

Sumithionの毒性

モルモットによる皮膚アレルギー試験

住友化学工業株式会社

農薬事業部 研究部

(昭和47年9月10日)

要 約

Sumithionの皮膚アレルギー試験をモルモットを使用し、2,4-dinitro-chlorobenzene(DNCB)をpositive controlとして実験した。Sumithionの1%および5%corn oil溶液で隔日に10回皮内注射によって、感作したモルモットに同濃度のSumithionのcorn oil溶液の皮内注射および、同濃度アセトン溶液の皮膚塗布によって誘発を行なったが、いずれも皮膚に反応は認められずSumithionの皮膚アレルギー性は陰性と判定した。positive controlとしたDNCBでは、皮膚の膨隆、充血などの反応が明らかに認められた。

まえがき

Sumithion原体について皮膚アレルギー性の有無をモルモットを使用して実験した。この実験には、2,4-dinitrochlorobenzeneを対照として行なった。その結果を報告する。

実験材料および実験方法

実験に使用したSumithion (Lot. No. 417) は純度97.2%のtechnical gradeのものである。Sumithionは、実用上1.0%以下の有効成分濃度で使用されるので、この実験の低濃度レベルを1%、その5倍量5%を高濃度レベルとし、いずれもcorn oil溶液として実験を行なった。対照とした2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) も同様にcorn oilに溶解した。

実験動物：Hartley系雄性モルモット（体重250～300g）を1群6匹として使用した。動物は実験開始前約2週間実験室の環境下（温度 25 ± 2 °C，湿度50～70%）にて飼育し、健康状態の良好なものを選んで実験に使用した。飼料（CG-3 日本クレア）および水は自由に摂取せしめた。

被検化合物の感作，誘発方法は殺虫剤指針に準じて行なった。方法および使用動物数を表1に示す。感作期間中の皮内注射はモルモットの腹部を電気バリカンで刈毛し行なった。このとき，前回の注射局所に重ならないよう位置を変えた。誘発は最終感作後14日目に行なったが，このときも感作部位に重複しないように行ない，同一動物で皮内注射および皮膚塗布を同時に行なった。なおcorn oil感作モルモットは誘発時局所をSumithion, DNCB および corn oil でそれぞれ処置し，対照とした。誘発処置後24時間局所の変化を観察し，のちモルモットを屠殺解剖し誘発部位を剝離，肉眼的な観察を行なった。

実験成績

結果を第2表にまとめた。感作期間中Sumithion 1%, 5%, DNCBの各実験群とも、皮内注射局所に膨隆がみられたが経日的に減少もしくは消失し、膨隆部およびその周辺部の充血等はみられなかった。この局所の変化は、対照としたcorn oilにおいても同程度認められた。

誘発注射によりSumithionの1%, 5%のいずれの皮内注射においても局所の膨隆がみられた。また24時間後における剖検所見でも5%実験群(B)に肉眼的にごく軽度の充血を認めるのであった。これらの変化は感作時または、corn oil感作動物にスミチオン5%液を皮内注射した群(C)の変化と差はみられない。皮膚塗布では、塗布部分に全く異常は認められなかった。一方positive controlとしたDNCBは、明らかに反応が認められた。皮内注射後3~4時間後から、全例に膨隆部分の充血を認め、24時間後も同様に剖検によって皮下組織に著明な出血斑および充血がみられた。皮膚塗布した実験群は塗布後、3~4時間で全例に塗布部分の充血、腫脹がみられ24時間後の解剖でも出血斑、充血が著明であった。DNCBにみられたこれらの変化はcorn oil感作モルモットをDNCBで処置したときには認められなかった。

表1. 皮膚アレルギー試験の感作および誘発方法

実験番号	A	B	C	D
被検物質	Sumithion	Sumithion	corn oil	DNCB
動物数	6	6	9	5
濃度	1%	5%	—	0.05%
溶媒	corn oil	corn oil		corn oil
処置	初回0.05ml/animal, 2回目より0.1ml/animal; 1日おき10回皮内注射			0.1ml/animal 1日おき3回皮内注射
期間	最終感作終了後14日間			
動物数	6	6	3 3 3	5
濃度	1%	5%	Sumithion 5% corn oil 0.1%(I.D) DNCB 1.0%(D.A)	0.1%(I.D) 0.3%(D.A) 1.0%(D.A)
方法	0.05ml/Animal (I.D) 0.03ml/Animal (D.A)			
誘発方法				

