

等効果線法による試験結果

各PTCにおけるDMMの生長阻害曲線

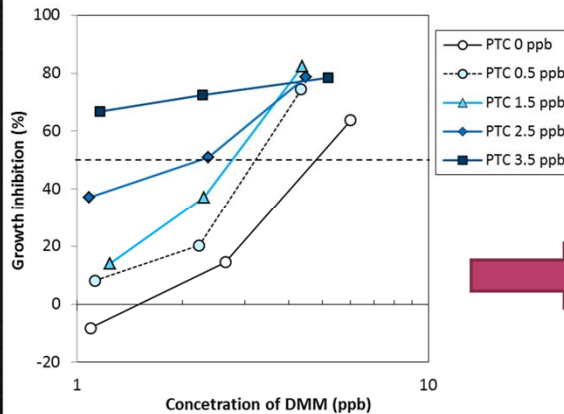


図1 背景物質プレチラクロールPTCによる主物質ジメタメトリンDMMの濃度-生長阻害曲線の変化

等効果線法図

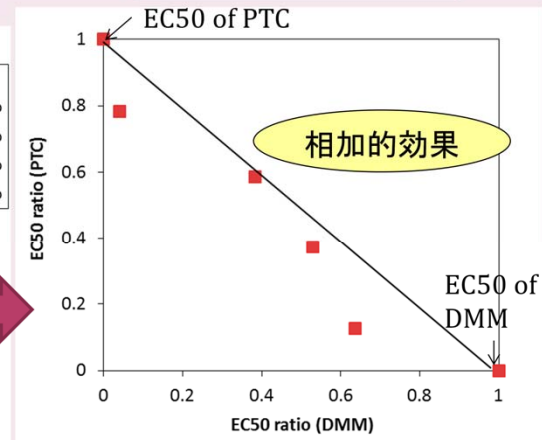


図2 PTCとDMMの等効果線図 (X軸：各背景濃度におけるDMMのEC50/DMM単独のEC50、Y軸：PTC背景濃度/PTC単独のEC50)

プレチラクロールPTCとジメタメトリンDMMは相加的効果を示した

ここがジメタメトリンを主物質として、背景物質のほうをプレチラクロールにして、モードを振って。だから、主物質を、3、6、12ppbに固定しておいて、こちらのもう一つの物質のほうの濃度を振って、点がどこに位置するかをプロットして行って、同じエフェクトの点を結んでいたということです。

EC50で散布図を作ります。そうするとこのようになりまして、右のグラフを見ていただければ分かります。これは先程大嶋先生も同じようなグラフを出していらっしやいましたけれども、プレチラクロールだけだと、EC50の濃度を1としまして、ジメタメトリンのECエフェクトを示す濃度を1としてこちらの点を振りまして、それぞれの希釈が何対何という点を打って行ってプロットしてEC50の点をプロットしてきます。そうすると、ほぼいいですか、目を細めて見ていかなければいけないんですけども、真ん中に寄ってきているので、これはおそらく相加と考えていいのではないかという結論が得られたんです。

等効果線法による試験結果

藻類の遅延発光（光合成系）を検出する藻類発光阻害試験（浜松ホトニクス）では相乗的効果を示した。⇒エンドポイントとMOAの違いが影響？

藻類生長阻害試験 (OECD TG201)

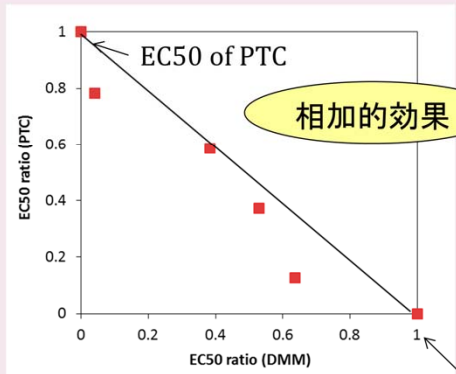


図1 PTCとDMMの等効果線図
(X軸：各背景濃度におけるDMMのEC50/DMM単独のEC50、Y軸：PTC背景濃度/PTC単独のEC50)

