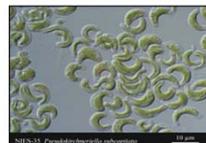


## 水生生物における化学物質の複合毒性 —相加・相乗・拮抗作用



大嶋 雄治

九州大学農学研究院

[yoshima@agr.kyushu-u.ac.jp](mailto:yoshima@agr.kyushu-u.ac.jp)

(チリもつもれば山となるのか?)

きょうお話するのは、ここに書いてありますように、ちりも積もれば山となるのかというのが、一番の皆さんのご関心ではないかと私は思います。先日来雪が降りましたけれど、雪のように降って、消えてなくなればいいんですけども、ちりというかほこりというか、皆さんが使っていた、人間が自分のために使った化学物質ですが、その残渣というか、そういうものがあるわけです。それがだんだんたまって、今まであまり真面目に考えてこなかったというのが本当じゃないかなと思います。でも、だんだんたまと一体どうなるかということ、きちんと考えなければいけない。ずっと前から、私はこれは考えなければいけないのではないかのいうふうに思っていたんです。

## 複合毒性はあるのか？

毒性のない(単独低濃度で毒性が観察されない)  
ものが  
複合曝露では  
毒性があるのか？

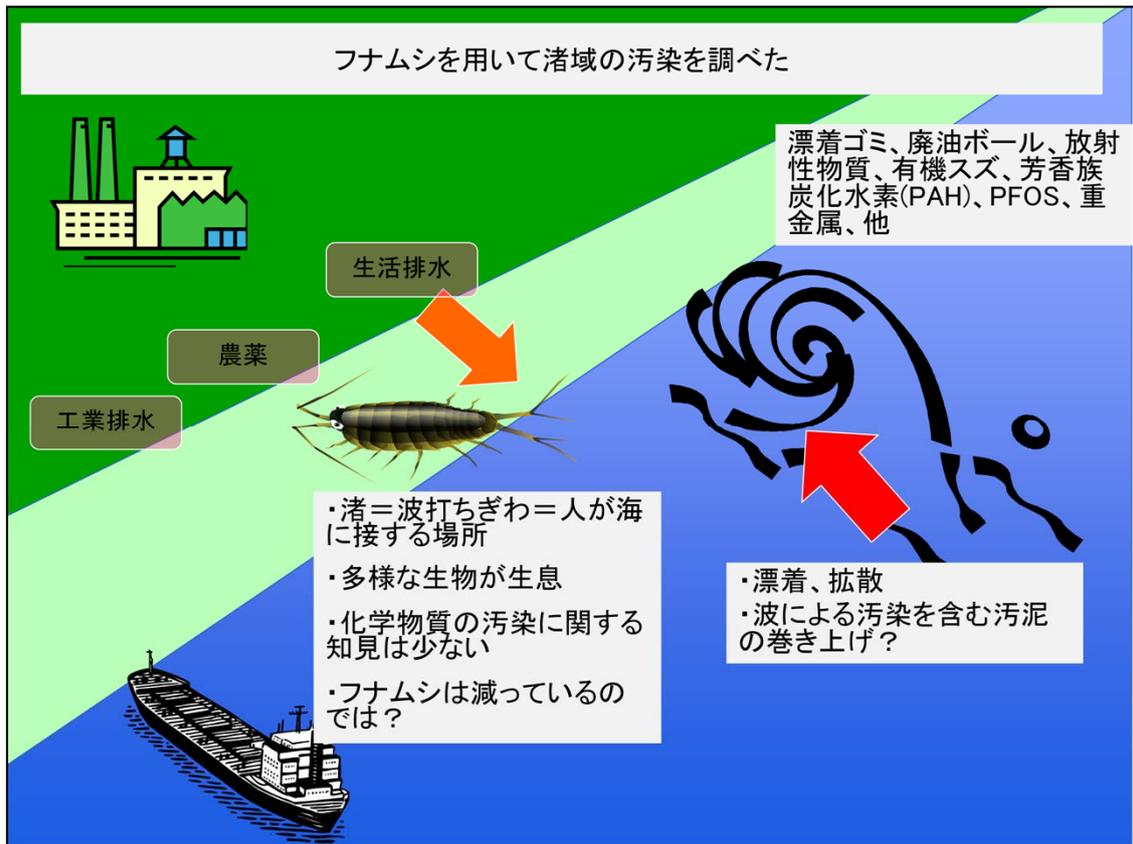
→メダカ、ミジンコ、藻類で検証

なぜ単独低濃度で毒性が出ないのか？

→血清タンパク質結合による毒性低減機構

ですから、毒性のないものが、ないという言い方はいろいろと問題がありますが、今まで単独で、ある程度の低濃度では毒性がないという部分があるというふうに言われていたわけです。そういうものが、複合ではあるのかと。これを厳密に証明するのは、ではどこまで下げればいいのかというのは非常に難しいんです。ある程度の低濃度で複合すれば毒性があるのかというのを、まず、検証して行きました。それを、まずお話をしようと思います。

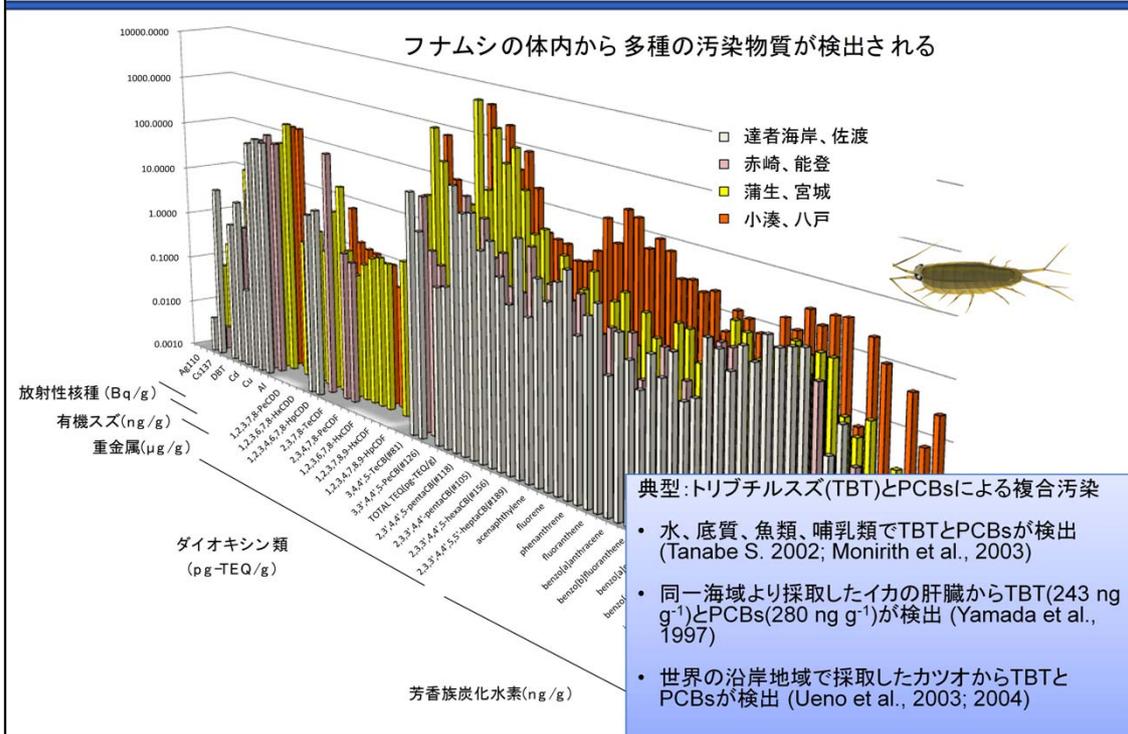
ちょっと古いデータもあるんですけども、この3種類でいろいろやりました。相加、相乗、それから拮抗もあるよということでもあります。ここは納得していただいた。そして、なぜ低濃度で単独のときは毒性が出ないのかと。逆に言うと、なぜ出ないのが、複合になると出てくるのかというのを、話をしたいと思います。



フナムシというのは皆さんご存知でしょうか。釣に行ったりする人は知っていますが、海岸にワサワサいる、最近話題になっている深海にいるオオグソクムシとかいうものの仲間です。彼らは深海から海まで出て、非常に変わったものをしてしていますが、このフナムシというのは実はコスモポリタンで、世界中の海にいまして、なぎさ域にいるんですね。

なぎさ域に私が注目したのは、いろんな陸から流れてくる場所でもあるし、逆に言うと、海側から漂着物が結構上がってくる。いわゆる、最近非常に問題になっている漂着ゴミ、それとか廃油ボール、それとか、ちょっと放射能も検出されました。