表 2 皮膚アレルギー試験成績

感 作 物 質	Sumithion		corn oil				DNCB	
	A	B	C		D			
実 験 番 号	6	3	3	3	5	5	5	5
動 物 数	6	3	3	3	5	5	5	5
誘 発 物 質	Sumithion		corn oil		Sumithion		DNCB	
濃 度	1.0%	5%	5%	0.1%	1%	0.1%	0.3%	1.0%
皮内注射 による反応	-	1/6	1/3	1/3	0	0	0	0
	±	0	3/3	2/3	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	3/5	0
	±	0	0	0	0	0	2/5	0
	±	0	0	0	0	0	0	0
皮膚塗布 による反応	-	0	0	0	0	0	0	0
	±	0	0	0	0	0	0	0
	+	0	0	0	0	0	0	0
	±	0	0	0	0	0	0	0
	±	0	0	0	0	0	0	0

±：わずかな膨隆，紅斑
 +：軽度の膨隆，充血
 ±：中等度の腫脹，充血
 ±：強度の腫脹，充血

モルモットにおけるスミチオン 22%乳剤の
吸入によるアレルギー性喘息についての検討

報告年月日：1977年11月14日

試験機関：住友化学工業株式会社
農薬事業部 研究部

原文
P1

標

題：モルモットにおけるスミチオン 22%乳剤の吸入によるアレルギー性喘息
についての検討

試験実施日：1977年8月24日～1977年11月10日

要 約

モルモットにスミチオン22%乳剤を吸入させたときの能動感作毒性を調べた。希釈しない乳剤を、スミチオンの気中濃度 $360\text{ mg}/\text{m}^3$ および $1,048\text{ mg}/\text{m}^3$ で、1日に120分間、7日間連続で噴霧した。高い気中濃度で被験物質を吸入させた動物は、3日目から流涎を示し、感作期間終了時の脳、赤血球および血漿のコリンエステラーゼ活性は、著しく阻害されていた。最終感作吸入7日後の動物に誘発処置を施したが、被験製剤に曝露されたどの動物にも、アレルギー性喘息の症状は認められなかった。

スミチオン[®]原体(気中濃度 $226\text{ mg}/\text{m}^3$ および $688\text{ mg}/\text{m}^3$)および製剤中の不活性成分の混合物に関しても、同様の実験を行ったが、喘息発作の症状は認められなかった。

これとは対照的に、細菌性 α -アミラーゼに曝露された動物は、重症のアレルギー性喘息の症状を示した。

以上の結果に基づき、我々は、スミチオン22%乳剤はアレルギー性喘息を引き起こさないと結論する。

被験物質

実験には次の被験物質を使用した。

(1) スミチオン 22% 乳剤 (スミチオン 22% EC)

スミチオン原体 (ロット №70416, 純度 96.6%)	22.0% w/w
Atlox 3409F (ロット №197)	3.0
Arotex 3470	3.0
蒸留水	72.0

(2) スミチオン原体

スミチオン原体 (ロット №70416, 純度 96.6%) 2.2 g を 10% Tween 80 溶液 7.8 g と混合し, その懸濁液を使用した。

(3) 不活性成分混合物

Atlox 3409F (ロット №197)	3.0
Arotex 3470	3.0
蒸留水	94.0

(4) Tween 80 溶液

Tween 80 (和光純薬工業) 1.0 g を蒸留水 9.0 g に溶解した。

(5) 細菌性 α -アミラーゼ溶液

pH 9.4 のホウ酸ナトリウム緩衝液中に 20% 細菌性アミラーゼ (和光純薬工業) を含む液を冷却遠心分離 (12,000 g, 30 分間) して得た上清を調製した。

