されているが、多くの医薬品において、知見に乏しいのが現状である。本研究では、解熱鎮痛剤であるスリンダクについて、水生生物に対する影響が紫外線照射により変化するかについて、ISO11348-1に準拠した生態毒性試験により検討した。すなわち、スリンダク、紫外線（主波長302 nm）を照射したスリンダクおよびスリンダク光分解物の水溶液を海洋発光細菌 *V. fischeri* に暴露し、発光の減少量から毒性の大小を評価した。その結果、紫外線を照射することでスリンダクの毒性は有意に増強し、それには生成した光分解物であるスリンダクの *trans* 体が大きく寄与することが明らかとなった。今回の結果より、医薬品の環境リスクアセスメントを行う上で、親化合物だけでなくその環境下での分解物についても評価が必要であることが示唆された。

キーワード：スリンダク、光異性化、生態毒性、紫外線

1. は じ め に

近年、環境中に流入した医薬品による水環境汚染が問題となっている¹⁾。ヒトや動物の疾病の予防および治療に使われた医薬品は、排泄された後に未変化体もしくは代謝物として下水処理場を経て河川へと流れ込む²⁾。世界各地の河川水、海水、地下水および飲用水等の水環境中から、医薬品、具体的には、解熱鎮痛剤、向精神薬、降圧剤、抗生物質およびホルモン剤等の検出が報告されている³⁾⁻⁷⁾。

医薬品は低濃度でも高い薬理活性を有しており、水環境中に流入すると生態系に様々な影響を及ぼすことが懸念される。例えば、ホルモン剤として使用されている17 α -ethinylestradiolをはじめとするステロイドホルモンは、下水処理場における除去率が低く、下水処理場への流入水よりも流出水から高濃度で検出されること⁸⁾、および魚類等の水生生物に対して内分泌攪乱作用を示して生殖器異常を引き起こすことが知られている⁹⁾。他にも、ミジンコやメダカ等の水生生物を用いた生態毒性試験の結果より、様々な医薬品が水生生物に対して影響を及ぼすことが明らか

となっている¹⁰⁾⁻¹¹⁾。

医薬品の生態系への影響を考える上では、医薬品の水環境における挙動に関しても注意を払う必要がある。水環境中医薬品の挙動に影響を与える要因は、生物的要因と非生物的要因に分けられる。生物的要因とは水生微生物による取り込みや生物分解のことである。非生物的要因には、汚泥への吸着、加水分解、太陽光による光分解等が含まれる。これらの因子は、いずれも水環境中に存在する医薬品を蓄積もしくは分解することで「量的な変化」をもたらすが、医薬品を性質の異なる化学物質へと変換する「質的な変化」をもたらす場合もある。特に、医薬品の中では紫外線により分解物に変換され、それに伴い水生生物に対して強い毒性を示すものが存在する¹²⁾⁻¹³⁾。

筆者らはこれまで数種類の医薬品に関して、紫外線照射による光分解と水生生物への毒性の関係を調べ、その結果を報告してきた¹⁴⁾⁻¹⁵⁾。今回は、解熱鎮痛剤の1つであるスリンドクの生態毒性に紫外線が及ぼす影響について検討する。スリンドクの化学構造を図1 Aに示す。スリンドクは光により影響を受ける化学物質であり、紫外線を照射すると光異性化反応を経て $trans$ 異性体(図1 B)へと変換されることはすでに報告した¹⁶⁾。本論文では、この光異性化により生じる可能性のある生態毒性の変化について、簡便かつ高感度な毒性スクリーニング試験法であるISO11348-1に準拠した評価法(Bacterial Bioluminescence Toxicity Test)を適用したので、その結果を報告する。

