

第三章、基本理論

3.1 毒性物質劑量-反應模式

毒性研究主要可以分成模式推估及實驗驗證兩大部分。若從數據分析的部分來看：在毒性試驗過程中，實驗物種受毒性物質作用時，所造成生物體 50%受抑制（或死亡）時所表現出的毒性物質濃度，即稱做 EC50；而由受影響或死亡的百分率所迴歸出的 S 曲線關係，稱為劑量-反應曲線圖（Dose-response curve）；這些在於毒性評估方面皆為相當重要。

一般常見的毒性物質劑量-反應模式為有三種，包括了：Probit、Weibull 及 Logit 模式，皆是依據不同的假設發展而成；Probit 模式為假設毒性物質對於受體生物的容忍度為一常態分布，Weibull 模式則是符合毒性物質與受體生物間產生化學鍵結的假設，至於 Logit 模式則與 Monod Equation 相似，假設毒性反應形式如同某種酵素反應。表 3.1.1 為三種劑量反應曲線之數學轉換關係式。

表 3.1.1 Weibull、Probit 與 Logit 容忍度分布模式

Type	Transformation	Probability density	Probability of response P
Weibull	$u = \ln(k) + \eta \ln(z)$	$\exp(t - e^t)$	$1 - \exp(-kz^\eta) = 1 - \exp(-e^u)$
Probit	$Y = \alpha + \beta \log(z)$	$\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{t^2}{2})$	$\int_{Y-5}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{t^2}{2}) dt = \frac{1}{2}(1 + e$
Logit	$1 = \theta + \phi \ln(z)$	$\frac{1}{4 \cosh^2(\frac{t}{2})}$	$\frac{1}{1 + e^{-\theta} z^{-\phi}} = \frac{1}{1 + e^{-t}}$

Type	Probability of no-response Q	Transform vs P	Transform vs Q
Weibull	$\exp(-kz^\eta) = \exp(-e^u)$	$u = \ln(-\ln(1 - P))$	$u = \ln(-\ln Q)$
Probit	$\int_{Y-5}^{\infty} \exp(-\frac{t^2}{2}) dt = \frac{1}{2}(1 - \text{erf}(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}))$	$Y = 5 + \sqrt{2} \text{erf}^{-1}(2p - 1)$	$Y = 5 + \sqrt{2} \text{erf}^{-1}(1 - 2Q)$
Logit	$\frac{1}{1 + e^{\theta} z^{\phi}} = \frac{1}{1 + e^t}$	$1 = \ln(\frac{P}{1-P})$	$1 = \ln(\frac{1-Q}{Q})$

其中，Probit 模式，為毒性試驗報告中最常見的劑量-反應模式，主要是由實驗經驗，再加上理論基礎所得的一個模式，其係假設生物對毒性物質的容忍度分布為常態分布（Log-normal distribution），其主要以毒性物質濃度之 log 值與反應率之 NED（Normal equivalent deviation）具有線性關係為基礎，其中反應率即測試生物對毒性物質之反應比率（如死亡率等）。此模式將劑量-反應模式之 S 型曲線，轉換成 NED 尺度上的一直線，原來劑量-反應曲線在抑制率於 50% 之處對應到 NEDscale 上為 0，84.1% 反應率之處對應為 1，而 NED scale 之座標值加 5 即為 Probit 的座標，Probit 單位與反應率與毒性物質劑量間之轉換關係如下：

$$Y = A + B \log Z$$

$$P = 0.5 \left[1 + \operatorname{erf} \left[\frac{(Y - 5)}{\sqrt{2}} \right] \right]$$

其中 Y 為 Probit 單位，A、B 為劑量-反應曲線之截距與斜率，Z 為毒性物質劑量濃度（單位：mg/l）；P 為測試物種對毒性物質之反應率（如死亡率等，單位：%），erf 為 error function。