藻類微弱発光試験 (浜松ホトニクス)

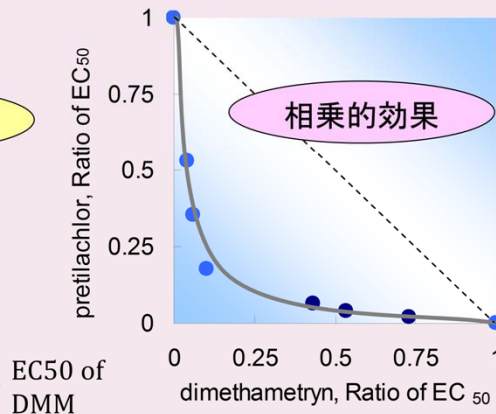


図2 PTCとDMMの等効果線図
(Takeuchi *et al.*, 2012, SETAC AP 2012 conference, Poster A-0448, cited with their permission)

このときの試験方法は、OECDのテストガイドラインの201番という、普通の化審法で使われている藻類の増殖試験の成長スピードで見る試験を使って試験しております。

それで、これで済めば良かったんですけども、実は面白いことが分かりまして、こっちがわれわれが出したデータなんですけれども、実は浜松ホトニクスさんのほうで開発した藻類の微弱発光試験というのがありまして、それで同じように2種類の農薬を混ぜて試験をしていただきました。そうするとどのようだったかという、このように、相乗効果を示したんです。ですから、詳しいことはこれから検討中でまだよく分からないのなんですけれども、われわれの考えでは、こちらはどちらかという *in vivo* の試験、こちらは24時間以内で分かるので *in vitro* っぽい試験なんですね。

つまり、メカニズムベースで考えられるのがこちらの試験、エフェクトベースがこちらだと私は思っているのですが。そういうふうに、メカニズムで見ると多分まだ相乗的に効くということは有り得ると思うんです。ところが生物本体で見るとフィードバックがかかったり、時間的な相殺みたいなことが起こって実はよく見えていないというのが現状かなと気がします。

ですけれども世の中に、相乗的にこんなきれいなアイソボリックカーブが描けたというのは、私は初めてだったので、ちょっと感動してこのようにお見せするんです。世の中には、ちゃんとあるんだなということです。僕もびっくりしたことです。あまり詳しい突っ込みはやると分からないことだらけなんですけれども、まだ研究中です。

3種以上の組合せ①：農薬製剤中の有効成分

■目的

- 農薬製剤中には複数の農薬有効成分が含まれる。
- 製剤中の有効成分を成分比で複合ばく露した場合の複合影響CA法またはIA法による予測と合うか？

■方法

- 藻類、ミジンコ、魚類の短期慢性影響試験を用いて各有効成分の毒性データを集積
- 製剤中有効成分を農薬製剤成分比で混合してばく露
- 各有効成分の毒性から、CA法およびIA法を用いて**混合ばく露時の毒性を予測** (Backhaus *et al.*, 2000, Aquatic toxicology)

18

次、3種類以上の組合せでやりました。農薬の製剤中の有効成分でやってみました。というのは、農薬製剤中というのは、市販でどこでも売っている農薬の中に入っている成分表がありますよね。何々が何パーセントと書いてありますから、そのパーセントに合わせて農薬をミックスして、そのミックスした農薬で暴露試験をしてみたというやり方です。そのときの結果がCAモデルで合うのか、それともIAモデルで合うのかということをやってみました。

方法は、いわゆる3種類の生物試験を使ってやっています。化審法とちょっと違うのは、これはWET寄りの試験法になっていまして、それぞれ藻類は化審法と同じ試験ですけれども、ニセネコゼミジンコという、だいたい1週間くらいで繁殖試験ができるもの。あとは、ゼブラフィッシュの卵のふ化、成長を見る試験というふうに、化審法とはちょっと違いますけれども、生態影響を見るには十分な試験法だと考えて、これを選んでやっています。