# 渚の低濃度複合汚染？



それと、特に海の超表層というのは、疎水性の高い物質が結構たまっておりまして、それが吹き寄せられて結構濃度が高くなるのではないかと前から思っておりました。ですから、そういう吹き寄せられるような場所に生息されるフナムシというのが、一つのモニタリングになるのではないかと。それと、このフナムシというのは最近結構数が減っているのではないかと考えています。

いろいろ研究をやっているのですが、その一つとして、モニタリングでいろいろなものを測ってもらいました。少し放射能も出てきましたし、有機スズです。重金属、これはもともとあるものもちろんです。語弊がないように言っておきますが、重金属はもともとある程度あります。それとダイオキシン類です。それと芳香族炭化水素。もっと測れば多分いろいろでてきますが、ざっとこういうふうのものやっただけでも、私なりのデータで、汚染はマルチプルだよということが言えるかなというふうに思います。

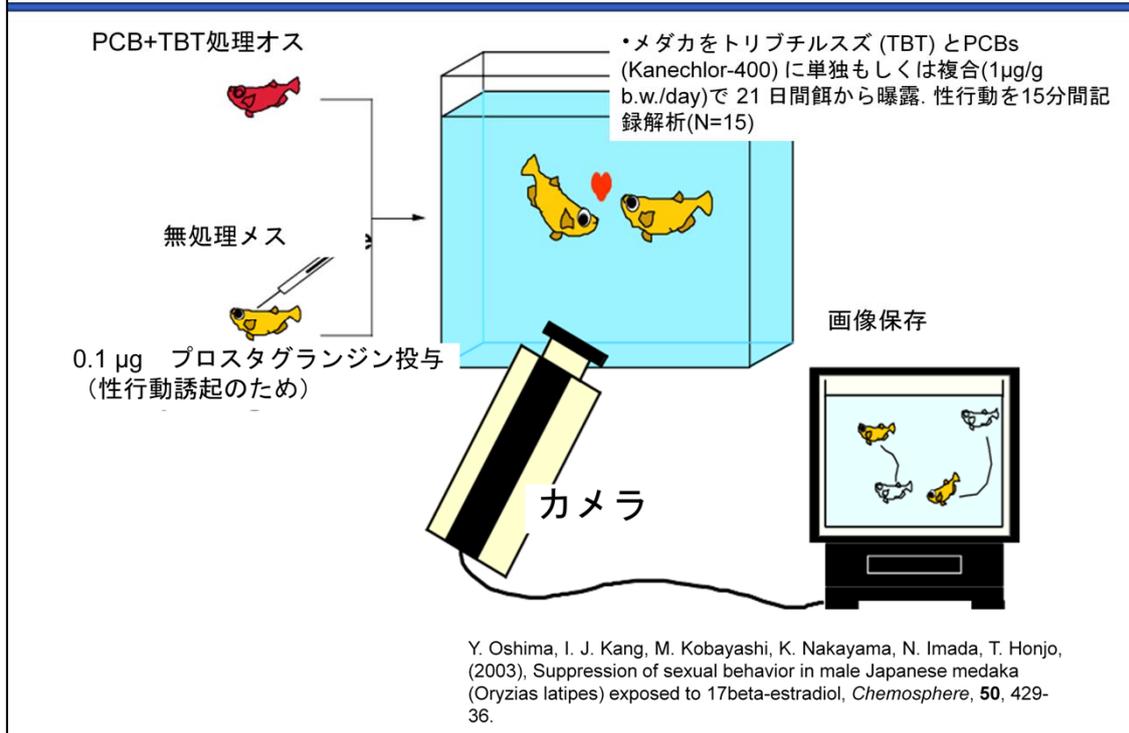
特に、もう排出されてしまったというか、今でも少し使われている可能性があるのですが、このトリブチルスズとPCBですね。

## メダカをつかった複合曝露実験(PCB+TBT)



これは前からやっているのですが、汚染というのは非常に高濃度で、両方とも毒性が高いものですから、これがまず、どういうふうな複合影響があるかということ、まずそこから調べなさいというふうなことで大学のときに、学生のころに取り組み始めたのが一つです。

## TBT+PCBsに複合曝露したオスの性行動



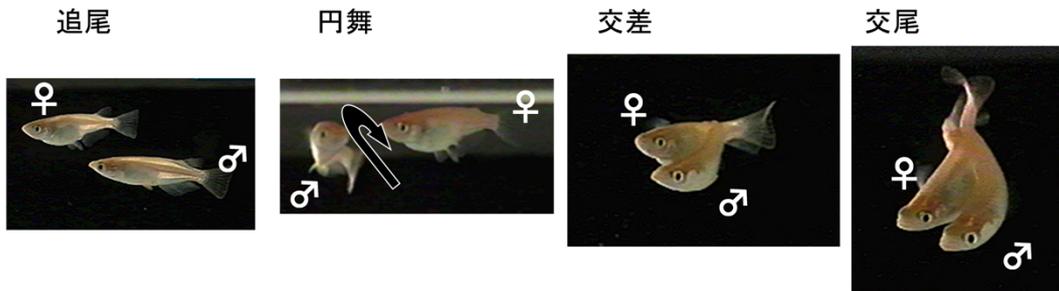
まずメダカを使って、今回はあまり難しいお話はしないでここうと思います。現象があったというお話ですが、まずは行動に影響するのかというふうなことをやりました。オスのメダカにTBTとPCBを処理しました。もちろん、全然死ぬような濃度ではありません。それに、性行動を誘起するようなフェロモンを投与したメスと合わせると、メダカは単純で、すぐに性行動を始められます。それを画像解析してやるということで、性行動への影響はどうかということをやっています。

TBT+PCBs複合暴露でオスの性行動が抑制された

処理	追尾	円舞	交差	交尾
Control	12	9	6	6
TBT	8	7	3	3
PCBs	11	8	7	6
TBT+PCBs	5**	2*	2	2

\*<0.05, \*\*<0.01

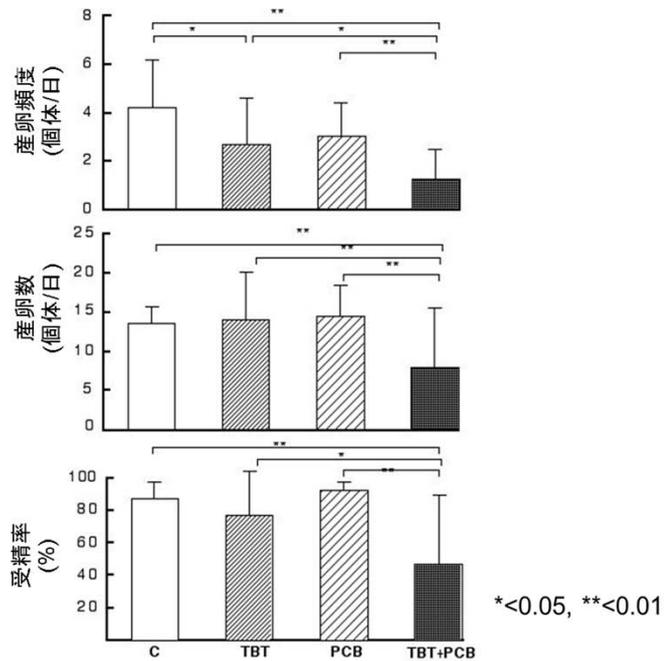
(Nakayama, et al., 2004)



メダカは、最初はメスを追いかけてって、メスの前でダンスをします。そしてクロッシングと言って交差をして、ここでスポーニング、卵が出てきたら精子をかけるという行動、一連の行動をやるわけです。これは単純そうですが、非常に脳神経系でコントロールされている一連の行動であります。この影響はどうかということなんですが、コントロール、TBT、PCB、そして複合処理をするということになりますと、統計的にも、複合処理したほうが明らかに大きく落ちてくるというふうなことが分かりまして、ちゃんと性行動が抑制をされる。繰り返し言いますが、死ぬような濃度ではありません。

TBT +PCBs複合曝露がメダカの産卵に及ぼす影響

メダカ産卵ペア(N= 12) にTBTと  
PCBs単独もしくは複合で曝露  
(1日あたり1 µg/g body weight  
3週間曝露)