3.2 G-test 與 NOEC

一般毒性試驗為了具體表示實驗系統的敏感度，一般選擇以其 EC 值來表示，然而在數據的處理上，即使相同的數據選用不同的劑量反應關係模式計算也會得到不同的 EC 值，而一般常用的劑量反應關係模式如 Probit、Weibull 與 Logit 所計算出的 EC 值又以 EC50 較為接近，故實驗系統的敏感度又多以 EC50 表示之。然而超過或低於 EC50 的 EC 值例如 EC90 或 EC10 會因為信賴區間的變大而影響可信度，為了降低往後分析的不確定性，進行 G test (goodness of fit)，經由對重複試驗的每一處理組與期望值的誤差比較，所得絕對值最小之 G 值可為適合的最佳模式。G 值的計算公式如下：

$$G = 2 \sum_{i=1}^a f_i \ln \left(\frac{f_i}{\hat{f}_i} \right)$$

其中 a 是重複組次數， f_i 是處理組實驗值，而 \hat{f}_i 是對應模式之期望值。

本實驗將這些計算，依其原理寫出一個計算檔案，如圖 3.2.1 所示。將溶氧及細胞數的數據鍵入實框的部份；再將不同模式下所得到的截距和斜率鍵入虛框的部份，最後可得到右邊經一連串計算得到的 G 值（如圖 3.2.2），再由其中選擇絕對值最小者，即為最佳值。

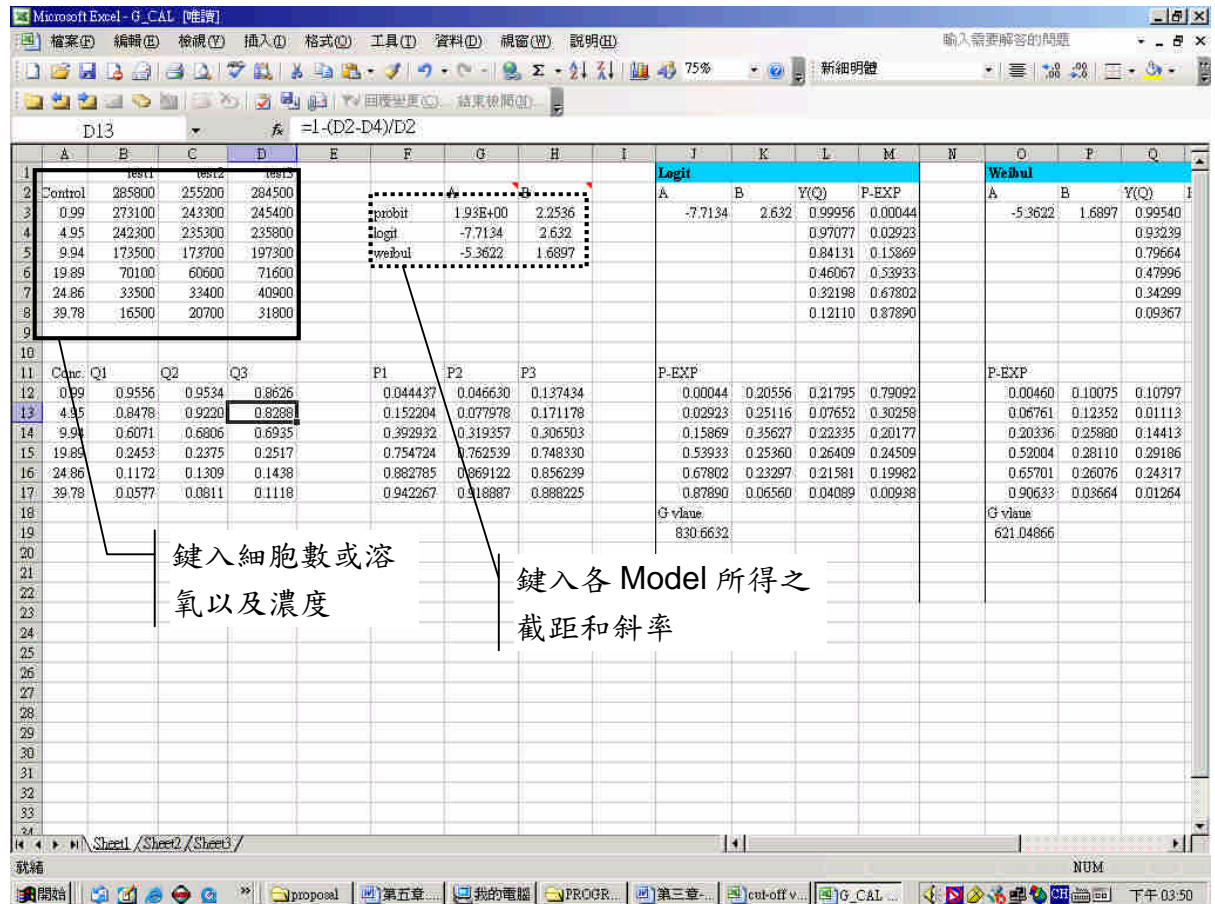


圖 3.2.1 G Test (1)