藻類・ミジンコ・魚類の短期慢性影響試験

試験名（出典）	藻類生長阻害試験 (OECD TG201)	ミジンコ繁殖試験 (Environment Canada EPS1/RM/21)	魚類胚・仔魚期毒性試験 (OECD TG212)
試験生物	ムレミカツキモ (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>) 	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>) 	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>) 
エンドポイント	生長速度	産仔数、生存率	生存指標=ふ化率×ふ化後生存率
試験期間	72時間	6-8日間	9日間
供試生物の齢	2-4日前培養した指数増殖期の細胞	生後24時間以内の幼体	受精後4時間以内の受精卵
生物数/容器 (繰り返し数)	5000 cells/mL (対照区: n=3, ばく露区: n=6)	1個体 (n=10)	20個体 (n=4)
試験用水	OECD標準培地	活性炭ろ過水道水	活性炭ろ過水道水

結果ですけれども、ある除草剤、製品の名前は伏せてありますけれども、入っている成分がエスプロカルブ、プレチラクロール、ジメタメリン、ピラゾスルフロンメチルというのが入っていて、この成分含有率というのが15パーセント、4.5パーセント、0.6、0.3、それ以外のものは安定剤だか分散剤だかが入っているので、その分は、それも含めると話がごっちゃになるので、今回は除草剤だけを組み合わせるので、その製剤だけを、この混合比で混ぜてモデル試薬を作っています

除草剤製剤Aの有効成分とその毒性

有効成分	エスプロカルブ	プレチラクロール	ジメタメトリン	ピラゾスルフロンメチル	
作用機序	脂質合成阻害 (非ACCase阻害)	超長鎖脂肪酸合成阻害	光合成阻害	アセト乳酸合成酵素阻害	
含有率(w/w)	15%	4.5%	0.6%	0.3%	
NOEC (ppb)	Alga	21	1.0	5.0	0.47
	Daphnid	270	1250	630	9,580
	Fish	370	1500	2500	>19,900
TU= 含有率/NOEC	Alga	0.72 (12%)	4.50 (75%)	0.12 (2%)	0.64 (11%)
	Daphnid	0.056 (92%)	0.004 (6%)	0.001 (2%)	0.000 (0%)
	Fish	0.041 (93%)	0.003 (7%)	0.0002 (1%)	No effect (0%)

例えば製剤1 mg/Lに相当する、エスプロカルブ150 ppb、プレチラクロール45 ppb、ジメタメトリン6 ppb、ピラゾスルフロンメチル3 ppbになるように混合して短期慢性影響試験に供する。
20

例えば、製剤1ミリグラムに相当するエスプロカルブ150ppb、プレチラクロール45ppb、ジメタメトリン6ppb、ピラゾスルフロンメチル3ppbになるように混合して、さっき言った3つの短期毒性試験というのを実施しました。

結果ですけれども、NOECとTUという2種類のエンドポイントの出し方をしていますけれども、TUで見えていただくと、TUというのはToxicity Unitなので、数字が大きいほうが、毒性が大きいと考えてください。そうした場合に、プレチラクロールは、藻類に効きます。実はこれは除草剤のくせに、くせにという言い方は失礼ですけれども、必ずしも藻類だけに効くわけではなく、エスプロカルブというのはミジンコと魚にも多少効きます。藻類には、そこそこ効いているんですけれども、こちらに効くというのが特徴的に表れています。それでもたいした程度ではないです。

除草剤製剤Bにおける有効成分とその毒性

有効成分	プレチラクロー ル	ピリフタリド	ベンスルフロン メチル	
作用機序	超長鎖脂肪酸 合成阻害	アセト乳酸合成酵 素阻害	アセト乳酸合成 酵素阻害	
含有率(w/w)	1.8%	1.8%	0.51%	
NOEC (ppb)	Alga	1.0	19	5.0
	Daphnid	1,250	>1,070	3,420
	Fish	1,500	316	>56,400
TU= 含有率 /NOEC	Alga	1.80 (90%)	0.10 (5%)	0.10 (5%)
	Daphnid	0.001 (92%)	No effect (0%)	0.0001 (9%)
	Fish	0.001 (17%)	0.006 (83%)	No effect (0%)