供試動物

体重 150 ~ 200 g の若い Hartley 系モルモットを静岡県実験動物農業協同組合 (静岡) から購入し, 実験の 1 週間前から温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 相対湿度 $55 \pm 10\%$ の環境下で飼育した。曝露期間以外は, 動物に自由に飼料 (GC-3, 日本クレア, 大阪) と水を摂取させた。

実験条件

Fig. 1 に曝露装置の概略を示す。一定量の被験物質をミスト発生装置に注入し, 圧縮空気を利用して噴霧した。発生したミストを曝露チャンバーに導いたが, このときの吹き出し速

度を調節してチャンバー内の圧を一定に保った。本試験では、通気量 27 l/min 、噴霧圧 1 kg/cm^2 とした。注入速度と活性成分の空气中濃度を Table 1 にまとめた。スミチオンの空气中濃度の測定にあたっては、Fig. 1 のサンプリング系に備え付けたシリカゲル微粒子にミストを通して被験物質を捕集し、ガスクロマトグラフィーで分析した。細菌性 α -アミラーゼの空气中濃度については、サンプリング系に取り付けた小型インピンジャー中のホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.4) に捕集し、280 nm で吸光度を測定することにより求めた。蛋白質濃度はウシ血清アルブミンを標準として測定した。

原文
P 5

曝露および観察

10 ~ 15 匹の雌雄動物を、Table 1 に示したように、1日120分間、7日間連続で被験物質に曝露したが、細菌性 α -アミラーゼ投与群だけは1日60分間の曝露とした。曝露動物の中毒症状の有無を毎日観察し、高濃度のスミチオンを吸入させた4~5匹の雌雄動物を最終感作曝露の1時間後に屠殺し、血漿、赤血球、脳のコリンエステラーゼ活性を測定した。活性測定は Eilman¹⁾ の方法に準じて行い、血漿と脳のコリンエステラーゼについては Centrifichem オートアナライザー (Union Carbide, New York) を、赤血球コリンエステラーゼについては Technicon オートアナライザーシステム (AA-2, Technicon Instrument, New York) を使用した。残りの全ての動物には最終感作曝露の7日後にそれぞれの物質を1時間 (細菌性 α -アミラーゼ群だけは30分間) 吸入させ、同時に雌雄各10匹の無処置動物も同様に曝露し、各群の対照とした。これらの動物のすべてについて、誘発曝露時の症状を注意深く観察した。

モルモットにおける喘息発作の重症度は Table 2 の Yakura²⁾ の方法に従って記録した。スミチオン投与群の中から雌雄各5匹を無作為に選択し、曝露1時間後に屠殺して、前述の方法にしたがって、血漿、赤血球、脳のコリンエステラーゼ活性を測定した。

結果および考察

高濃度のスミチオン22%乳剤を吸入させた動物の半数が、感作期間の後半に流涎を示した。この症状は吸入開始後30分で現れ、曝露後直ちに消失した。他の動物は、感作期間中、全く毒性症状を示さなかった。

スミチオン22%乳剤群およびスミチオン原体群において、1匹から3匹の動物が感作中に死亡した。スミチオン22%乳剤群において中毒症状が認められはしたが、Table 3にみられるように、他の試験群においても死亡例があったことから、動物の死亡はスミチオン吸入に起因するものではないと考えられた。剖検の結果、肺炎が死因であった可能性が高いことが明らかとなった。

感作曝露終了時に、スミチオン曝露動物におけるコリンエステラーゼ活性を測定した。その結果をTable 4に示す。スミチオン22%乳剤を気中濃度 1.048 mg/m^3 で吸入させた動物の血漿、赤血球、脳のコリンエステラーゼ活性は、それぞれ、雄で対照の13.3%、53.8%、58.5%、雌で14.9%、52.4%、51.5%であった。スミチオン原体 668 mg/m^3 を吸入させたモルモットにおけるコリンエステラーゼ阻害は、スミチオン22%乳剤 1.048 mg/m^3 投与群における阻害よりもわずかに小さかったが、雌の血漿コリンエステラーゼのみは対照の12.6%まで阻害された。