另外為了能夠對生態環境提供更好的保護，NOEC (no observed effect concentration) 以及 EC10 也是常用來比較的參數。NOEC 代表毒性物質對於生物不具影響的最高濃度，而 EC10 為根據劑量反應關係模式所求取的毒性物質對生物造成 10% 抑制的濃度。為了計算 NOEC 值，Dunnnett's test 是常用以跟控制組比較的統計方法。本實驗所進行 Dunnnett's test 是觀察重複組之間的差異以及控制組和處理組的差距以定義 NOEC。然而 NOEC 值常受到試驗濃度的設定以及實驗的變異而有所影響，而被認為比

起 EC10 未能明確表示毒性物質對生物的實際效應，儘管如此，NOEC 在風險評估上仍然佔有相當的重要性。

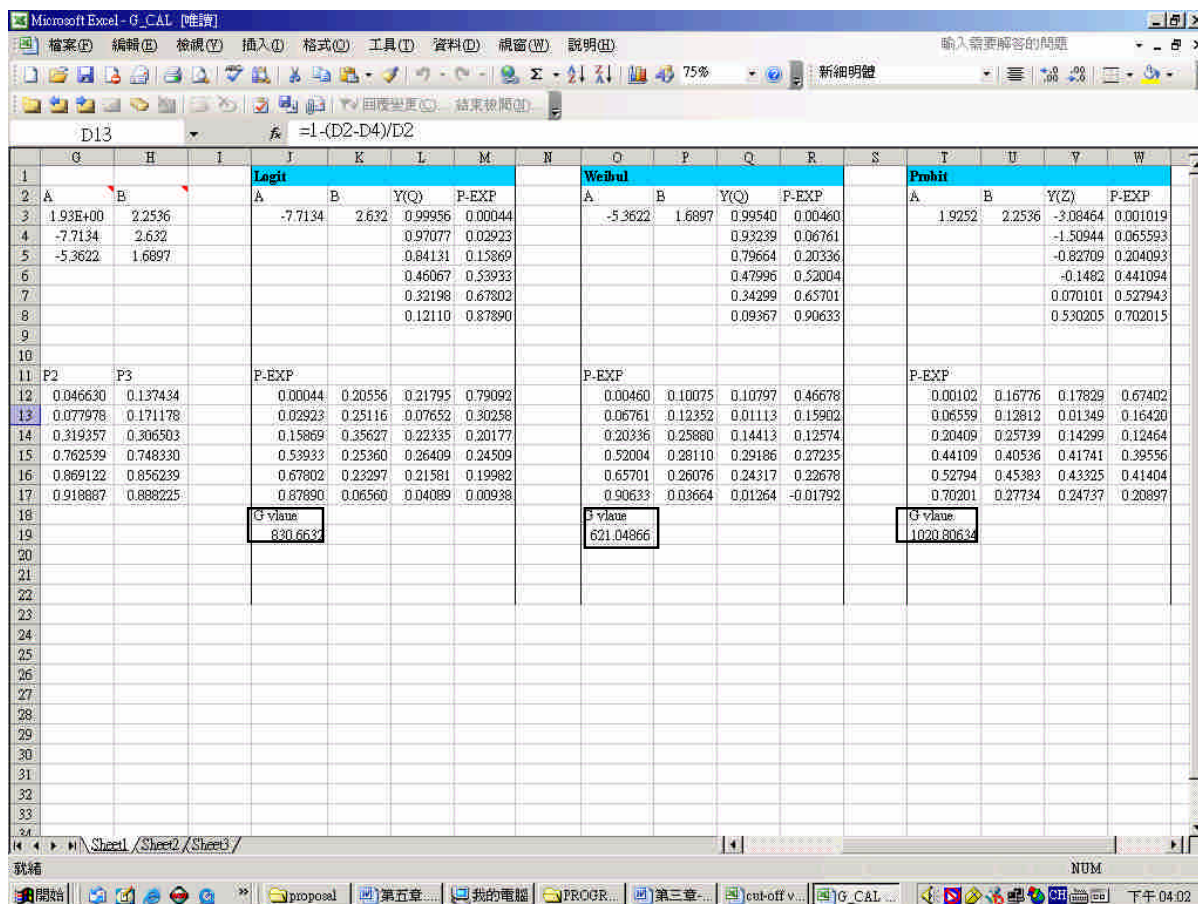


圖 3.2.2 G Test (2)