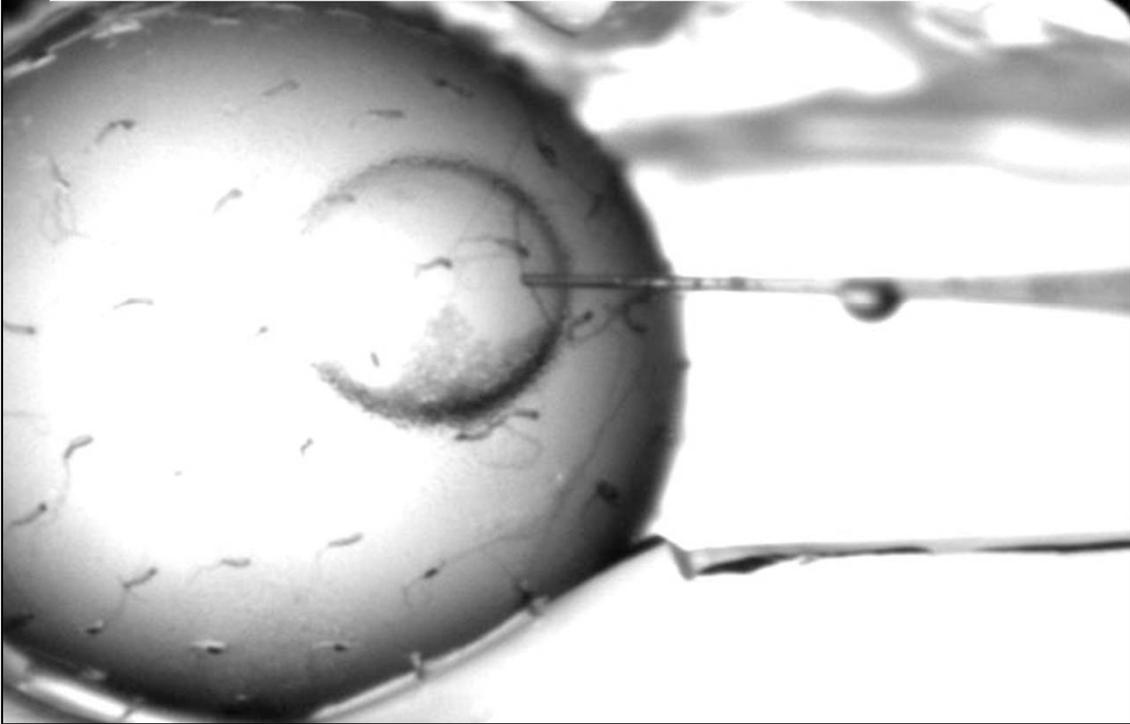


曝露により産卵頻度、産卵数、受精率が低下した

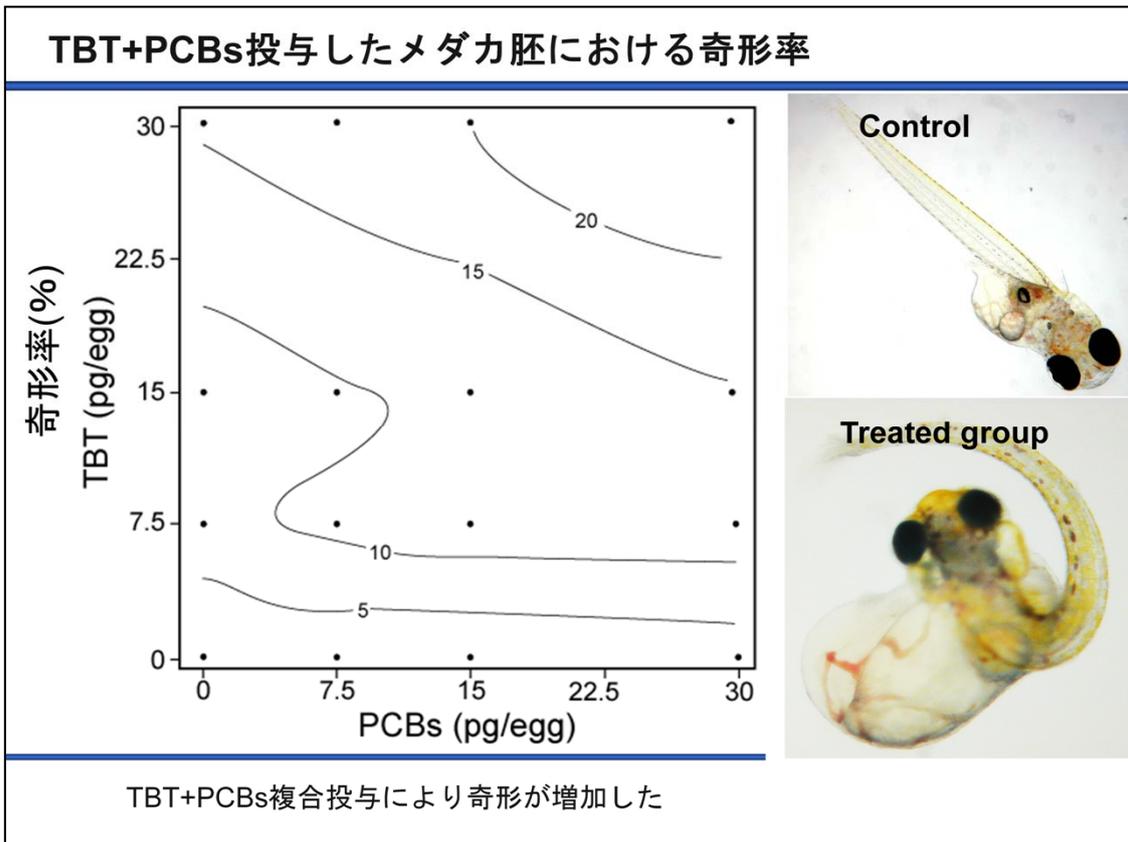
(Nirmala, et al., 1999)

性行動が抑制される。では、産卵はどうなのか。スポーニングはどうなのかということなんです。同じような投与量で、今度はメスにも投与しています。そしてコントロール、TBTだけ、PCBだけ、複合投与ということで、受精率、産卵数、産卵頻度ですね。先ほど性行動が下がりますので、そもそもオスの受精率が下がってきますし、メスの影響も出てくると思いますが、統計的に見ていただくと分かりますように、複合でやったほうが、非常に大きくダメージを受けるというふうなことが見えて取れるわけでありまして。

TBT and/or PCBs をメダカ胚に投与して発生への影響を調べた  
(TBT and/or PCBs (0, 7.5, 15, 30 ng/g-egg)).

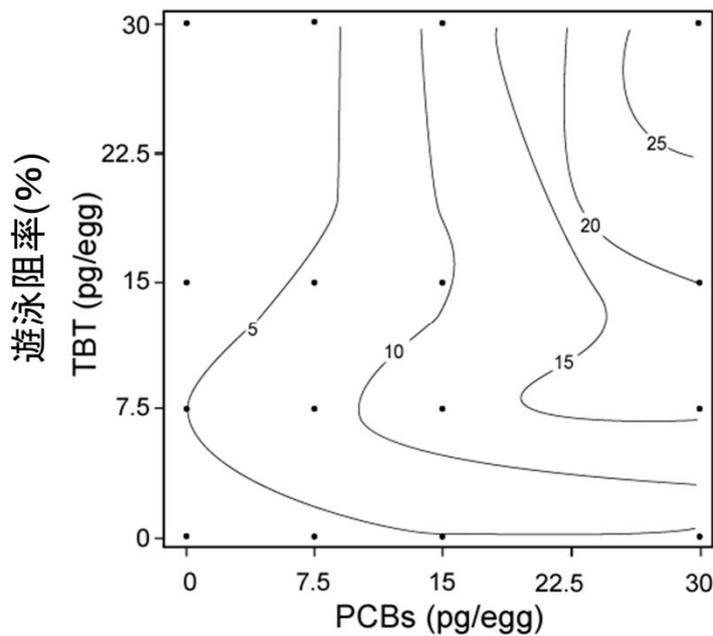


そうすると発生はどうなのかということで、これはメダカの卵です。エンブリオですね。エンブリオの胚はこの向かい側にあるのですが、ここが油球です。ですから、これが1ミリくらいですが、ここに針を突き刺しまして、この油球に化学物質を注入するという、私たちはナノインジェクションという方法をやっています。約0.5ナノリッターを、10パーセントくらいの誤差でわれわれは正確に打つ技術があります。