例えば製剤1 mg/Lに相当する、エスプロカルブ18 ppb、ピリフタリド18 ppb、ベンスルフロンメチル5.1 ppbになるように混合して、短期慢性影響試験に供する。

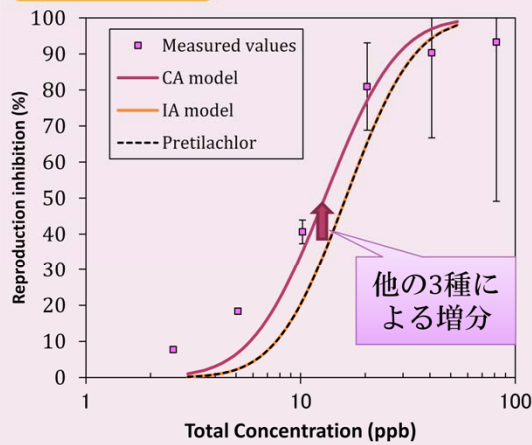
21

これは、割合でいくと75パーセントがほとんどプレチラクロールで説明できて、そのときにエスプロカルブとピラゾスルフロンメチルで10パーセントずつくらい、お互いに寄与しているんじゃないかというふうに考えられます。

次に、除草剤Bという、今度は組み合わせが違う除草剤でやってみました。やり方は全部同じにして、プレチラクロールとピリフタリドとベンスルフロンメチルなんですけれども、成分比が1.8、1.8、0.51で、結果としては藻類に影響があったのがプレチラクロールで90パーセント説明が付く。ダフニアは、ここのプレチラクロールの毒性がない一番強い。これが、説明が付く。フィッシュは、ほとんど弱いんですけれども、ピリフタリドで一応影響があったとなる。

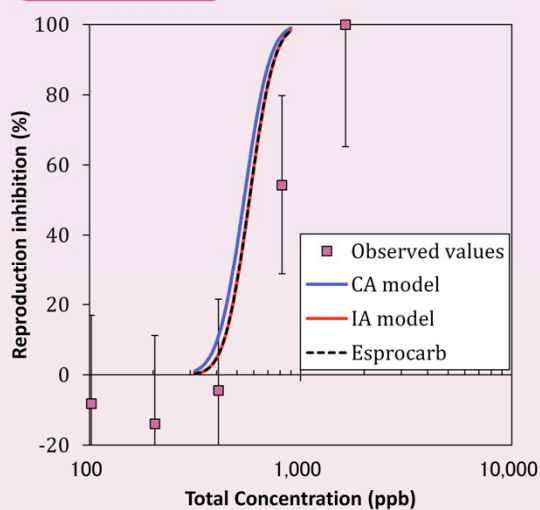
製剤A中の有効成分による複合ばく露試験結果

藻類



CAモデルの予測と実測が一致。プレチラクロール（+他の3種による相加作用）により説明できる。

ミジンコ



CAモデルとIAモデルが一致。実測値もほぼエスプロカルブにより説明できる。

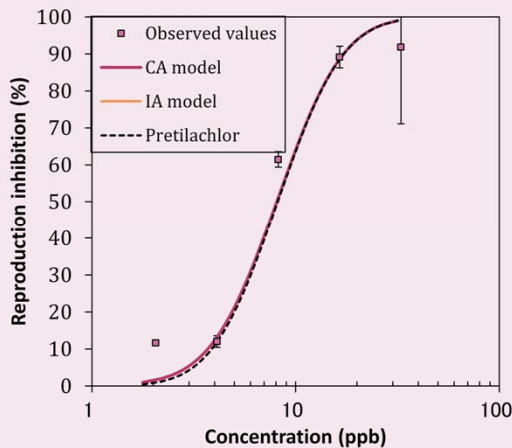
魚にほとんど影響がなかったため、藻類とミジンコについてCAモデルとIAモデルを計算してみました。これは除草剤A、製剤Aの場合なんですけれども、まず、藻類についてはこのようになりまして、四角いボックスに入っているのが実際のミクスチャーでやったときの、ミクスチャーを1つの化学物質と考えたときの毒性試験の結果で、エラー幅が、このように付いています。