本研究將針對 EC10 以及 NOEC 進行討論，並提出平均中斷值 (cut-of value) 作為選擇 NOEC 或是 EC10 之參考點。中斷值與一組試驗的組內變異之平方根成正比，因此組內變異較小的精確試驗有較小的平均中斷值，由於中斷值的濃度大於 NOEC 而小於 LOEC，故中斷值亦指出 NOEC 所能達到之保護程度的極限，其計算公式如下：

$$\text{平均中斷值 (\% reduction)} = \frac{T}{X_c} \times S_w \sqrt{\frac{1}{nc} + \frac{1}{ni}} \times 100$$

其中 T 為查表所得 (以 one-tail Dunnett's test 在顯著程度為 5% 之表)， X_c 為控制組之平均值， S_w 是組內變異之平方根， nc 與 ni 為控制組與處理

組重複試驗次數。

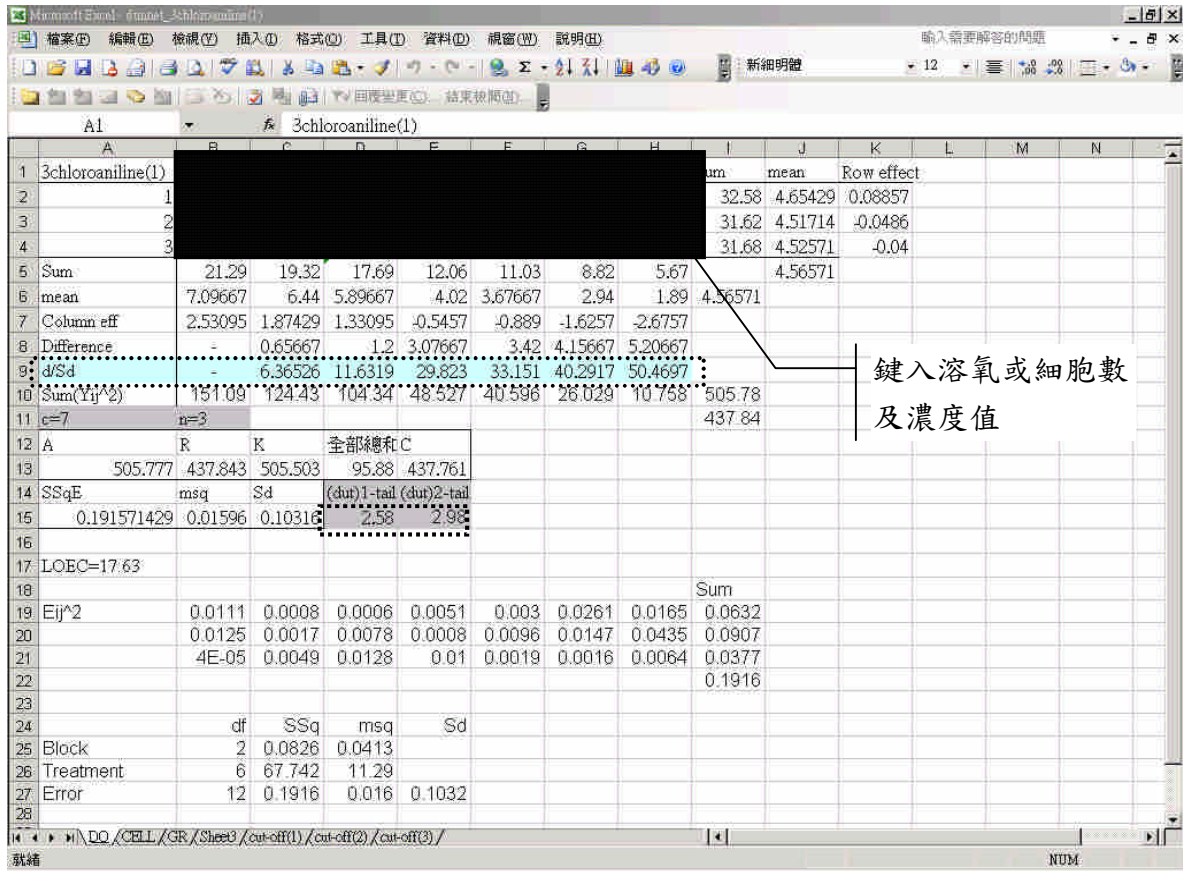


圖 3.2.3 Dunnett's test