ここで、これを一つの毒性試験の試験管みたいなもので、エンブリオ1個1個で試験をやるということができます。そうすると、それを発生させますと、こういうふうな奇形が出てきます。骨曲がり为主ですが、後ででてきますが、骨の硬骨化が、非常に阻害されます。ですから、骨が曲がったり、顔が曲がったり、いろいろなのが出てきます。deformityを取りまして、これは等高図と思ってください。ここが高くて、ここが低くて、これが高さみたいなものです。PCBの濃度とTBTの濃度を振っています。PCBだけがここです。PCBだけを振ると、ほとんど5パーセント以下くらいの奇形率しかありません。TBTだけを振ると、高くなると少し出てきますが、あまりそう大きくはありませんが、コンビネーション、例えば7.5と7.5だったら、10パーセントぐらい。22.5と22.5、このくらいだったら15パーセントくらいというふうが増えてくる。リグレーションもかけておりますけれども、こういうふうな作用があるということでありませう。

## TBT+PCBs投与したメダカ胚における遊泳開始阻害率

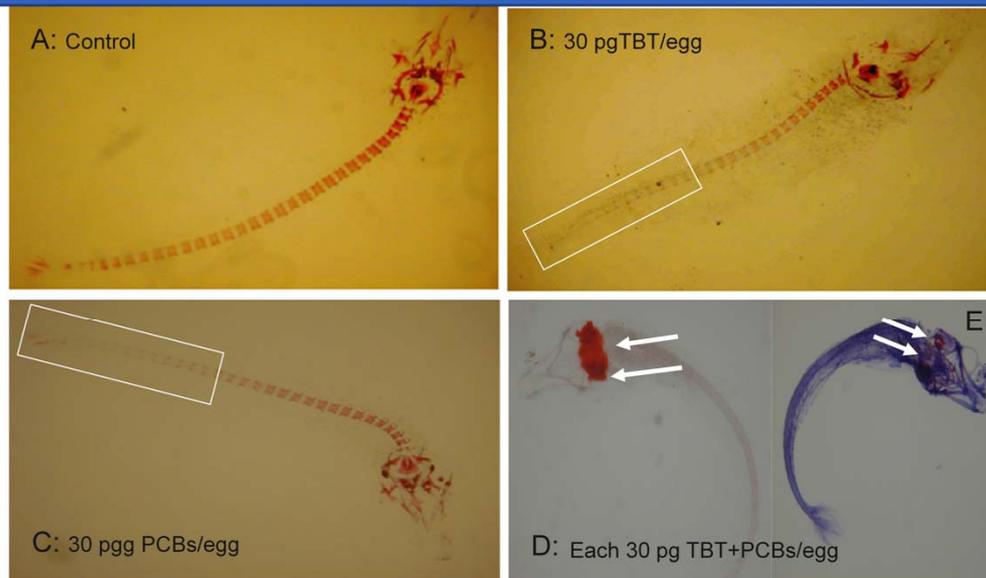


TBT+PCBs複合投与により遊泳阻害が増加した

これも同じです。骨が曲がってきますので、泳げないというものが同じように出てきます。繰り返しますが、単独でやるとあまり影響はないです。でも、TBTとPCBの複合になると、非常に高く出てきます。

この原因はということで、遺伝子解析もやっています。

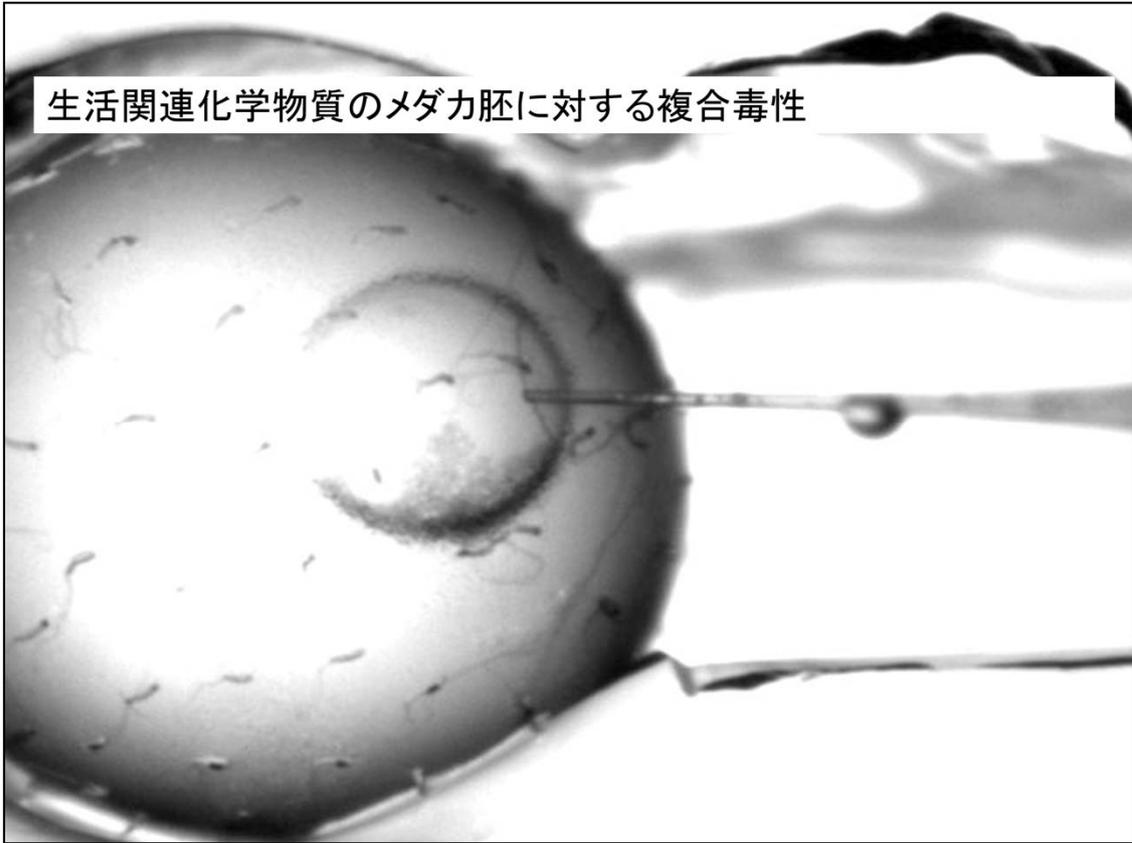
## 骨形成に及ぼすTBT and/or PCBsの影響



TBT+PCBs複合投与により脊椎骨の硬骨化が阻害された

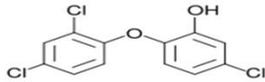
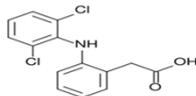
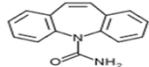
データ解析もやっていますが、なかなかこれという遺伝子まで突き止められていないのですが、これはコントロールです。骨を、硬骨化した骨を染めるとアリザリンレッドできれいに染まりますが、TBTでやると、かなり硬骨化が阻害される。TBTもかなり硬骨化を阻害します。PCBも、少し阻害をします。ですが、TBTとPCBが合わさると、ここを見ていただくと全く硬骨化していないんですね。硬骨化が強烈に阻害をされます。ここ、耳石だけが染まるんです。耳石は、骨の硬骨化の過程が違うと言われていまして、遺伝子発現でも少し見ているのですが、何らかの形で硬骨化が非常に強烈に阻害をされて奇形が起こる。そういうふうな影響が出るというふうなことが、お分かりになるかと思います。

## 生活関連化学物質のメダカ胚に対する複合毒性



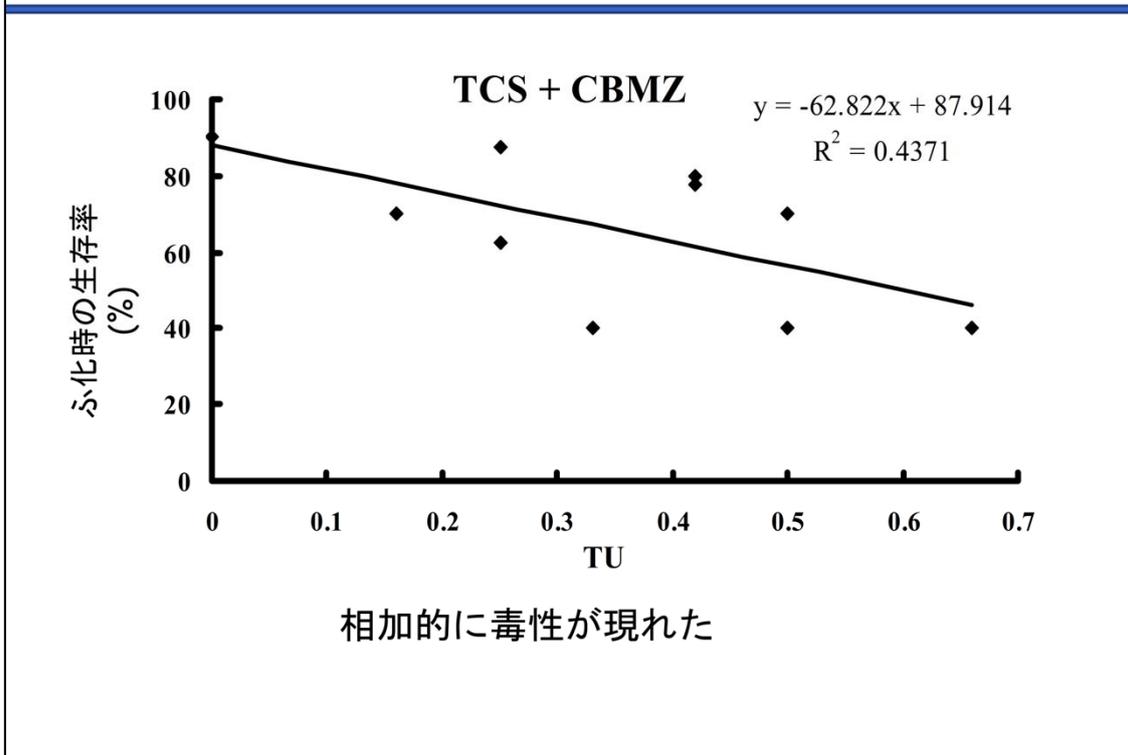
そういうことでPCBとTBT、2つ合わせるとかなり強烈に効くということです。また、これはちょっと蛇足みたいなデータですが、いわゆる生活関連化学物質、PPCPも、やってみました。ここに注入をする。