青がCAモデル、赤がIAモデルで計算した場合で、ほとんど合っちゃうんです。これが、実はプレチラクロールだけ、今ちょっと一瞬見えました、黒くなりましたけれども、プレチラクロールだけがIAモデルとほとんど一致する。つまり、先ほど言われたようにIAモデルというのは最初の原因というのをバサッと取ってしまって、それで死ななかったものの中の何割か違うのが死ぬといったときに、プレチラクロールだけで96パーセントぐらいもう取ってしまってるので、プレチラクロールで説明がついているというのが現状なんです。ですから、この場合にはどちらかというと、プレチラクロールだけのメインが効いていて、この分、微妙な差です。「お前のところは、試験の精度が正しいのか」と言われたら、そこは引っかけられますけれども、微妙な差が他の3成分では補われていてConcentration additionをしたときに、実測値とほぼ合うという結論になっているというのが、こちらの状況です。

ミジンコのほうの影響は、ミジンコ自身に対する影響がそんなに強くはないので、一応こっちのほうも、実際の測定値が四角いプロットで、CAモデルとIAモデルはほとんど一致しています。エスプロカルブが、一番毒性が強いんですけども、これも重なっています。これで見ると、CAモデルもIAモデルもほとんど変わらなくて、エスプロカルブだけが効いているので、どちらの計算でも同じになるというだけのことです。

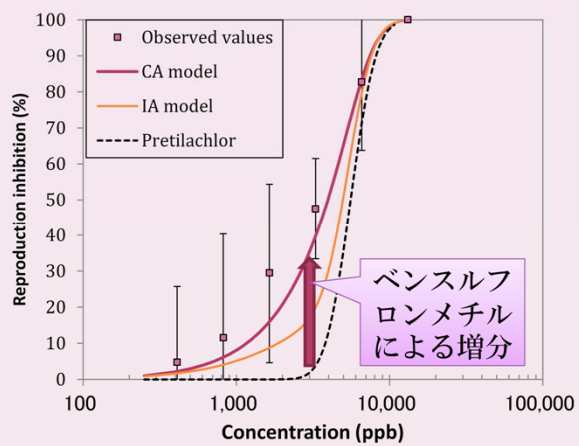
製剤B中の有効成分による複合ばく露試験結果

藻類



CAモデルとIAモデルが一致。実測値もほぼプレチラクロールにより説明できる。

ミジンコ



CAモデルの予測と実測が一致。プレチラクロール（+ベンスルフロンメチルによる相加作用）によって説明できる。

次に、製剤Bのほうを見てみます。これも同じような結論なんですけれども、実測値とCAモデル、IAモデルが重なっています。こちらのほうは、ミジンコのほうがちょっとずれていますけれども、CAモデルの予測と実測モデルが一致しています。つまり、青いラインと実測の四角いエラーバーが付いているラインが、まあまあ、ほぼ一致しています。

IAモデルとは、ちょっとずれています。これはベンスルフロンメチルが一番ミジンコに影響が強いんですけれども、それでも全体の70パーセントくらいでしたか。それで、その差分が存在しているなど。だからIAモデルじゃなくて、プレチラクロールが一番効いていて、この差分がベンスルフロンメチルで説明がつくんじゃないかと考えているわけです。これもどちらかというと加算で、加算で説明できるんです。

だから、その相乗的なものは、今農薬の除草剤の2種類の製剤から考えたときに、相乗効果みたいなものは考えなくてもよくて、CAモデルかIAモデル、どちらでもそこそこの値が出て、CAモデルのほうが若干近いという結論になっています。

3種以上の組合せ②:排水基準の金属混合液

■目的

- 排水基準には複数の金属類が含まれる。
- ワーストケースとして、各金属類が排水基準値で存在するときの複合影響はどうか？
- 実際の混合溶液の毒性とCA法やIA法による予測は合うのか？

