

環境中医薬品・農薬など
の複合影響と生物試験

国立環境研究所
環境リスク研究推進室
鑑迫 典久

私は、なぜ複合暴露の話でここに立っているかと言いますと、環境リスク研究推進室というところに所属しているんですけども、そこでのメインのテーマの1つが複合影響についてで、センター長の青木が人健康のほうをやっているんですけど、私が生態影響のほうで複合影響についての考え方をなんとか示せないかと思って、研究をここ数年やっております。

それについてはたいした成果は出ていないんですけども、皆さんと一緒に紹介しまして、皆さんのお知恵を拝借したいと思ってここで発表させていただきます。

化学物質の複合影響評価に関する動向

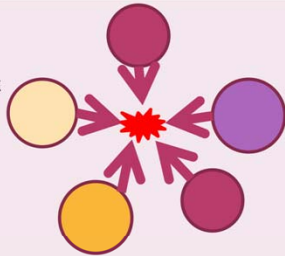
- Mixture effect (複合影響) とは
 - 複数の化学物質に同時あるいは連続してばく露された後に生物系に生じる反応。
Combination effect, Combined effect, joint effect
- 欧米では化学物質規制において注目、既に文献レビューや研究アプローチについて議論が進んでいる
USEPA (1999) Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures
EU (2009) State of the Art Report on Mixture Toxicity
- 日本では2012年12月、環境省において専門委員会の立ち上げられた

背景なんですが、先ほどBackhaus先生のほうの背景にほとんどがかぶっていますので、省略させていただきます。

複合影響評価に対する2つのアプローチ

Component-based approach

実験的にありうる成分を混合して試験



- 各成分の量から複合影響を予測。経験的にモデルを作成。
- 食品、医薬品、農薬製造プロセスの最適化に使用実績あり
- 化学物質の組み合わせが無量大
- 物質数増加で実験条件が膨大に
- 複数物質の毒性応答曲線モデルは物質の作用（相加・相乗・相殺）によって異なる

Whole mixture approach

複数の化学物質を含有している環境媒体（環境水、大気浮遊粒子等）を直接、総体として評価して評価（例：WET）



- 実環境中における複合影響の実態を把握できる
- 相乗・相殺含めたサンプル中のすべての成分の影響が、総体影響として捉えられる。
- 実際に試験した条件以外の情報が得られない：異なる濃度への外挿ができない

最初に、複合影響の考え方で、これも先ほどのBackhaus先生のご講演にもあったんですけども、上流での規制として個別化学物質規制というのが日本でも行われておまして、個々の化学物質を足せるのか足せないのか、相乗があるのか、ないのかという議論が一つあります。

もう一つは、ミクスチャーを、ミックスしたままとらえてその毒性を評価できないか。これがWhole Effluent Toxicityの考え方とも言えると思うんですけども、下流でのミクスチャーそのままの化学物質管理のやり方があると思います。こちらのお話を本当はしたいんですけども、きょうはこちらのWETのお話をしないで、こちらのほうのお話をメインで話させていただきます。

複合影響の概念と評価方法

複合影響の分類 (PlackettとHewlett,1967)

	類似の作用様式の複合作用	異なる作用様式の複合作用
相互作用なし	単純な類似作用 (相加作用) (Simple similar action, Concentration addition)	独立作用 (Independent action)
相互作用あり	複雑な類似作用 (Complex similar action)	相互依存作用 (Dependent action)

相乗・拮抗作用

作用様式=MOA

この有名な表があるんですけども、これは皆さんのほうが私よりもだいぶご存じだと思うんですけども、きょうはこの表に沿って話をさせていただきたいと思いますので、先ほどのBackhaus先生と重複しますけれども、ここの説明からさせていただきます。

まず、総合影響を考えるとときに化学物質の分類としまして、類似の作用を持っているのか、異なる作用を持っているのかでまず分かれて、さらに化学物質間に相互作用があるかないかで分けています。つまり、相互作用がなしと相互作用が有りで4パターンに分けて、複合影響について考えてみましょうという話になっています。

それで、実は相加という考えのときと、つまり足せるという考えのときと、足せない場合、つまり足せないというのは相乗とか拮抗という言い方をされていますけれども、それを分けて考えなければいけなくて、この部分は実は足せると考えていいのですが、ここは実は足せない部分で、それを相乗とか拮抗という言い方をしています。