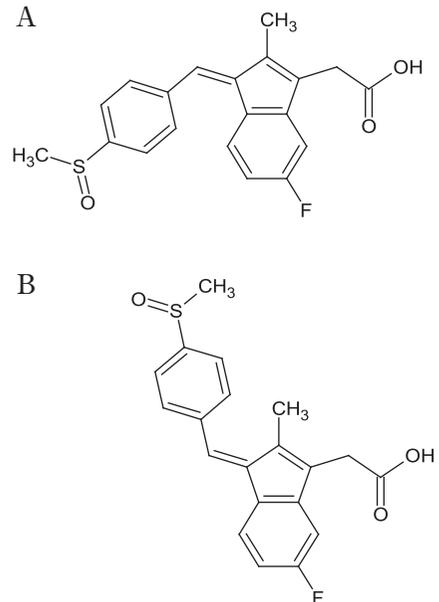


図1 スリンドク (A) とその光分解物 (B) の化学構造

2. 実験方法

2.1 試薬および試料

スリンドク (> 98%) は東京化成工業(株)(東京)より購入し、そのまま試験に供した。海洋発光細菌 *V. fischeri* (NRRL B-11177) は、JJS Technical Services (Illinois, USA) より凍結乾燥品を購入した。移動相で使用したメタノール、酢酸、*V. fischeri*培養用の培地、試薬および発光阻害試験で使用した硫酸亜鉛・七水和物、ジメチルスルホキシド、塩化ナトリウムは、富士フィルム和光純薬(株)(大阪)より試薬特級品を購入した。試料および試薬を調製する際に使用したMilli-Q水(18.2 mΩ/cm)は、Milli-Q水製造装置(Millipore, Billerica, USA)より採水した。

2.2 *V. fischeri*の培養

凍結乾燥した *V. fischeri* (1バイアル) をメディウム10 mLに加え、20℃、180 rpmにて24時間培養した後に毒性試験に用いた。メディウムの組成は、10 g/L ブレインハートインフュージョン培地、0.5 g/L 酵母エキス、0.5 g/L 硫酸アンモニウム、25 g/L 塩化ナトリウム、0.2 g/L 硫

酸マグネシウム・七水和物、6.1 g/L リン酸二水素ナトリウム・一水和物、2.8 g/L リン酸水素二カリウム・三水和物、3 mL/L グリセロールであった。

2. 3 紫外線照射実験と光分解物の評価および分取

スリンダクをメタノールに溶かして1 mg/mLとした後、その溶液50 μ Lをとり、Milli-Q水を加えて50 mLとした（終濃度1 ppm）。この溶液に高圧水銀ランプ（UVP、California、USA）を用いて主波長302 nmの紫外線を6時間照射した後に、HPLCによりスリンダクの光分解物を分析した。HPLC条件は以前の報告に従い¹⁶⁾、装置は（株）島津製作所（京都）Prominence装置一式を使用した。カラムはShim-pack VP-ODS（内径4.6 mm、長さ150 mm、粒子径5 μ m）（（株）島津製作所）を使用した。HPLC条件を以下に示す。検出波長254 nm、流速1.0 mL/min、注入量20 μ L、カラム温度40°Cである。水とメタノールの比率を1 : 1で調整し、それに0.1%（v/v）となるように酢酸を加え、移動相溶媒とした。

スリンダク光分解物の精製は以下のとおりに行った。10 ppmのスリンダク溶液100 mLを20個用意し、上記条件にて紫外線を照射した。1個につきOasis HLB Cartridge 3cc（Waters、Milford、USA）1本を用いて固相抽出を行った。Oasis HLB Cartridge 3ccをメタノール2 mLおよびMilli-Q水1 mLで平衡化した後に、試料を注入した。その後、メタノール4 mLで溶出し、溶出液を集めて減圧乾固したものを再度メタノール2 mLに溶かし、1000倍濃縮した。HPLCに50 μ L注入後に光分解物のピークを分取し（20回）、減圧乾固にてメタノールを除いた後に再度固相抽出した。メタノール溶出液を減圧乾固したもの（約1 mgの黄色粉末）を毒性試験に供した。

2. 4 毒性試験用の試料調製

毒性試験用試料（スリンダク、紫外線を照射したスリンダク、スリンダク光分解物）、陽性対照および空試料の調製法を以下に記す。スリンダクおよびスリンダク光分解物は水に溶けにくいいため、助剤としてジメチルスルホキシド（DMSO）を使用した。その際、DMSO含量が30%（v/v）以下となるようにし、スリンダクおよびスリンダク光分解物の1 mg/mL溶液（溶媒：Milli-Q水）を調製した（全量1 mL）。スリンダクの紫外線照射試料の場合は、1 ppmのスリンダク溶液に2. 3の方法で紫外線を照射した反応液を固相抽出にかけ、メタノールによる溶出と減圧乾固を行い、粉末を得た。その後は上記と同様の方法で試料調製を行った。