各群の感作動物をそれぞれの被験物質に曝露して、誘発処置を行った。Table 5に各群のモルモットにおける喘息発作出現頻度を示す。細菌性 α -アミラーゼ処置動物においては、重篤なアレルギー性喘息の症状が認められたが、スミチオン22%乳剤、スミチオン原体、その他の被験物質では、いずれの動物にも喘息の症状は全く認められなかった。また、どの対照群においても喘息症状は認められなかった。

スミチオン曝露動物の血漿、赤血球、脳のコリンエステラーゼ活性を、誘発曝露の1時間後に測定した。Table 4に示すとおり、高い気中濃度のスミチオン22%乳剤に曝露した感作動物では、コリンエステラーゼが著しく阻害されていた。低濃度のスミチオン22%乳剤あるいは高濃度のスミチオン原体によるコリンエステラーゼ阻害は軽度であった。その他の群ではコリンエステラーゼ阻害は認められなかったが、スミチオン22%乳剤対照(1.048 mg/m^3)における赤血球コリンエステラーゼだけは、わずかに阻害された。

以上の通り、スミチオン投与動物では重度のコリンエステラーゼ阻害がみられたものの、喘息の症状は全く観察されなかった。アレルギー性喘息はアナフィラキシー性反応の一種であることから、スミチオンでアレルギー性喘息発作が認められなかったことは、スミチオン22%乳剤がモルモットにアナフィラキシーを誘発しないとの以前の結果³⁾と一致している。

参 考 文 献

- 1) Yakura, T. : Japanese J. Cli. Med., 30, 108 (1972)
- 2) Ellman, G. L., D. K. Courtney, V. Andres and R. M. Featherstone ; Biochem. Pharmacol., 7, 88 (1961)
- 3) Matsubara, T., S. Hara and T. Kadota ; unpublsh report (1977)