在此，也另外將這部分寫成計算程式，如圖 3.2.3。先將溶氧或細胞數（實框部分）鍵入不同之參數工作表中，最後可得到各個計算參數值。在由第 9 列中所計算得到的值（虛框）與統計分析上的值相比較，即可得到數據中之 NOEC 值。而中斷值之計算則見圖 3.2.4。仍先鍵入各參數值後，經過程式計算即可得到統計參數值（如 Sw、F-ration、cut-of value）。

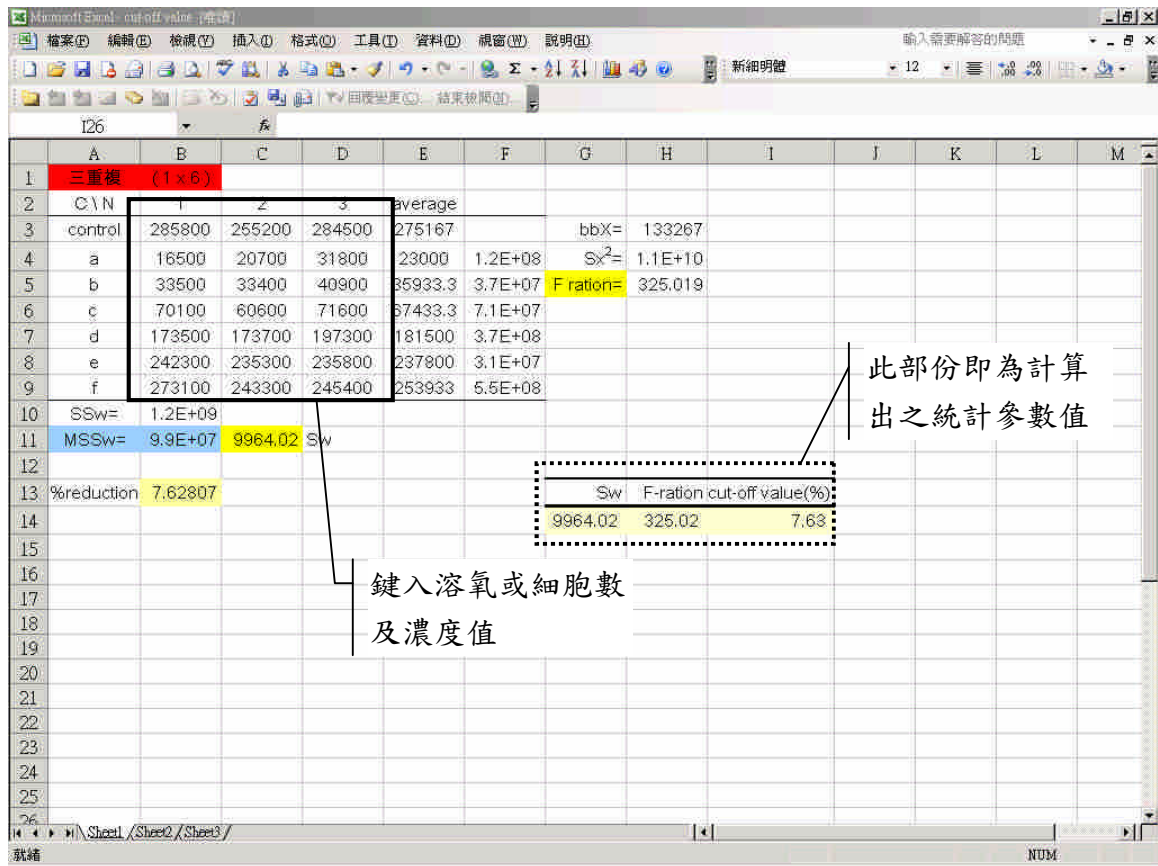


圖 3.2.4 estimation of cut-of value

3.3 混合毒性理論

非交互作用 (non-interaction) 混合毒性理論是由 Hewlett 等人在 1959 所提出的，最早的模式是一個二維模式，亦即限制兩項毒性物質混合，並假設生物反應為非死即生 (quantal)，且各個毒性物質間無交互作用的產生，即另一毒性物質的加入，並不影響毒性物質與實驗受體間結合的能力；且生物反應與毒性物質劑量，呈現一常態分布，其基本公式為：