調製した試料それぞれに22%（w/v）塩化ナトリウム溶液0.1 mLを加えて塩化ナトリウム濃度を2%（w/v）とした後に希釈し（2-128倍）、毒性試験に供した。別に陽性対照として硫酸亜鉛溶液220 μ g/L（塩化ナトリウム濃度2%（v/v））を調製し、試験に使用した。試験化合物を含まない試料（空試料）も同様の手順で調製し、比較対象とした。その際、DMSOの最終濃度が30%（v/v）となるように試料に加えた。

2. 5 Bacterial Bioluminescence Toxicity Test

*V. fischeri*を24時間培養したメデイウムの50倍希釈液を600 μ Lとり、2%（w/v）塩化ナトリウム溶液3 mLに加えてよく攪拌した。96 wellプレートに100 μ L/wellずつ添加し、15分後に発光量を測定した（0 min発光量）。発光量の測定にはARVO™ MX（Perkin Elmer、Massachusetts、USA）を使用した。*V. fischeri*を添加したウェルに2. 4の方法で調製した試料を100 μ Lずつ加

えて全量を200 μ Lとし、15分後に発光量を測定した（15 min発光量）。陽性対照および空試料に関しても同様に測定した。

2.6 毒性の評価

試料暴露による *V. fischeri* の発光量の減少割合から毒性を評価する際は、ガンマ (Γ) 関数を使用した。 Γ 関数は t 時間後における光の残留量に対する t 時間に消失した光の比で表される。発光量が半減する試料の濃度、すなわち $\Gamma = 1$ となる試料の濃度が EC_{50} として算出されるので、それを毒性の指標とすることができる。1群につき $n=3-4$ で試験を実施した。

得られた結果はすべて平均値 \pm 標準偏差で示し、統計学的有意差検定はTukey's testを用いて行い、 P 値が0.05未満を有意差ありとした。

3. 結果及び考察

3.1 紫外線照射によるスリンダク分解の解析

スリンダク水溶液に紫外線を照射した後、スリンダクの分解および光分解物の生成をHPLCにて解析した。図2にHPLCクロマトグラムを示す。紫外線照射前のクロマトグラム（図2A）と比較して紫外線照射6時間後のクロマトグラム（図2B）には、スリンダクのピーク（保持時間5.3分）に加えて光分解物のピーク（保持時間5.8分）が検出された。紫外線照射6時間後のスリンダク残存率は60%であった。紫外線照射によりスリンダクが分解され、光分解物が生成したため、スリンダクの水生物に対する毒性は紫外線に曝されることで変動する可能性が示唆された。

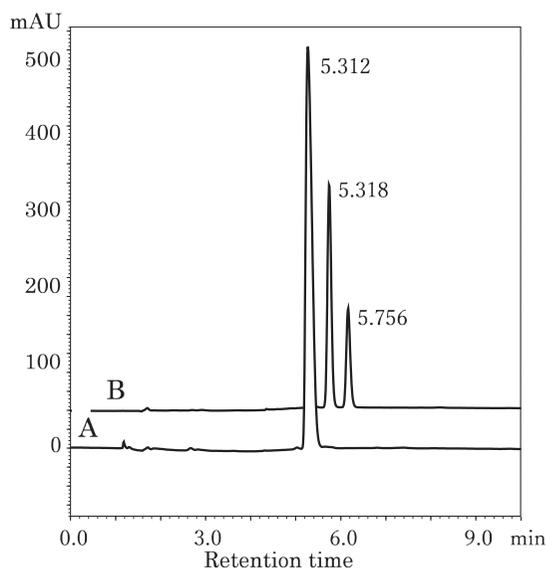


図2 スリンダクのHPLCクロマトグラム (A) 紫外線照射前 (B) 紫外線照射後

3.2 海洋発光細菌を用いたスリンダクの生態毒性評価

海洋発光細菌を用いた生態毒性試験、すなわち、Bacterial Bioluminescence Toxicity Testの概要を図3に示す。この試験はISO11348-1に準拠した試験である。ISO11348-1では発光量の測定にルミノメーターを用いて1検体ずつ測定するのに対し、本試験ではプレートリーダーを用いて数十種類の検体をまとめて処理する方法を採用した。本法は、簡便かつ迅速に多検体に含まれる化学物質の毒性を高感度に検出できるため、急性毒性の評価に適している。培養した *V. fischeri* にスリンダクを暴露し、発光量の減少から毒性の大小を評価した。スリンダク暴露後の発光量の