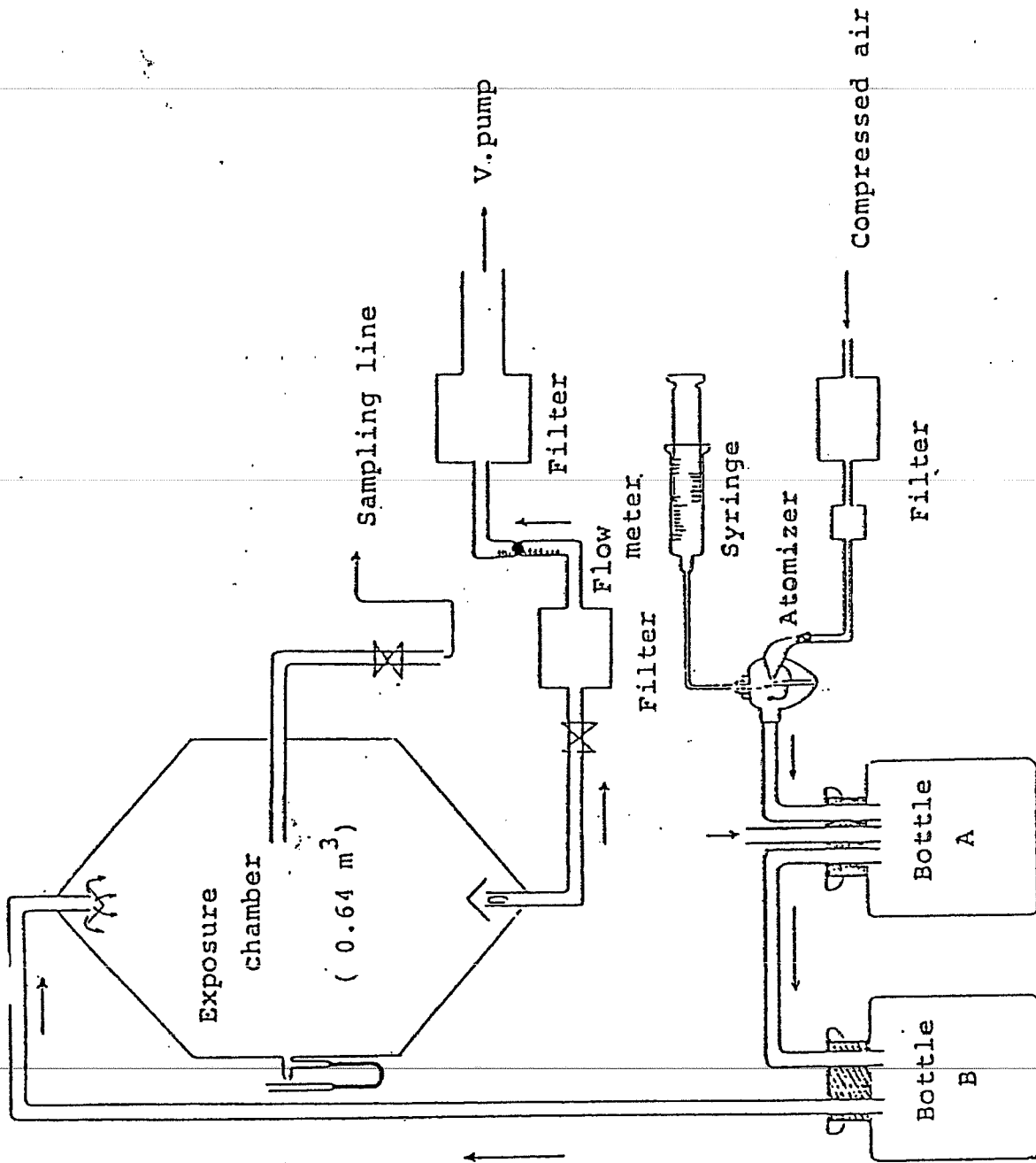


Fig. 1 Diagram of mist generator and animal exposure system for inhalation toxicity test

Table 1 Injection rate and aerial concentration of test materials
for study of allergic asthma.

Test material	Injection rate (ml/min)	Aerial concentration of active ingredient (mg/m ³)
Sumithion 22% EC	0.333	1048
	0.083	360
Sumithion technical	0.333	688
	0.083	226
Mixture of inactive ingredient	0.333	-
Tween 80 solution	0.333	-
Bacterial α -amylase solution	0.333	238

Table 2 Severity of asthma attack in guinea pigs

Severity	Signs	Dyspnea	Cyanose	Collapse ^{a)}	
				5-10 min	< 5 min
Grade 0	-	-	-	-	-
Grade 1°	+	-	-	-	-
Grade 2°	+	+	+	-	-
Grade 3°	+	+	+	+	-
Grade 4°	+	+	+	+	+

a) 5-10min: collapse found from 5 minutes till 10 minutes
of challenging exposure.

< 5 min: collapse found within 5 min.

Table 3 Mortality of guinea pigs during sensitizing period

Test group	Aerial concentration (mg/m ³)	Sex	No. of animals used	Number of dead animals														Mortality ^{a)}
				Day														
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Sumithion 22% EC	1048	M	15					1	(4) ^{b)}						1			2/11
		F	15						(5)					1				1/10
	360	M	15				1		(5)		1							3/10
		F	15						(5)									0/10
Sumithion technical	688	M	15						(5)		1							1/10
		F	15						(5)									0/10
	226	M	15					1	(5)					1				3/10
		F	15						(5)									0/10
Mixture of inactive ingredient		M	10												1			1/10
		F	10															0/10
Tween 80 solution		M	10				1											3/10
		F	10															0/10
Bacterial α-amylase	238	M	10					1										3/10
		F	10															1/10

a): Except the animals sacrificed at 7th-day.

b): Number in parenthesis show the animals sacrificed for determination of cholinesterase activity.

Table 4 Cholinesterase activities of guinea pigs inhaled Sumithion 22% emulsifiable concentrate and Sumithion technical.