$$Q = \Pr \left(\delta_1 \frac{1}{\lambda_{12}} + \delta_2 \frac{1}{\lambda_{12}} \leq 1 \right)$$

$$\delta_i = \frac{Z_i}{\bar{Z}_i}$$

其中，

Q：毒性試驗中，生物不反應部份分率（non-response fraction），由機率分布函數內的積分區間決定其大小；

Pr：機率分布函數（可能是常態分布函數，或其他分布函數）；生物體對兩毒性物質的容忍度分布，這兩組不同的容忍度分布，有一個相關係數存在；

Z_i ：毒性物質 I 的濃度；

\bar{Z}_i ：單一生物體對毒性物質 I 的毒性容忍分布；

λ_{12} ：相似係數（similarity），在混合毒理理論中，假設為兩者毒性作用系統相似程度的度量指標，且 $0 < \lambda_{12} < 1$ 。相似係數越接近 1，表示兩毒性物質的作用系統越相近。

Christensen and Chen (1985) [83] 擴充此二維理論，含括多為數學模式，以描述多種毒性物質的混合情況，並將原來的常態分布模式，擴展到容許不同分布模式的一個多維非交互作用混合毒性理論。

除此之外，在相似係數 λ 與相關係數 ρ 這兩種參數相互配對之下，混合效應模式的 action mode 主要有四種，Response multiplication (RM)、No addition (NA)、Concentration addition (CA)、Response addition (RA)；兩毒性物質彼此間與相關係數的表現上，如表 3.3.1 所示， Z_1 、 Z_2 分別代表兩種不同毒性物質之容忍分布，(a)、(b)、(c) 分別是兩毒性物質之相關係數 $\rho = 1$ 、 -1 、 0 的情況（ $\rho = 1$ 表示兩毒性物質容忍分布為正相關， $\rho =$

-1 表示兩毒性物質之容忍分布為負相關， $\rho = 0$ 表示兩毒性物質之容忍分布為不相關）。

經由以上的理論數學模式推導，可知在相關係數 ρ 值趨近於-1 時，亦即在兩毒性物質呈現負相關的情況，且同時劑量-反應曲線之斜率同樣很小，方能有毒性加強之協同效應產生，在模式分析上，則其 action mode 為 Response addition。

表 3.3.1 Definitions of basic modes of action

Parameter		Type of action	Abbreviation	Response
ρ	λ			
0	0	Response multiplication	RM	$1-(1-P_1)(1-P_2)$
1	0	No addition	NA	$\text{Max}(P_1, P_2)$
1	1	Concentration addition	CA	$\sum \frac{z_i}{Z_i} = 1$
-1	0	Response addition	RA	$\min(1, P_1+P_2)$

* λ ：相似係數（similarity）； ρ ：相關係數； z_i ：混合毒性試驗中各個組成的毒性物質之濃度； $\overline{Z_i}$ ：受體生物對於混合毒性試驗中之某一種毒性物質在單一試驗中的 EC50(LC50)值

Note：本表之 Z_i 與 pp. 24 頁之 Z_1 、 Z_2 （容忍分布）不同

3.4 混合毒性指標

根據以上的毒性理論，一般研究描述出常用來判斷毒性物質之混合毒性效應的指標有混合毒性單位 (toxic unit, TU)、加成指標 (additive index, AI)、混合毒性指標 (mixture toxicity index, MTI) 及等抑制曲線 (isobologram)。以下就本研究中可能使用到的指標做一介紹。

1. 混合毒性單位

混合毒性單位的定義如下：

$$TU = \sum_{i=1}^n \frac{z_i}{\bar{z}_i}$$

其中 \bar{z}_i 代表受體生物對於混合毒性試驗中之某一種毒性物質在單一試驗中的 EC50(LC50)值； z_i 為混合毒性試驗中各個組成的毒性物質之濃度；而 n 則代表在混合毒性試驗中所選取之單一毒性物質的數目。

在兩種或以上之毒性物質共同作用下，且抑制效應為 50%，上式可改寫成：

$$TU_{mix} = \frac{Z_1}{EC50_1} + \frac{Z_2}{EC50_2} + \dots$$

此時 TU 值即為混合毒性相加係數 (Additive index; M)