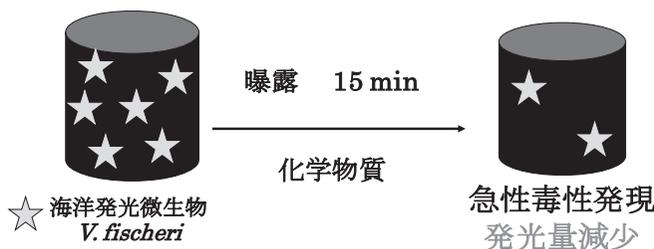


図3 Bacterial Bioluminescence Toxicity Testの概要

測定結果を図4に示す。スリンダクを暴露する前はいずれの試料においても同程度の発光量を示したのに対し、スリンダク暴露15分後は濃度依存的な発光量の減少が認められた(図4)。今回の検討において最大濃度であるスリンダク225.02 mg/Lを細菌に暴露させると、その発光量は90%以上減少した。Γ関数を使用してEC₅₀値を算出した結果を表1に示す。スリンダクのEC₅₀値は37.0 ± 1.6 mg/Lとなった。試験の妥当性を評価するために陽性対照である硫酸亜鉛を*V. fischeri*に暴露し、発光の減少量からEC₅₀値を算出したところ、109.3 ± 5.2 mg/L (24.9 ± 1.2 mg Zn/L) となった。ISO11348-1に

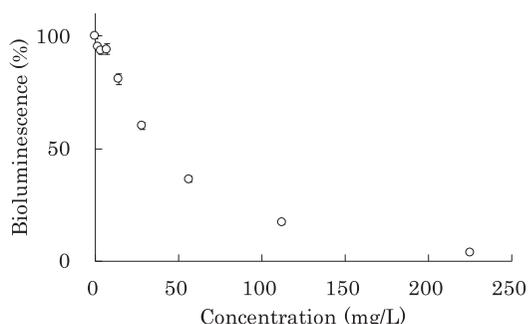


図4 スリンダクを海洋発光細菌に暴露した後の発光量の濃度依存的な減少

規定されている陽性対照のEC₅₀値(26 mg Zn/L)とほぼ同じであり、本試験より得られた結果は妥当と判断された。

3.3 スリンダクの生態毒性に対する紫外線の影響の評価

スリンダク、紫外線を照射したスリンダクおよびスリンダク光分解物を*V. fischeri*に暴露し、発光の減少量よりEC₅₀値を算出した。それぞれのEC₅₀値を表1に示す。スリンダクと比較して紫外線を照射したスリンダクおよびスリンダク光分解物のEC₅₀値は有意に低下し、毒性の増強が認められた。スリンダクは紫外線を照射されると、より毒性の強いスリンダク光分解物へと変換されることから、紫外線照射によるスリンダクの毒性増強には分解物の生成率が大きく寄与することが明らかとなった。今回照射した紫外線(主波長302 nm)は太陽光中にも含まれることや、スリンダクが水環境中から検出されているため¹⁷⁾、スリンダクの光分解とそれに伴う生態毒性の増強は環境中でも引き起こされる可能性が示唆された。筆者は、スリンダクの光分解物は302 nmよりも長波長の紫外線照射でも生成することをすでに明らかにしているが¹⁶⁾、スリンダク光分解物の環境中からの検出例はまだ報告されていない。医薬品の生態毒性が紫外線により増強したという報告は他にもあるが¹²⁾⁻¹³⁾、今回の結果より、水環境中の医薬品のリスクアセスメントを行う上で、紫外線による毒性変動も加味する必要があることが示された。