ですから、相乗とか拮抗と言ったときの化学物質群として考えるのは、類似の作用であっても異なる作用でもいいんですけども、化学物質同士に相互作用がある場合が相乗とか拮抗になります。先ほどの質問にもちょっとあったみたいですが、両方とも化学物質が独立している場合、相互作用がない場合には一応足せるんじゃないかとしてモデルが作られています。



その作用様式、作用機序とかいう言い方をしませんが、それをmode of actionという言い方をしています。私はそのmode of actionという言葉とか、相互作用あり、なしというイメージが最初つかめなくて、皆さん、ちょっとそれじゃないだろうと思うかもしれませんが、私がイメージで示したのがこのスライドです。

まず説明いたしますのが、相互作用があるとかないとか、どういうことかということなんです。まず皆さん、相互作用がない場合、つまり類似の作用様式を持っている例というのはお手元のそれを見て分かるように、実は甘い物ばかりありますよね。ですから、甘いものを1つのmode of actionと考えたときに、そのmode of actionは足せるんじゃないか、です。つまり、砂糖もクリームも、あんこも小豆もそうですけれども、それは甘いというmode of actionと考えていいと思うんです。そうすると、飽きますよね。飽きますよねというか、甘い物ばかり食べていると、満腹じゃないのに食べられなくなるじゃないですか。それは、加算されているんじゃないかなという考えです。だからこれは相加作用のほうに入るんです。

食べ合わせ

一緒に食べるときに食材の取り合わせが悪いとされる

- 銀杏に鰻
- トコロテンと生卵
- 人参と大根
- 秋刀魚（さんま）と漬物
- ほうれん草とゆで
- くるみと酒
- ラーメンと飯
- 「メントス」と炭酸飲料
- 鮎と牛蒡
- おこわと河豚

天ぷらとスイカ



鰻と梅干し



天ぷらと氷水



スイカとビール

相乗・拮抗作用



タコとわらび



ドリアンとアルコール飲料



カニと柿



蕎麦と田螺



ところが、これは皆さん、スライドのお手持ちを見たりすると答えが出ているから面白くないんですけども、これはなんだろうというと、実は食べ合わせなんです。スイカとビールとか、てんぷらと氷水とか、タコとワラビとか。私もよく知らなかったんですけども、そばとタニシとかの組み合わせもあるらしいです。

これはお互いの化学物質同士、化学物質と考えたときに、お互いに関係性がある場合なんです。これはマレーシアとかで確かドリアンとアルコールを一緒に食べちゃいけないというのはことわざみたいなのであるらしいんですけども、ドリアンの中の酵素がアルコール吸収を促進するか何かで、酔っ払いやすくなるらしいんです。ですから、悪酔いするのでドリアンとアルコールは一緒に飲んじゃいけないとか。

複合影響の概念と評価方法

複合影響の分類 (PlackettとHewlett,1967)

	類似の作用様式の 複合作用	異なる作用様式 の複合作用
相互作用 なし	単純な類似作用 (相加作用) (Simple similar action, Concentration addition)	独立作用 (Independent action)
相互作用 あり	複雑な類似作用 (Complex similar action)	相互依存作用 (Dependent action)

相乗・拮抗
作用

つまり、何かの相互作用をお互いの化学物質が持っている場合、これが足せないんです。足せないので、相互作用とか類似の作用様式を持っている場合は足せないから、これは相乗とか拮抗作用になるんです。というふうに、まずここを整理させてください。違う考えの方もいらっしゃると思いますが、私の考え方はこういう整理で、今、これからも話をしていきます。

次に考えるのは横のほうなんですけれども、足せると考えた場合に、先ほどのBackhaus先生の話にもありましたけれども、足し方にいろいろありまして、Concentration additionなのか、Independent actionなのかという考え方です。

相互作用がない場合の毒性予測モデル

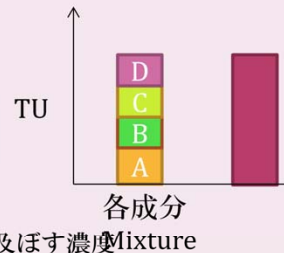
■ Concentration addition model (CA) : Dose addition 濃度加算・単純な類似作用