環境中から検出されている生活関連化学物質の例

PPCP	効果	化学式
トリクロサン ( TCS )	消毒剤、 抗菌・抗カビ剤	
ジクロフェナック ( DCF )	非ステロイド系 抗炎症剤	
カルバマゼピン ( CBMZ )	抗てんかん剤 鎮痛剤	

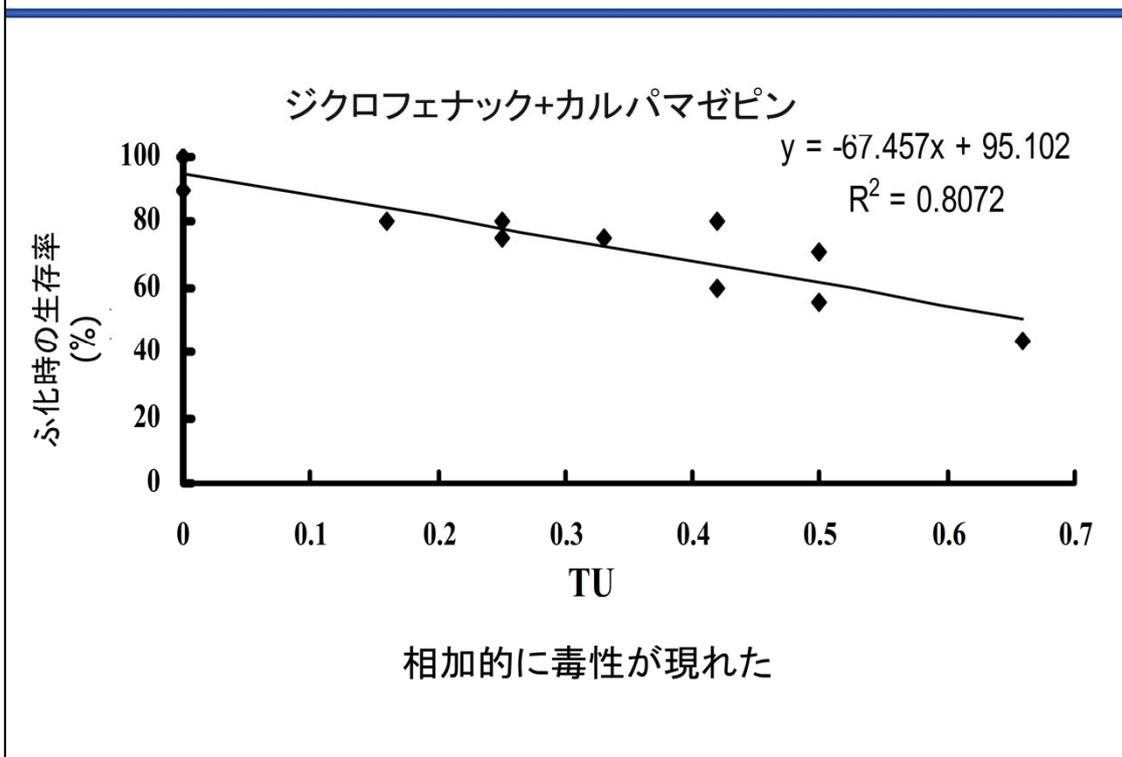
最近使用量はだいぶ減ったかとは思いますがけれどもトリクロサン、ジクロフェナック、カルバマゼピンですね。消毒剤、非ステロイド系の抗炎症剤、抗てんかん剤、いずれも環境中から結構出てきておりまして、これをミクスチャーで打つ。エンブリオの油球に直接打つということをしました。

## トリクロサン+カルパマゼピンがメダカ胚の生存に及ぼす影響



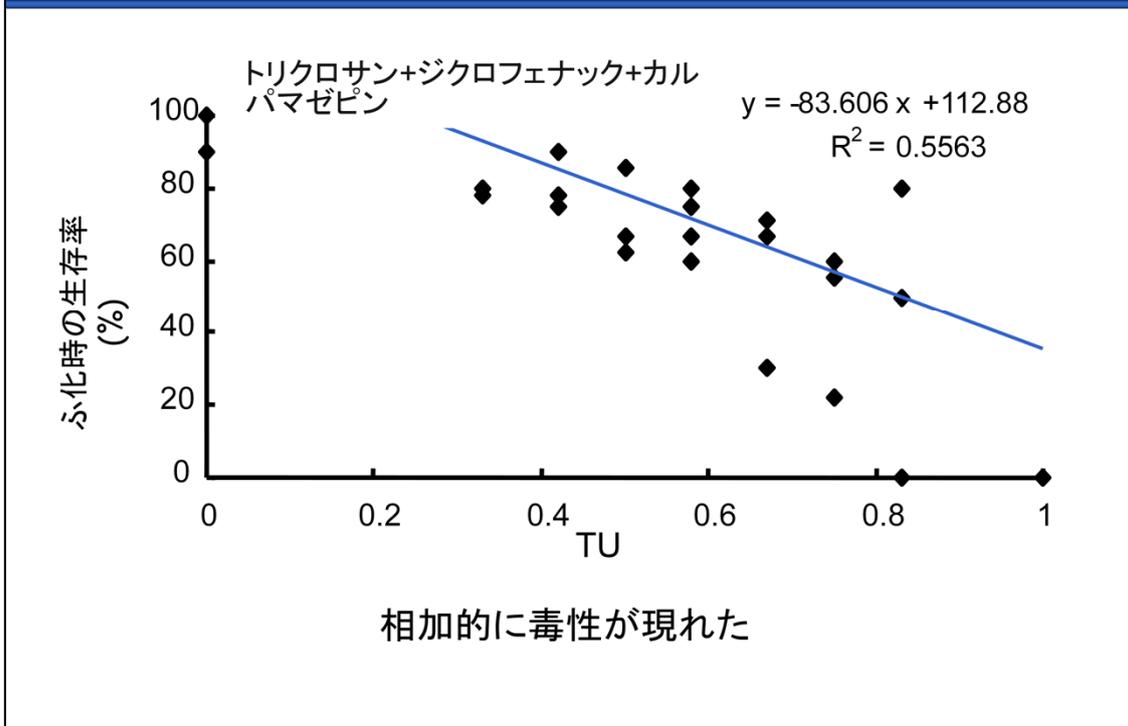
これはトリクロサンとカルパマゼピン、2つのミクスチャーで、細かくは振っていませんが、半数致死濃度のToxicity Unitを、これを足した値をこちらに取っております。だから0.5というのは2つを足して0.5TUですね。これは半数致死濃度の0.7の濃度です。そうすると、こういうふうないろいろな組み合わせでやるんですがデグレッション・ラインが引けまして、おそらくある程度相加的であるということが出てくると思います。