而混合毒性單位若大於一 ($TU > 1$)，代表混合毒性效應為毒性減弱 (antagonistic)；若混合毒性單位等於一 ($TU = 1$)，代表混合毒性效應為毒性相加 (additive)；若混合毒性單位小於一 ($TU < 1$)，代表混合毒性效應為毒性加強 (synergistic)。

2. 加成指標

Marking&Dawson (1975) 以 isobole 觀念為基礎，同時引進毒性單位理念，提出加成指標值 (additive index, AI)，將混合毒性以一定量指標值表示：

$$S = \frac{Am}{Ai} + \frac{Bm}{Bi} + \frac{Cm}{Ci} + \dots$$

A、B、C，... 為毒性物質，i、m 分別代表毒物混合前及混合後之 EC50 值，當指標值 S 小於 1 時，表示毒性加強現象，而等於 1 和大於 1，分別表示毒性加成與毒性減弱現象。

3. 混合毒性指標

Konemann 參考 Plackett and Hewlett 所分類的毒性物質比此間交互作用形式，考量其中兩種形式，同時引進自己觀點及統計學上的基礎，提出混合毒性指標 (mixture toxicity index, MTI)

$$M.T.I = 1 - \frac{\log M}{\log n}$$

上式中的 M 代表 $\sum TU$ ，而 N 代表毒性物質的個數，Konemann 所提出之指標值，因具有統計學上的基礎，可對實驗結果做概略計算精確度，因此近來漸被喜用。

4. Isobologram

將混合毒性試驗中之兩種毒性物質取不同毒性單位比例加以混合，在一個固定的抑制率或死亡率下 (如 EC50 或 LC50)，按不同的混合比例畫出一個等抑制率或死亡率曲線，此一圖形稱為 Isobologram。如圖 3.3.1。

Isobologram 兩軸為分別代表二種混合之毒性物質各別的毒性單位，若畫出之曲線為通過 (1,0) 及 (0,1) 的直線，及無論任何毒性單位比例相混合其毒性單位均為 1，則判定混合毒性效應為毒性相加，若為凹向原點之曲線，則判定為毒性加強，曲線偏離原點，則為毒性減弱。通常兩毒性物質以毒性單位 3:1、1:1、和 1:3 互相混合，將實驗結果繪製成 Isobologram。

Isobologram 的另一個主要功用，即可用來判斷混合毒性效應是否為 complex joint action。通常 complex joint action 的主要特性如下：

- (1) 在任何毒性單位比例下，均呈現混合毒性減弱現象。
- (2) 不同毒性單位比例，其毒性效應減弱現象發生。
- (3) 對於劑量-反應曲線斜率較大之毒性物質，其在毒性單位較小時，對另一種毒性物質有解毒作用。

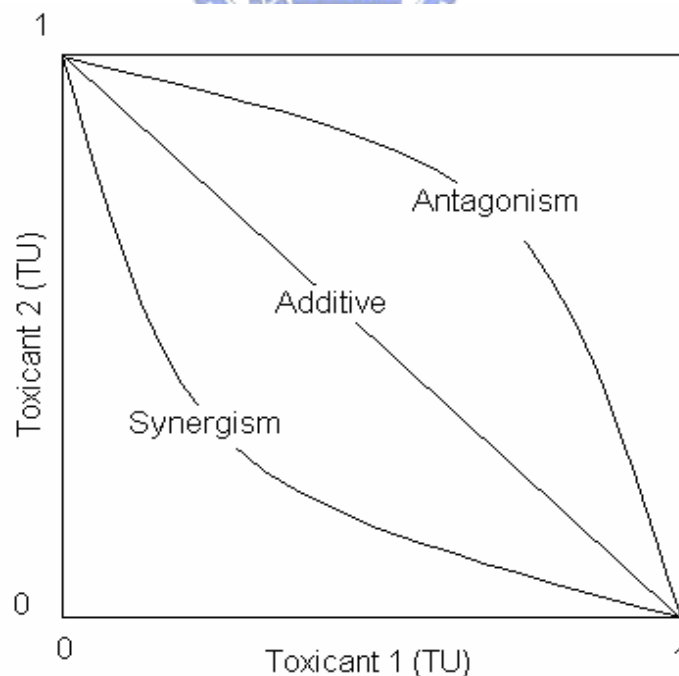


圖 3.4.1 Isobologram 示意圖

3.5 農藥作用機制與方式

3.5.1 joint action 的機制

由於目前的試驗品質和研究方法的限制，目前只對於 joint action 機制的了解尚不夠充分，大致多為藥理方面的研究，所呈現的機制為：

I. 生物轉化的改變

joint action 的一個重要機制是一種化學物質可改變另一種化學物質的生物轉化。這往往是通過酶活性改變產生的。常見的微粒體 (microsomal) 和非微粒體酶系的誘導劑有 DDT 等，這些誘導劑通過對化學物的解毒作用或活化作用，減弱或增加其他化學物質的毒性作用。