- 作用機序が類似の物質群に適用
- TU=濃度/ EC_{xi} の総和
- 同じTUなら他の成分は必要ない

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{xi}} = 1$$

量が足せる

c_i : Mixture中の物質iの濃度
 EC_{xi} : 物質i単独でx%の影響を及ぼす濃度

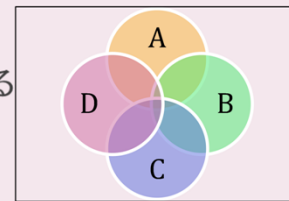


■ Independent action model (IA) : Effect addition/Effect multiplication 影響乗算・独立作用

- 作用機序が異なる物質群に適用
- 影響は足し算 (影響を足す)
- NOEC未満の物質は影響を及ぼさない

影響が足せる

$$E(C_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)]$$



$E(c_{mix})$: i個の物質の合計濃度 $c_{mix} (= \sum(c_i))$ におけるMixtureの影響
 $E(c_i)$: Mixture中の物質iの、濃度 c_i における単独影響

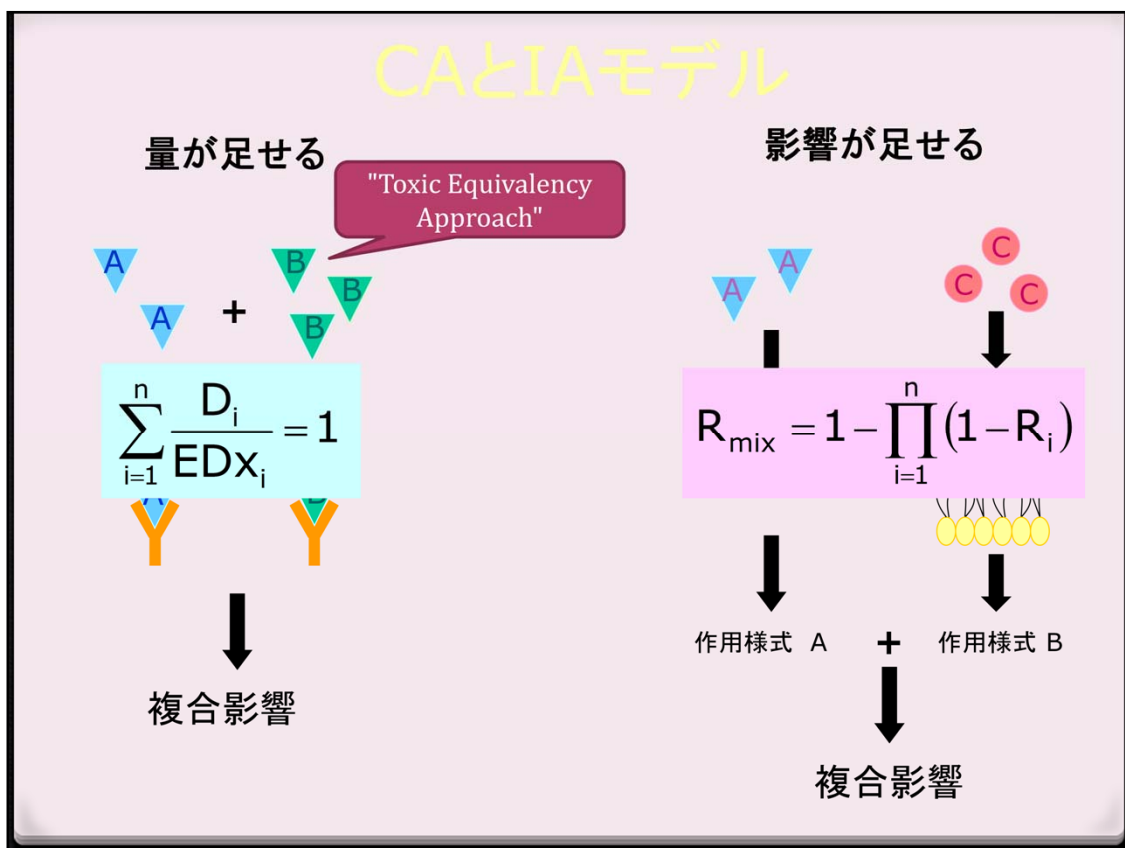
8

実は、こちらがConcentration additionの考え方で、こっちがIndependent actionの考え方なんですけれども、つまりIndependent actionのときは作用が別々のものを足す場合、