# ジクロフェナック+カルパマゼピンがメダカ胚の生存に及ぼす影響



これも、ジクロフェナックとカルパマゼピンを取っています。

トリクロサン+ジクロフェナック+カルパマゼピンがメダカ胚の生存に及ぼす影響

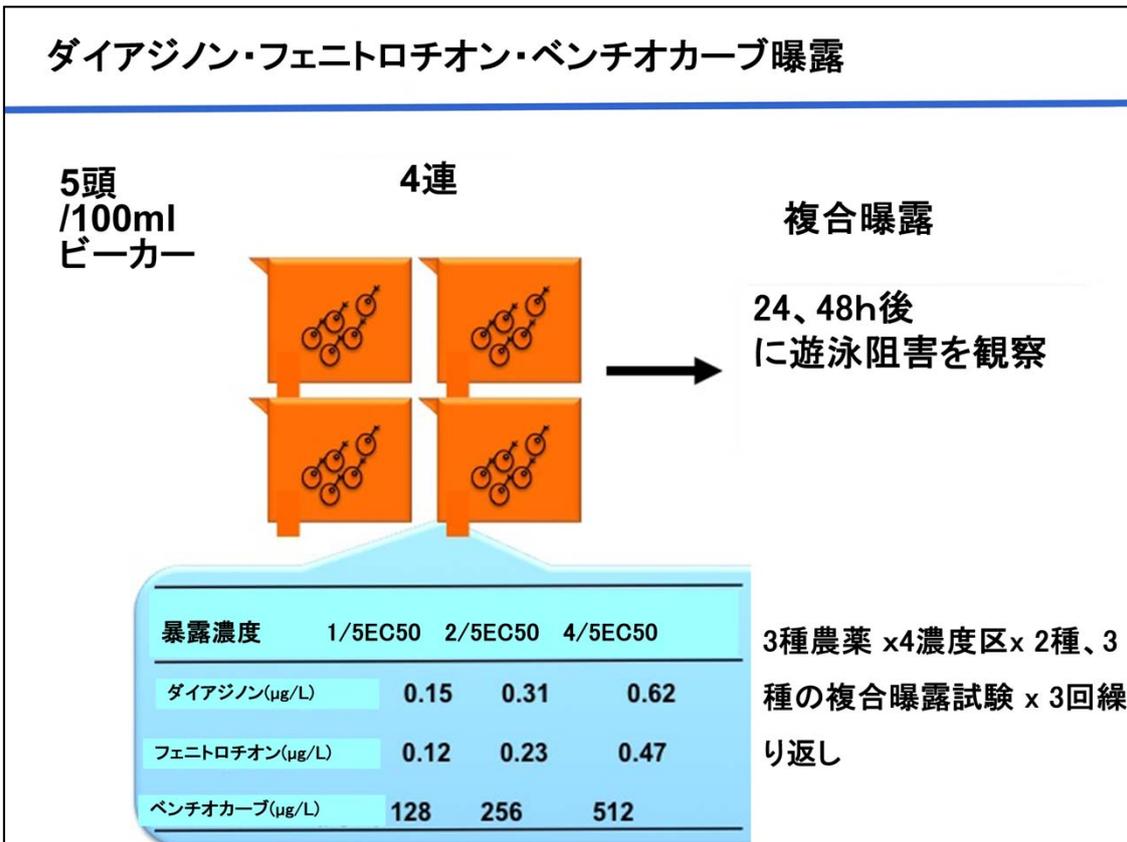


3つをやると、こういうふうに出てきます。これはモデルにきちんと載せていないのですが、もうちょっと追加してからやろうと思っていますけれども、こういうふうなPPCPでも、明らかな相加性というかが見える、ある程度の足し算が見えるということでもあります。

## ミジンコにおける3種農薬の複合毒性

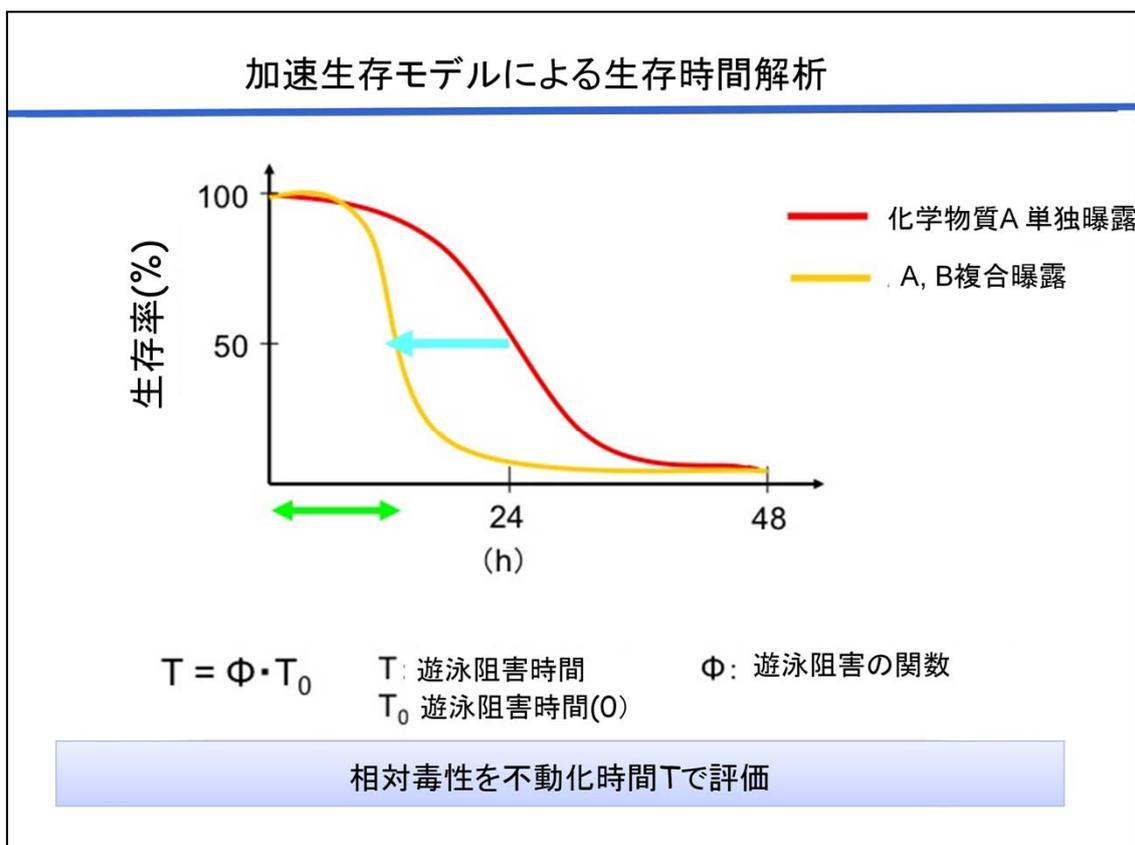


次に、ミジンコで3種の農薬をやりました。これは非常に緻密にやっております。



ビーカーに5頭入れて4連で、しかもそれを3回。4連の試験を3回繰り返すということをやりました。濃度はダイアジノン、フェニトロチオン、ベンチオカーブ、この3種類の農薬の48時間のEC50の5分の1つまり0.2TUですが、0.2のEC50で、0.4のEC50、0.8のEC50の、それぞれの濃度を出しました。これの、全部の総当たりのコンビネーションです。ですから、64種類。その3回繰り返しますから、約1年くらいかかった試験であります。

もちろんガイドラインに沿ってやっています、内部標準で確か銅か何かを内部標準で置いて、感受性も全部確かめて、非常に緻密にやりました。



加速生存モデルという、お医者さんがやるいわゆる薬効とかを調べるモデルを使って計測しました。細かいことはお話しても難しいと思いますけれども、化学物質のAの生存率がこうだったと。なんかの処理をすると、こういうふうに黄色になったと。つまり、ここからここに短くなる関数をφと置きますよと。そして、最初の遊泳阻害時間をゼロ、なんか処理したときの遊泳阻害時間をTと置くと。T0、つまりTイコールφかけるT0と、こういうふうな関数でやるというのが、加速生存モデルであります。これで、SASというパッケージに入っていて、SASの中のアクセレイテッド・フェーラータイム・モデルというものを使いまして、モデルの式は6のφは、それぞれのベータは係数、化学物質Aの濃度とAの係数。Bの濃度とBの係数。Cの濃度とCの係数、ここまでは単純な相加性モデルなんですけど、あとにそれぞれの、Dの化学物質AとBの総合作用のケース。AとCの総合作用のケース。BとCの相互作用のケース。A、B、C、3つ合わさったときの相互作用のケースというふうなモデルを置いて計算すると、それぞれ出てきまして、すべて有意であります。

## 解析の結果

遊泳阻害時間 (相互作用無し)  $\longleftrightarrow$  比較  $\longleftrightarrow$  遊泳阻害時間 (相互作用有)