■方法

- ミジンコ (C. dubia) 繁殖試験を用いて各金属類のデータを集積
- 日本の排水基準に基づいて、混合溶液を作製し、試験に供する→基準値で成分比を固定
- 各金属類の毒性から混合ばく露時の毒性を予測

24

これは、試しに私がいろいろやってみたんですけども、3種類以上の組み合わせの場合の排水基準の金属混合液というのは、きっかけとしては金属が取り組みやすいので、分析もしやすいですから、金属でミックスチャーを作ろうとしたときに、環境中の金属の実測値ってあちこち調べても同じなので、同じというかたくさん種類があるのでどれを標準としていいか分かりません。

ミジンコ繁殖試験の個別の結果

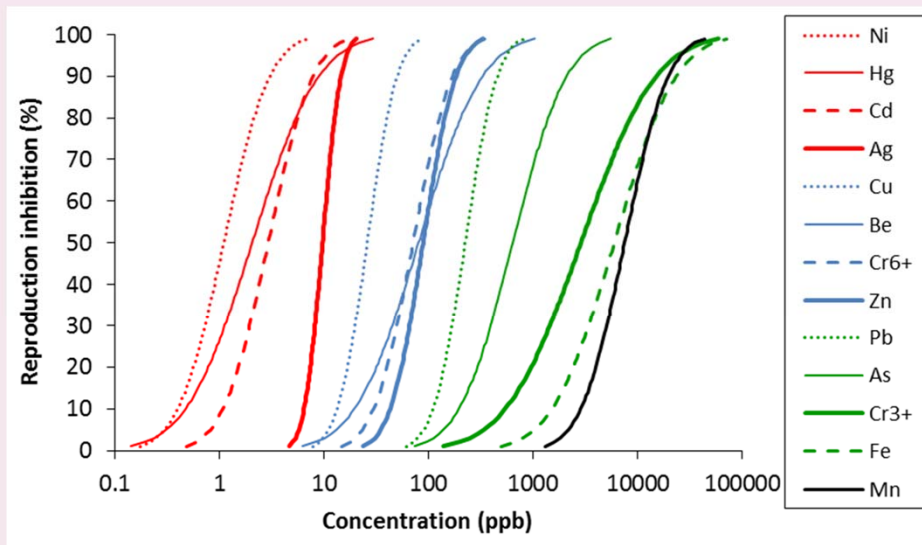
Unit	排水基準値mg/L	繁殖EC50値 $\mu\text{g/L}$
カドミウム及びその化合物	0.1	3.00
鉛及びその化合物	0.1	226
六価クロム化合物	0.5	73.1
水銀化合物	0.005	1.76
アルキル水銀化合物	検出されないこと	
銅含有量	3	26.8
亜鉛含有量	2	93.3
溶解性マンガン含有量	10	8070
クロム含有量	2	3350
砒素及びその化合物	0.1	750
溶解性鉄含有量	10	6270

主に硝酸塩 (Hg、Cr³⁺は塩化物塩、Cr⁶⁺はカリウム塩)

25

それで考えついたのが、今、日本の場合10種類の金属が排水の基準項目に入っているんですけども、これがその数値なんですけれども、この最悪シナリオ。これ以上あってはいけないんですけども、逆にこれはあってもいい、これだけ含まれていても別に問題はないので、排水基準を満たしている金属ミクスチャーを作って、その金属ミクスチャーで試験をしてみたら、何が起こるかなと。そのときに、IAモデルかCAモデルか、どちらか合うかなという試験をやってみました。