Concentration additionの場合は、作用が同じ場合を足すんです。もちろん、式が違う。これは省略しますが、先ほどBackhaus先生のほうで式があったので除外しますが、イメージ的には、こちらはどんどん、ものがある限りものの濃度を足して行って影響に到達するという考えで、こちらのほうは、実は、例えが悪いですが、ある原因で死んだグループがたくさんいて、100人くらい一緒に死んだとします。

その中で、例えば出血で死んだ人、窒息で死んだ人、毒物で死んだ人といいますが、最初に出血で死んだ人を除いて、残りのグループの半分が毒物で死んで、残りの半分がまた何で死んでというふうにとりやうに取っていくやり方なんです。ですから、ここで1から引いているのは、生き残った人たちの中で何割がまた違う原因で死んで、またその中の生き残った人たちがまた何割死んでという言い方をされていて、最後に1から引いて元に戻して、全体の死んだ人たちを出すというような形に、イメージを考えてください。

ですから、影響を足していくのが、Independent actionのほうで、濃度を足していくのがConcentration additionなんです。



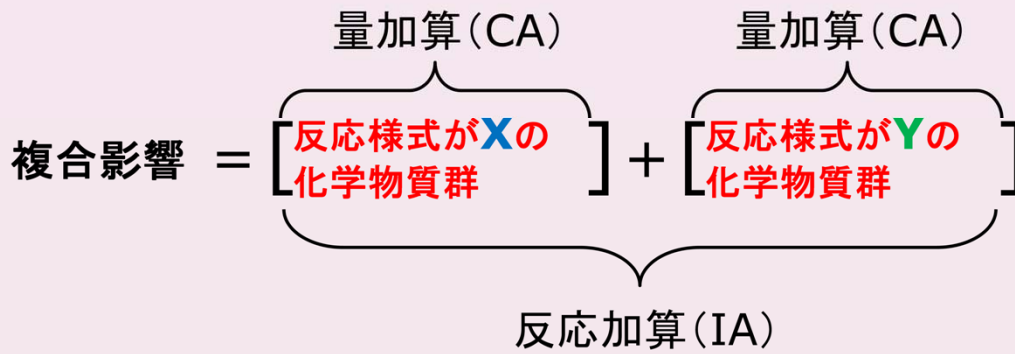
化学物質が足せるか足せないかと言ったときに、どちらのモデルがいいかということ、これから私の手持ちのデータでお話するんですけども、その前にもうちょっと詳しく整理します。

Concentration additionとIndependent actionのモデルで、これはよく使われているグラフですけども、量が足せるということはどういうことかということ、同じmode of actionの量が足せるので、同じmode of actionというのは、実は同じようなレセプターの場合、この場合レセプターが考えやすいのでたまたまレセプターですけども、同じレセプターにAもくつつくし、Bもくつつくというときには、多分足せるんです。ただ、くつつくときのアフィニティーの違いがあるので、そこにある程度係数をかけなきゃいけない。それを考えてやったのがダイオキシンなんかのTEQです。Toxic Equivalency Factorというのから考えて足したのが、こちらのモデルになります。

ですから、ここに書いてありますけれども、Toxic Equivalency Approachというのが、こちらの考え方があります。こっちの影響が足せるというほうがどうかということ、内分泌かく乱の中で考えていただくと分かると思うんですけども、例えば核内状態にくつつく場合と、例えば違う、核じゃないいろんな細胞膜とかに付いているレセプターに反応する化学物質もありますし、部位が違うところで違うアプローチをする化学物質もあります。エラからくるのもあります。でも、最終的には内分泌かく乱する。でも、そのプロセスが全部違いますよというときには、実は影響、こっちから来たのとこっちから来たので、最終的に全体に影響してこうなるという場合には、こちらのアプローチになることになります。式がそれぞれ、さっき言ったように違う式になっています。

少し進んだ考え方

CA+IA統合型モデル



それで、さらに進んだ考え方なんですけれども、CAとIAの統合型モデルというものもありまして、これは反応様式がXの化学物質群がある。だから、個別じゃなくて群で考えてください。Xの化学群とこちらのほうは違う化学群があつて、それが足せるかというときに、この部分、同じmode of actionの場合はCAで足せるので、例えばこっちが同じmode of actionの場合は足せる。こっちはmode of actionで足せる。それ同士が、また、足せる。