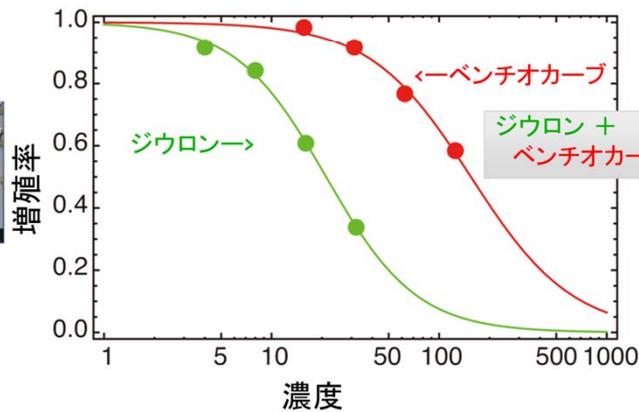
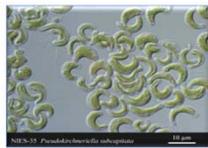
$$\Phi_A \cdot \Phi_B = \beta_A d_A + \beta_B d_B \qquad \Phi_{AB} = \beta_A d_A + \beta_B d_B + \gamma_{AB} d_A d_B$$

$\Phi_A \cdot \Phi_B \geq \Phi_{AB}$  : 相乗作用     $\Phi_A \cdot \Phi_B < \Phi_{AB}$  : 拮抗作用

ダイアジノン +フェニトロチオン	: $\Phi_A \cdot \Phi_B > \Phi_{AB}$	} 相乗作用
ダイアジノン +ベンチオカーブ	: $\Phi_A \cdot \Phi_C > \Phi_{AC}$	
3種混合	: $\Phi_A \cdot \Phi_B \cdot \Phi_C > \Phi_{ABC}$	
フェニトロチオン +ベンチオカーブ	: $\Phi_B \cdot \Phi_C < \Phi_{BC}$	→ 拮抗作用

これから言えることなんですが、ここを説明するのは難しいのですが、ダイアジノンとフェニトロチオン、それからダイアジノンとベンチオカーブ、それと3種混合は、いわゆる synergistic であるというふうな結論が、このモデル式から出ます。ただ、フェニトロチオンプラスベンチオカーブは antagonistic、拮抗作用ということが結論として出ています。確かに、さっきの毒性データを見てもらうと分かりますが、ベンチオカーブが入ると、フェニトロチオンの毒性を下げます。これは、フェニトロチオンというのはチトクロム P450 によって酸化されますが、その酸化の薬物代謝のところを、どうもベンチオカーブが阻害するのではないかと。つまり、ベンチオカーブが入ることによって、フェニトロチオンの毒性を抑えるというふうな拮抗作用が、そういうふうにもわれわれも説明しております。ですから、単純に相加、相乗だけではなくて、拮抗というの、結構起こるのではないかと、うふうに思っています。

緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* の増殖に対する  
除草剤ベンチオカーブとジウロンの複合毒性



今度は除草剤です。

ベンチオカーブとジウロン、これを2つ合わせて緑藻への影響はどうかということ  
であります。これは単独でやるとジウロンは、これは増殖阻害率で、上が1で、濃度が  
上がると下がるというふうに書いてあります。この組み合わせでやっております。ジ  
ウロンとベンチオカーブは相加的かどうかということをやって、これはモデルに入れて、  
相加性のモデルで解析をしてもらいました。

## 複合毒性はある

毒性のない(単独低濃度で毒性が観察されない)  
ものが

複合曝露では

毒性がある(毒性)! =>相加・相乗・拮抗

(チリはつもれば山となることありそう)

なぜ単独低濃度で毒性が出ないのか？

→血清タンパク質結合による毒性低減機構

それともう一つは、議論は最後でお話しますが、なぜ低濃度で毒性が出ないのかと  
いうことで、エコトキシコロジー、医薬品の世界では常識なんですが、エコトキシコロ  
ジーではあまり研究されていないタンパク群がありまして、血中のタンパク質の研究で  
す。

## なぜ単独低濃度で作用が出ないのか

その原因の一つとして血清中で薬物を結合する蛋白質群が知られている(体内お掃除タンパク質?)

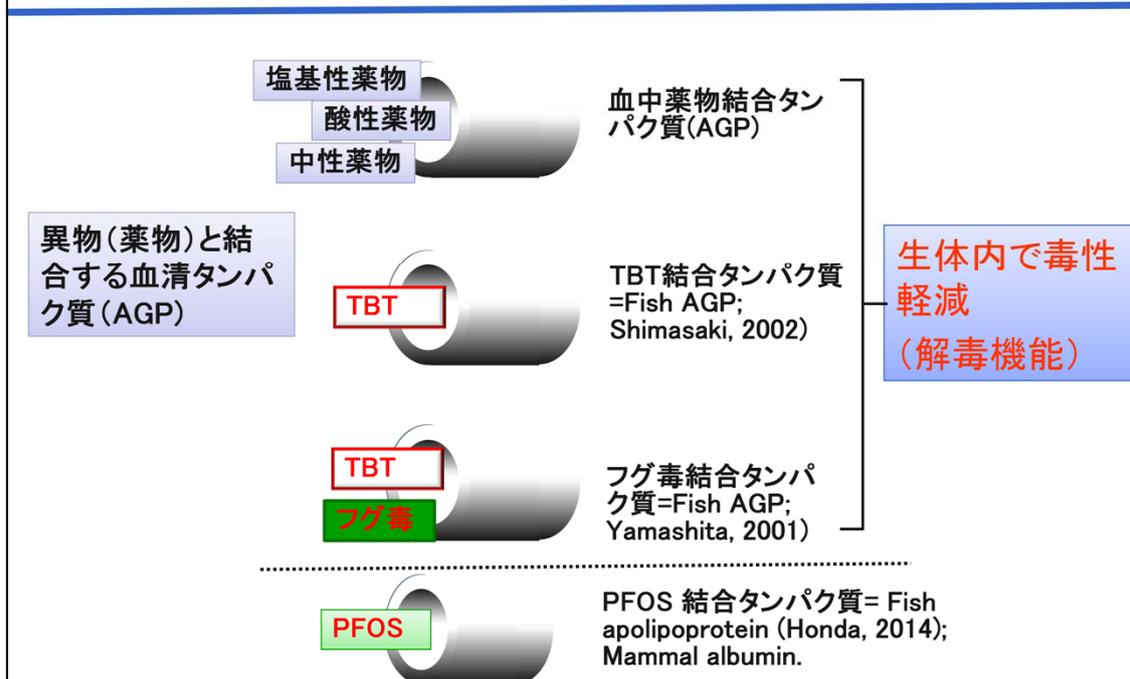
- ・アルブミン
- ・ $\alpha$ 酸性糖タンパク質(AGP)