各金属の濃度-繁殖阻害曲線



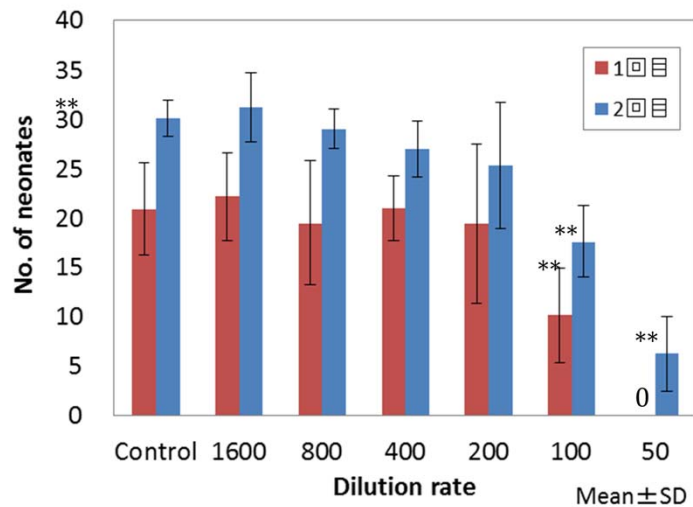
ppb	Ni	Hg	Cd	Ag	Cu	Be	Cr6+	Zn	Pb	As	Cr3+	Fe	Mn
EC25	0.64	0.94	1.72	7.75	18.2	37.9	44.7	60.1	153	340	1190	2890	4500
EC50	0.86	1.76	3.00	9.01	26.8	69.4	73.1	93.3	226	750	3350	6270	8070

26

この計算をするにあたってバックグラウンドデータが必要なんですけれども、これは学生さんがひたすらやったんですけれども、ミジンコの繁殖毒性試験、さっき言ったGERIのダフニアを使った試験で、すべての金属について毒性値を出してみました。こちらの左側に行くほど毒性が強くて、右側のほうが、毒性が弱い金属と考えてください。日本の環境基準では10種類の金属と言いましたが、ここには13種類載っています。何が増えているかというと、ニッケルと銀とベリリウムが入っています。なんでそんな余計なものを行ったと思われるかもしれませんが、実は中国の排水基準にはその3つが入っているんです。

混合金属溶液の繁殖影響（産仔数）

日本の排水基準溶液



- 混合溶液を無影響にするには基準値の200倍希釈
- 毒性への寄与が大きい金属
Cu, Cd, Zn

27

日本の場合には、一番毒性の強い、さっき言ったニッケルとか銀とかベリリウムというのは排水基準に入っていないので、今回は除いています。足したらどうなるかというのを素直にやってみました。つまり足したらどうなるかというのは、この量が入っていたとするとどうなるかというところの、計算値はもとのEC50を出しましたからEC50とこれを合わせて、CAモデルとIAモデルを組み込んで計算してみました。そうするとどうなるか。

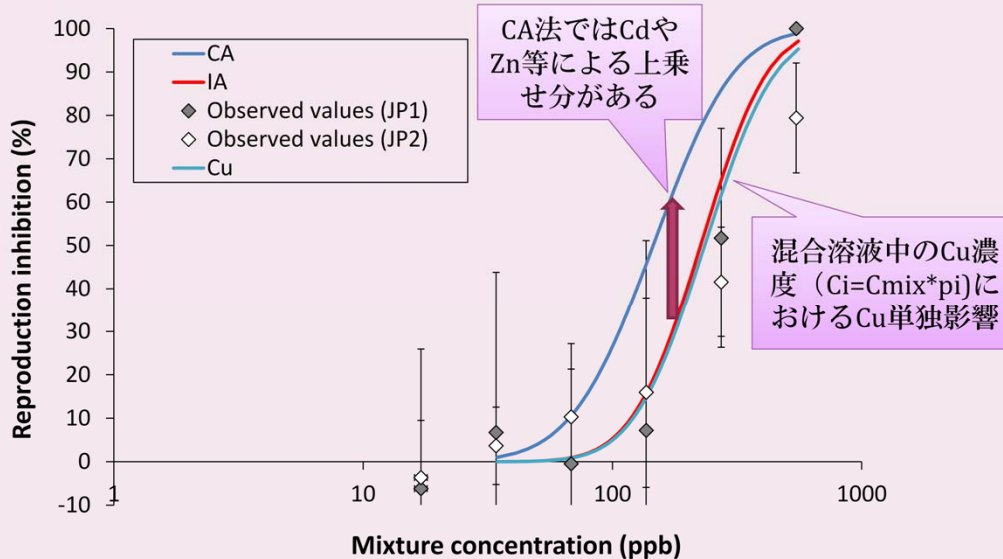
その前に、まずミクスチャーは試験をしたデータが必要なので、ミクスチャーでやってみたんですけども、2回試験をやりまして、コントロールでの算出が20匹と30匹ではかなり差があったんですけども、NOECとLOEC、EC50の値もほとんど1回目と2回目で変わらなかったなので、2つの試験を採用しています。