反応加算型

$$0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 = 0$$

統合加算型

$$0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 = \text{中間の影響}$$

量加算型

$$0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 + 0 = \text{影響アリ(100\%を超えることもある)}$$

これはもちろん、先ほどの話の続きでいうと、甘い物はどんどん食べられるから、甘い物を食べますよね。甘い物に飽きてくる。おなかはまだすいているけれど甘いものが食べられなくなったときに、塩昆布とかせんべいがきたら、また食べる。だから、しょっぱい群グループは食べられるわけですよ。足して行って、全体数の複合影響が出てくるという考え方もあります。加算で、ここはIAで加算するんですね。ここがCAで加算するというやり方です。これが統合型の計算方法になっています。

この2つの特徴は、先ほどもちょっとありましたけれども、IAで足した場合、つまり現象を足した場合は無影響の影響を足していても全部無影響なのでゼロはゼロなんですけれども、Concentration Additionで足し算をしていくと、測定項目が増えれば増えるほど数値が大きくなってしまうので、100を越えてしまうことがあるんです。それは私も、実はフィールド調査でやってそういうことが起きたんですけれども、あれと思ったんですが、非常に困るんですね。実はその中間がさっき言った統合型で、これは多分100パーセントとゼロの間を取ることにしたいと思います。

複合影響評価に対する課題

■複合影響を考える対象物質の選択

- 組み合わせは無限大に存在する。
- 物質間相互作用があるか
- 類似の作用様式 (MOA) をもつか

■実験デザインの選択

- Surface design
- Isobole design (等効果線法)
- Fixed ratio (成分比固定)
- Point design
- 3物質以上になると必要な試験条件が膨大・複雑に。
- 濃度加算性、独立作用性、相乗作用、拮抗作用を証明するための実験デザインは様々。

■適切な評価方法

- 試験の再現性を考慮した上での、定量的な評価が難しい
 - MTI (Mixture Toxicity Index)

12

それで、複合影響に対するデザイン、これは一般的な解説にすぎないんですけども、難しいのは複合影響を考えたときに対象物質の選択として組み合わせが無数にありまますので、どれとどれを組み合わせでいいかわからないですよね。あとは、物質間の相互作用があるか、ないかというのを見分けるのも、理屈では、私は今簡単に言いましたけれども、これとこれに相互作用があるかどうか、分かるのは難しいんです。グレープフルーツとバナナの間には相互作用があるかと言ったら、実はグレープフルーツというのは皆さんご存知のようにある薬と一緒にグレープフルーツを飲んだらまずい場合がありますよね。そういうふうに、つまりP450を誘導してしまうのでまずいんですけども、そういうことが起きるかどうかというのとは分からないものが実はたくさんある。人健康では分かるんですけども、特に生態、野生生物では分からないことがたくさんあります。

あとは、類似の作用様式、簡単にmode of actionと言っていますけれども、なるかどうか、実はよく分からない。一言で除草剤と言ってもいろんなタイプの除草剤があるし、そこが同じかと言われたら、実は微妙に違ったりするので、どこまで同じと考えていいかというのも、非常に問題だと思います。

実験デザインの選択ですけれども、Surface designのお話はきょうはしなくて、私が今回ご説明するのはIsobole designとFixed designの話をしていきます。あと、Point designの話も、きょうはしません。というのは、これはいろいろあるので難しいのですけれども、先ほどのBackhaus先生のは同じ影響度合い、例えばEC1とかEC10を足していったらどうなるかという話でしたけれども、私のやり方は、これから説明するのは、環境中の濃度とか、起こりうる組み合わせと起こりうる濃度で暴露したときに何が起きるかという計算でやってみたいと考えています。

今回の試験概要

- 2種の組み合わせ：農薬（除草剤）を用いた等効果線法試験
- 3種以上の組み合わせ①：農薬製剤中の有効成分（除草剤）による複合ばく露試験
- 3種以上の組み合わせ②：排水基準に基づいた金属類の複合ばく露試験