II. 受體作用

兩種化學物質與機體的同一個受體結合，其中一種化學物質可將與另一種化學物生物學效應有關的受體加以阻斷，以致不能呈現後者單獨與機體接觸時的生物學效應。例如 Atropine 對有機磷化合物的解毒作用以及抗組胺藥物對組胺的作用。

III. 化學物間的化學反應

一些物質可在體內與毒物發生化學反應。例如硫代硫酸鈉可與氰根發生化學反應，使氰根轉變為硫氰根；又如一些金屬螯合劑可與金屬毒物（如鉛、汞）發生螯合作用，使之成為螯合物而失去毒性作用。


IV. 功能協同或拮抗

可以分成兩種因素：一種可以激發活性（或抑制）某種功能酶，而另一種因素可以激發（或封閉）受體活性。若同時使用，則可以出現損害作用增強或減弱，如有機磷農藥和神經性毒劑的聯合使用等。

V.其他

吸收、排泄等功能可能受到一些化學物的作用而使另一毒物吸收或排泄速度改變，於是影響其毒性。例如，氯仿(chloroform)等會溶於水的脂溶性物質在穿透皮膚後仍被吸收，如果與脂溶性及水溶性均強的乙醇混合就很容易吸收，其肝臟毒性明顯增強。

3.5.2 毒性物質聯合作用的方式



人類在生活 and 活動過程中實際上不是單獨地接觸某個外來的化學物質，而是經常地同時接觸各種各樣的多種外來化學物，其中包括食品污染（食品中殘留的藥品、食物加工添加的色素、防腐劑）、各種藥物、水及大氣污染物、家庭、環境中的各種化學物等等。這些外來化學物在生物體中可呈現十分複雜的交互作用，最後對生物體引起混合毒性作用。混合作用的方式可分兩種：

1、 外環境進行的混合作用：

幾種化學物在環境中共存時，產生相互作用而改變其物化性質，然而使得毒性增強或減弱。如三氧化二鐵，錳等重金屬，使 SO_2 氧化成 H_2SO_4 的最好觸媒，它凝固形成硫酸霧，其毒性比 SO_2 大 2 倍。再如酸遇到含有砷或銻的礦石等可產生毒性很高的砷化氫或銻化氫，因而引起急性中毒事

故。有些化學物在與某種環境因素（如溫度、壓力等）相互作用，才出現毒性變化，或像有機氟聚合物在加熱時會發生熱裂解，而產生多種無機及有機氟的混合物。汽車排出的氮氧化物、碳氫化合物等廢氣，在強烈陽光照射下，可產生光化學反應，產生臭氧、PAN 及其它二次污染物，就會產生『光化學烟霧』。

2、 體內進行的混合作用：

這是毒物在體內相互作用的主要方式。環境中有害因素在體內的相互作用，多為間接的影響，常常是通過改變機體的功能狀態或代謝能力而實現。它可產生在毒物的進入、吸收、分布、代謝、轉化、排泄而改變各自的體內過程，或是作用於同一目標器官則產生相當的生物效應。對各自的毒物代謝動力學及毒性效應動力學產生影響而產生混合作用效應，其中最有意義的是在代謝轉化與在目標器官作用水平上的相互作用。前者主要通過對毒物代謝酶的作用而產生，如某些可與硫基結合的金屬在體內與含硫基酶結合，使通過這些酶催化的毒物代謝減慢而產生增毒作用，例如 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 對人體細胞內鹵代甲烷的代謝抑制作用即是如此。後者是產生類同的或相反的效應而使毒性加強或減弱。當然毒物亦可產生直接相互作用而使自身的理化性質發生變化，而改變其毒性。另外，通過改變機體的健康狀況，抑制某些系統的功能亦可對另一些化學物的毒性產生影響[82]。