ミジンコ	試験	NOEC	EC50
繁殖毒性	1回目	200倍希釈	102倍希釈
	2回目	200倍希釈	93倍希釈

28

つまりNOECは200倍希釈というのはおかしな話ですけども、実はすごく濃いんです。つまり、日本の環境基準値を満たしているはずなのに、それはミジンコの繁殖にすごく影響があって、ミジンコの繁殖に影響がなくなるのでは、200倍に薄めないと排水基準では生物影響があったということが分かったので、それはそれで面白い話題なんですけども、それは今回話が違うので置いておきます。

CA法・IA法モデルと実測値の比較



- 混合溶液の実測値はIAモデルに近い
- 混合溶液中のCu濃度におけるCu単独影響は、ほぼIAによる混合溶液の予測影響に一致→Cuが支配的に作用、CdとZnの影響は相加されない²⁹

一応、200倍。EC50だと100倍くらい薄めないと、環境基準値を満たしていても、生物影響はあると考えてください。それでグラフを引きますとこのようになりまして、混合液中の、これはCAモデルとIAモデルと、これが実測です。1回目と2回目。黒四角と白四角にしていますけれども、だいたいこういうふうになりまして、これを見る限りIAモデルのほうに近いような印象を受けます。

けれど、今、銅というのを出してみたんですけれども、青で、赤と重なって見えにくいんですけども、実は銅の単独影響でほとんどIAモデルが説明できるというか、日本の排水基準の中の銅の濃度というのは、一番支配的に作用しているんだなというのが分かったんです。

IAモデルとCAモデルの差分、この部分がどうもカドミとか亜鉛で差分が補われていると。でも、実測値はどちらかというと銅で決まりかなという感じかなというふうになっております。ですから、CAモデルは若干安全側寄りに見積もってしまっているというのが、この場合の例です。つまり、実測値よりも高めにCAモデルは計算してしまっているのが分かると思います。

まとめと今後の課題

- 検出頻度の高いプレチラクロールとジメタメトリンの組み合わせは相加的効果を示した。
→ 等効果線法による相互作用の検定と精度の検証、MOAを考慮かつ環境中でありうる他の組み合わせを試験。
- 除草剤製剤中の有効成分による複合ばく露時の影響は、CA（濃度加算作用）モデルによって予測できた。
→ 他の製剤中の組み合わせは？除草剤と殺虫剤など種類の異なる農薬の組み合わせは？
- 排水基準における金属類の複合ばく露時の影響は、IA（濃度加算作用）モデルによって予測できた。
→ 等濃度比やIC25比で混合した場合は？Cu, Cd, Znは本当に相加的に作用しないのか？（Cdに対するCu, Znは相殺作用があるとの報告あり、MOAとの関係は？）

実は私が言いたいのは、CAモデルとかIAモデルでどっちが合うかという議論がありませんけれども、もともとmode of actionが同じなのか違うのかとか、あとは、化学物質間で相互作用があるかないかという議論をした上じゃないとこのモデルは使えなくて、なかなか使用範囲は限られてくるのではないかと思います。だから、上流からの化学物質を組み合わせる規制に使うというのは、まだまだ難しい時点に立っているのではないかと思います。

かといってWETのような、ミクスチャーをやったときには、なかなか原因物質にたどるのも難しいので、上流側の規制と下流側の規制をうまく組み合わせていかないと、複合影響の問題は解決しないんじゃないかなというのが私の今までの印象です。

ご清聴ありがとうございました

31

時間になりましたので、以上で終わります。ご静聴、ありがとうございました。