これらは薬物の血中濃度を下げることが知られており、副作用に関与することが知られている。

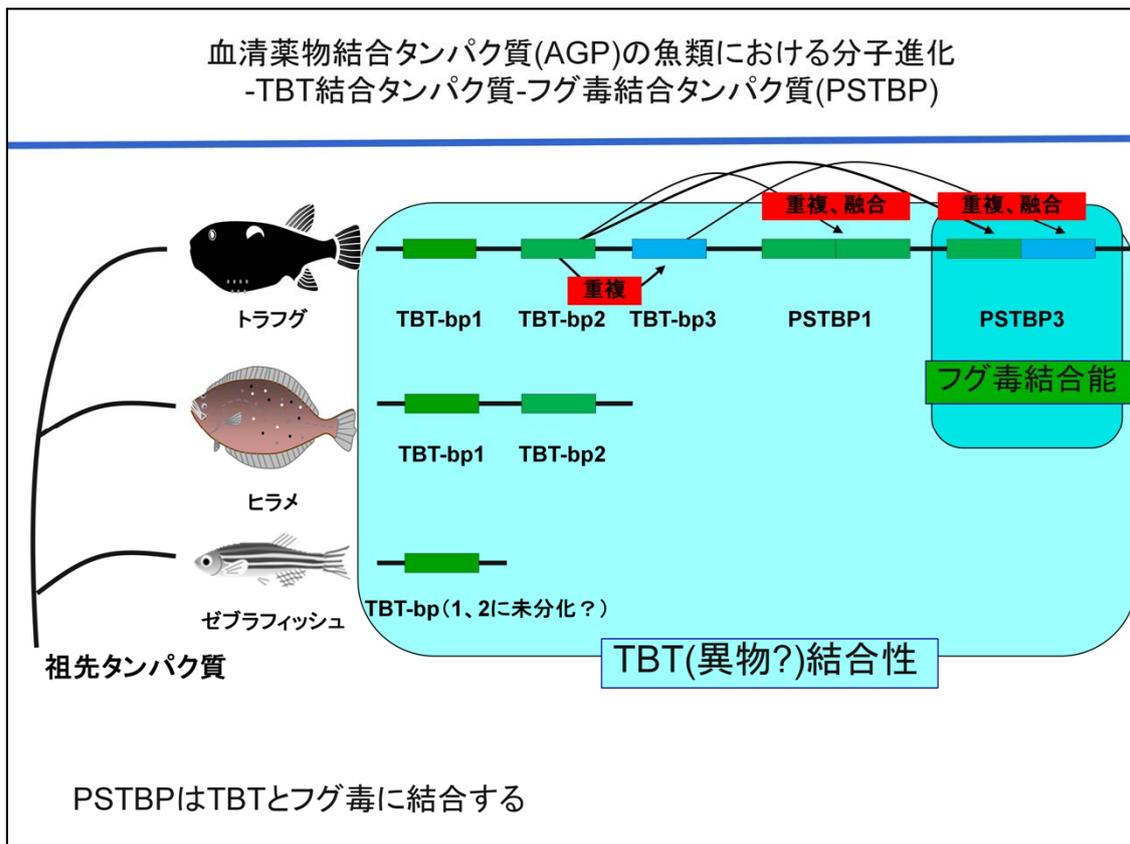
環境毒性学的見地からの研究は少ない

皆さんアルブミンはご存じでしょうけれども、酸性糖タンパク質、AGPというのが2つありまして、これは血中のメジャーなタンパクです。彼らは、いろいろな機能がありますが、一つは薬学の世界ではdrug binding proteinと言われてまして、血中の濃度を非常に下げると。薬物をくっつけて下げることが知られています。特にこちらのほうは、その機能が非常に有名であります。ですから、彼らとのaffinityを、医薬品の人たちは問題にするわけです。毒性のほうからの検討は、少ないんです。

## 血清薬物結合タンパク質の酸性糖タンパク質(AGP)の解毒機能(体内お掃除タンパク質?)



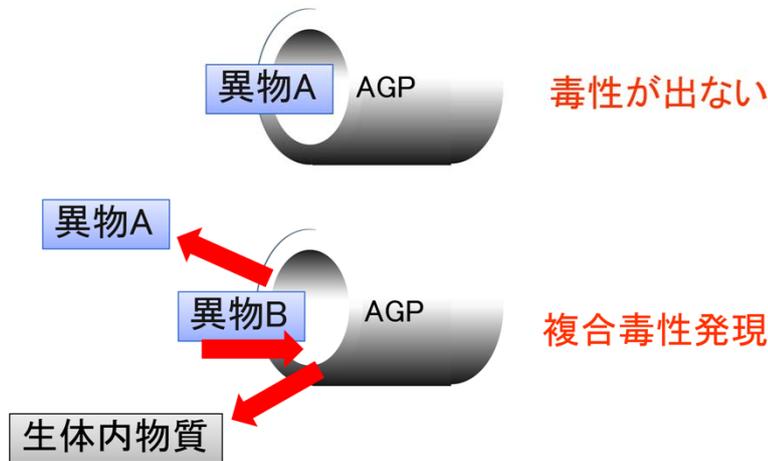
われわれはとあることから、トリブチルスズが魚の血液にたまることを発見しまして、そのタンパクをやっていたら、どうもこの魚のAGP、アシドグリコプロテインであるということを見つけました。人間では、これは塩基性薬物、酸性薬物、中性薬物と結合します。環境汚染物質でも、同じことであります。要は、こういうものをくっつけるというタンパク質が、一群のものがあるということです。



それに、面白いことに、これの仲間の、後で遺伝子も見せますが、仲間が、テトロドキシンをくっつけることが分かりました。これは、実は遺伝子組み換え体を作っているのですが、フグ毒もくっつけますが、TBTもくっつけます。それと、別では、今PFOSも血中に高たまります。人間ではアルブミンというふうに言われますが、魚ではアポリポプロテインがくっつくのではないかと。こういうふうなものがくっついて解毒をやっているというふうなこと、これが低濃度で毒性がない。それと、ある程度たまと毒性が出てくるといふ原因ではないかというふうに思っております。

このフグ毒結合タンパクにおける分子進化というのは、これがどうも、リピートしてフュージョンしやすいトランスポゾンみたいなことで、ポンポン飛んでしまう。トラフグは逆手にとって、もともと、体の中のお掃除タンパクだったやつを、逆手にとってフグ毒を、テトロドキシンをくっつけて、自分で毒をためることによって毒化しました。そして、他の魚から食べられなくなるということで非常に有利になって、爆発的に進化をしたと考えています。フグの進化の原動力になったものではないかということでもあります。

## 仮説: 複合毒性のメカニズム ① 酸性糖タンパク質(AGP)と異物の相互作用



いずれにせよ、こういうふうな毒物結合タンパクということが、一つはエコトキシロジーのほうでもうちょっと考えないといけないのではないかな。低濃度であればAGPというのが異物をくっつけて毒性を消しているという状態なんですけど、例えばこれに幾つもの化学物質がくっつくと、他の物質を追い出したりして、今までマスキングしていたのを出してしまふということが起こるだろうと。それと、本来ここに生体内物質がくっつきますので、脂質とかをトランスポートもしていますので、そういうものも追い出したりして毒性を出す。そういうことで複合毒性が発現するのではないかと。

複合毒性の機構のこれは一つだと思いますけれども、あまり研究されていない分野としてこういうふうな、血中での異物結合による解毒がありそうです。このタンパクが面白いのは、くっつけて体の外に出す機能が予想される点です。人間だと、このタンパク質の仲間、汗に出ます。涙に出ます。魚だと、粘液に出ます。粘液に出て異物を排せつするというプロセスがあります。テトロドトキシンは粘液にくっついて、粘液から体表に出るということが知られています。

九州大学大学院助教授(水産生物環境学) 大嶋 雄治



私の視点

公営団、軍からの環境汚染に汚染物質が蓄積して、ホルモンの作用が加わり、卵巣機能が低下し、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などが発生している。その結果、ダイオキシン類などの汚染物質の蓄積が、ホルモンの作用を阻害し、生殖機能の低下を引き起こしている。また、例えば、内分泌系に影響を及ぼすホルモンの作用が、卵巣機能を低下させ、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などを引き起こしている。また、ホルモンの作用が、卵巣機能を低下させ、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などを引き起こしている。

また、例えば、内分泌系に影響を及ぼすホルモンの作用が、卵巣機能を低下させ、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などを引き起こしている。また、ホルモンの作用が、卵巣機能を低下させ、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などを引き起こしている。

また、例えば、内分泌系に影響を及ぼすホルモンの作用が、卵巣機能を低下させ、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などを引き起こしている。また、ホルモンの作用が、卵巣機能を低下させ、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などを引き起こしている。

◆環境ホルモン 複合汚染に注意が必要

環境ホルモンの複合汚染に注意が必要。環境ホルモンの作用が、卵巣機能を低下させ、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などを引き起こしている。また、ホルモンの作用が、卵巣機能を低下させ、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などを引き起こしている。

環境ホルモンの作用が、卵巣機能を低下させ、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などを引き起こしている。また、ホルモンの作用が、卵巣機能を低下させ、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などを引き起こしている。

環境ホルモンの作用が、卵巣機能を低下させ、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などを引き起こしている。また、ホルモンの作用が、卵巣機能を低下させ、胎児の発育不全や流産、死産、奇形胎児などを引き起こしている。

ということで、ざっくりとしたお話はこれで終わりにしますが、昔からやっております、ということで複合汚染には何とか対応しないとイケないとずっとやっております。

## 結論と今後の展望(どこまでつもれば山となるのか?)

複合毒性はある!(ある程度の濃度であれば)

今後の研究:どこまで低濃度であれば複合毒性はなくなるのか?

NOEC(無作用濃度は正しいか?)EC<sub>x</sub>で考える?

複合曝露を考えてリスク係数を下げるか?  
(根拠は?どこまで?)

複合毒性研究のフレームワークの確立

複合毒性はあるということと、どこまで低濃度であれば複合毒性がなくなるのかというのが、今後の一番大事なこと。いわゆる、本当にちりであればいいのか。どこまでちりであればいいのかということです。

NOECという考えは、ある意味やめたほうがいいのではないかともの本にも書いてありましたけれども、確かにそうかもしれない。ちょっと暴言かもしれませんが、NOECは、複合を考える上では、ひょっとしたらないのかもしれないと思います。ですから、リスク係数を下げるとか、そういうことをやっていくしか、取りあえずはないかなというふうに思っております。

30分ですね。ちょっと時間が超過してしまってすみません。ありがとうございます。