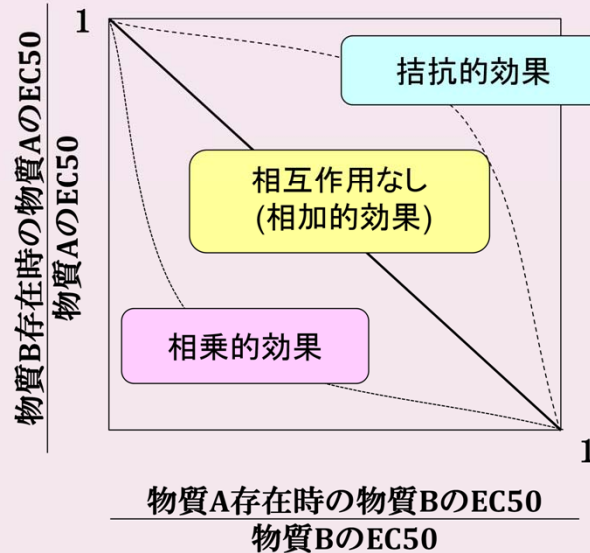
13

3つについて説明します。実はタイトルで医薬品と書いてしまっていて、それは本当に申し訳ないですけれども、医薬品は実は今回カットさせていただきました。というのは、医薬品の実験もやっているのですけれども、話すとき長くなって30分で収まりきらなくなると、環境省のほうで一番興味があるのは、多分金属とか排水基準とか農薬、環境中農薬についての話のほうがいいかなと思って、そちらのほうに持ってきました。機会があれば、そのうちに医薬品の話もしたいと思います。

ちなみに、ちょっとだけさわりをお話しすると、多摩川から検出されてくる医薬品というのは何種類かあるんですけれども、それを上流から下流まで濃度を測定して、その濃度比に合わせて医薬品を混合して、それが全体の下水処理場から出てくる影響のどれくらいを医薬品が占めているかというような研究をしております。もしも興味があれば、そのうち発表いたします。きょうはこの3つについての説明をします。

2種の組合せ：除草剤2種による等効果 線法試験

等効果線法 (Isobole design) とは



14

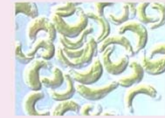
まず、2種類の組み合わせで、除草剤2種類で試しにやってみました。これは、なぜこの2種類を選んだかという、単純に水田農薬としてよく検出されるからということで選んでみたんです。今は出ていませんけれども、Isobole designというのを2種類で考えてやってみたのですけれども、これは皆さんには説明する必要もないと思いますけれども、このように直線になれば相加で、こちらのほうにグルッと曲がれば相乗的な効果があって、こちらに曲がれば拮抗的な効果になるということで、ここはAという物質とBという物質の比で取っています。

このポイントは、同じエフェクトで点をプロットするんです。だからEC50だったらEC50、EC10だったらEC10でプロットしたときに、そのプロットの線を引いてみたら、EC10の線を引いてみたら直線になるか曲線になるかで、相乗なのか相加なのかを見るというやり方です。

2種の組合せ：除草剤2種による等効果線法試験

■目的

- 田面水中からの検出濃度の高い除草剤にプレチラクロールとジメタメトリンがある。
- プレチラクロール（PTC）：超長鎖脂肪酸合成阻害
- ジメタメトリン（DMM）：光合成阻害
- この2種を混合して藻類生長阻害試験に供し等効果線法を用いて評価する。



■方法

- OECD TG201藻類生長阻害試験
- プレチラクロールを背景物質として、ジメタメトリンのEC50を算出する。プレチラクロール単独のEC50も算出する。
- 各EC50を単独ばく露時のEC50で割ったEC50比で散布図を作成する

背景物質 PTC (ppb)	主物質DMM (ppb)		
0	3	6	12
0.5	3	6	12
1.5	3	6	12
2.5	3	6	12
3.5	3	6	12
PTC (ppb)	2	4	8

実験計画ですけれど、まずプレチラクロールとジメタメトリンを選んだのですが、これはそれぞれmode of actionは違うことになっています。ですから、本当はConcentration additionじゃなくてIndependent actionじゃないかと言われたらそうかもしれないと思うんですけども、確かにそのとおりなんですけど、一応直線で横軸で濃度を見て、Concentration additionのようなグラフに変えて作ってはいます。