スリンダク光分解物はスリンダクの幾何異性体であり、なぜ毒性の大きさに差異が生じるか

表1 生態毒性試験における紫外線照射前後のスリダクおよびスリダク光分解物のEC₅₀値

| Compounds | EC ₅₀ (mg/L) |
|-------------|---------------------------|
| スリダク | 36.99 ± 1.55 ^a |
| 紫外線照射後のスリダク | 30.98 ± 0.74 ^b |
| スリダク光分解物 | 31.98 ± 0.83 ^b |

数値は平均値±標準偏差で表記 (n=3)、異なるアルファベット (a, b) がついた値は統計学的有意差検定 (Tukey's test) において有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

は、まだ不明である。*V. fischeri*の発光は呼吸鎖と連動して生じるため、化学物質による細胞膜の損傷やストレス惹起により発光量の減少が引き起こされるのかもしれない。細胞等を用いた*in vitro*の実験系や他の水生生物を用いた毒性試験を行うことで、スリダク光分解物の毒性に関する詳細な情報が得られるものと筆者は考える。さらに、試験化合物に紫外線を照射した後に変異原性を確認するphoto-Ames試験や慢性毒性を評価する長期暴露試験など、様々な視点からアプローチすることで、「水環境中に存在するスリダクの生態系に対する影響」をより確実に評価することができる。今後の検討課題としたい。

4. ま と め

以上、本研究よりNSAIDsの1種であるスリダクは紫外線照射により*trans*異性体である光分解物へと変換され、それに伴い水生生物に対する毒性も増強されることが明らかとなった。医薬品は今後も継続的に使用されるため、それに伴う環境中への排出も予想される。多くの医薬品に関して、紫外線照射による生態毒性の増減が評価されていないため、情報のない医薬品を対象としたさらなる研究は重要と考えられる。

引 用 文 献

1. Kummerer, K., *J. Environ. Manage.*, 90, pp.2354-2366 (2009).
2. Heberer, T., *Toxicol. Lett.*, 131, pp.5-17 (2002).
3. Vieno, N. M., Tuhkanen, T., Kronberg, L., *J. Chromatogr. A*, 17, pp.101-111 (2006).
4. Yu, J. T., Bouwer, E. J., Coelhan, M., *Agric. Water Manage.*, 86, pp.72-80 (2006).
5. Wu, C., Witter, J. D., Spongberg, A. L., Czajkowski, K. P., *Water Res.*, 43, pp.3407-3416 (2009).
6. Zorita, S., Martensson, L., Mathiasson, L., *Sci. Total Environ.*, 407, pp.2760-2770 (2009).
7. Fang, T. H., Nan, F. H., Chin, T. S., Feng, H. M., *Mar. Pollut. Bull.*, 64, pp.1435-1444 (2012).
8. Terners, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R. D., Servos, M., *Sci. Total Environ.*, 225, pp.81-90 (1999).
9. Weber, L. P., Hill, Jr., R. L., Janz, D. M., *Aqua. Toxicol.*, 63, pp.431-446 (2003).
10. DellaGreca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Previtera, L., Rubino, M., Temussi, F., *Chemosphere*, 54, pp.629-637 (2004).

11. Crane, M., Watts, C., Boucard, T., *Sci. Total Environ.*, 367, pp.23-41 (2006).
12. Uwai, K., Tani, M., Ohtake, Y., Abe, S., Maruko, A., Chiba, T., Hayama, Y., Ohkubo, Y., Takeshita, M., *Life Sci.*, 78, pp.357-365 (2005).
13. Gomez, M. J., Sirtori, C., Mezuca, M., Fernandez-Alba, A. R., Aguera, A., *Water Res.*, 42, pp.2698-2706 (2008).
14. Kawabata, K., Sugihara, K., Sanoh, S., Kitamura, S., Ohta, S., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 249, pp.29-35 (2012).
15. Kawabata, K., Sugihara, K., Sanoh, S., Kitamura, S., Ohta, S., *J. Toxicol. Sci.*, 38, pp.215-223 (2013).
16. Kawabata, K., Akimoto, S., Nishi H., *Chromatogr.*, 39, pp.139-146 (2018).
17. Suzuki, T., *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, 63, pp.69-81 (2012).

[2019. 9. 26 受理]

コントリビューター：徳村 彰 教授 (薬学科)