Test group	Aerial concentration (mg/m ³)	Cholinesterase activity ^{a)}									
		1 hr after last sensitizing inhalation					1 hr after challenging inhalation				
		Sex	Plasma (U/l)	Packed red cell (U/l)	Brain (U/g.tissue)		Plasma (U/l)	Packed red cell (U/l)	Brain (U/g.tissue)		
Non-treated animals	0	M 10	1874±506 (100)	2474±408 (100)	5.73±1.46 (100)	10	1740±272 (100)	2304±235 (100)	8.70±0.74 (100)		
		F 10	2166±410 (100)	2733±436 (100)	7.28±2.21 (100)	10	2314±526 (100)	1987±459 (100)	8.43±0.54 (100)		
Sumithion 22% EC	1048	M 4	250±23 (13.3)	1330±146 (53.8)	3.35±0.86 (58.5)	4	682±170 (39.2)	965±186 (41.9)	4.02±0.31 (46.2)		
		F 5	322±64 (14.9)	1433±248 (52.4)	3.75±1.08 (62.4)	5	726±170 (31.4)	1167±203 (58.7)	4.48±0.33 (53.1)		
	360	M	/	/	/	5	1350±289 (77.9)	1754±95 (76.1)	7.21±0.37 (82.9)		
		F	/	/	/	5	2124±271 (91.8)	1771±189 (89.1)	6.47±0.13 (76.7)		
Sumithion technical	688	M 5	402±71 (21.5)	2158±399 (87.1)	4.87±1.33 (85.0)	5	1260±290 (72.4)	2234±345 (97.0)	7.60±0.47 (87.5)		
		F 5	273±47 (12.6)	1815±230 (66.4)	4.54±0.41 (62.4)	5	1330±188 (57.5)	2358±522 (119)	7.45±0.44 (88.4)		
	226	M	/	/	/	5	1803±412 (104)	2517±494 (109)	7.50±0.40 (86.2)		
		F	/	/	/	5	1929±167 (83.4)	2482±279 (125)	7.99±0.27 (94.7)		

a): Mean ± Standard deviation

Number in parenthesis is % of the control.

- Continued -

Table 4 Continued

Test group	Aerial concentration (mg/m ³)	Sex	Cholinesterase activity ^{a)}							
			1 hr after last sensitizing inhalation				1 hr after challenging inhalation			
			Plasma (U/l)	Packed red cell (U/l)	Brain (U/g.tissue)		Plasma (U/l)	Packed red cell (U/l)	Brain (U/g.tissue)	
Challenging control group										
Sumithion 22% EC	1048	M	/	/	/	/	5	1723±308 (99.0)	1447±92 (62.8)	7.74±0.50 (89.0)
		F	/	/	/	/	5	1895±188 (81.9)	1641±87 (82.6)	8.23±0.36 (97.6)
	360	M	/	/	/	/	5	1929±111 (131)	2017±233 (87.5)	7.60±0.40 (87.4)
		F	/	/	/	/	5	2051±228 (88.6)	1651±189 (83.1)	7.45±0.13 (88.4)
Sumithion technical										
	688	M	/	/	/	/	5	1968±229 (113)	2833±154 (129)	8.58±0.40 (98.6)
		F	/	/	/	/	5	2046±282 (88.3)	2427±337 (122)	9.16±0.37 (109)
	226	M	/	/	/	/	5	2183±137 (125)	2760±552 (120)	8.87±0.13 (102)
		F	/	/	/	/	5	2144±121 (92.7)	2525±574 (127)	8.87±0.28 (105)

Table 5 Incidence of asthma attack

Test group	Aerial concentration		Sex	No. of animals tested	No. of animals				
	of active ingredient Sensitized	Challenged			Grade 0°	Grade 1°	Grade 2°	Grade 3°	Grade 4°
Sumithion 22% EC	1048 ^{mg/m³}	1048 ^{mg/m³}	Male	9	9	0	0	0	0
			Female	9	9	0	0	0	0
	360	360	Male	7	7	0	0	0	0
			Female	10	10	0	0	0	0
Sumithion 22% EC (control)	/	1048	Male	10	10	0	0	0	0
			Female	10	10	0	0	0	0
Sumithion technical	688	688	Male	9	9	0	0	0	0
			Female	10	10	0	0	0	0
	226	226	Male	7	7	0	0	0	0
			Female	10	10	0	0	0	0
Sumithion technical (control)	/	688	Male	10	10	0	0	0	0
			Female	10	10	0	0	0	0

- Continued -

Table 5 Continued

Test group	Aerial concentration of active ingredient		Sex	No. of animals tested	No. of animals				
	Sensitized				Grade 0°	Grade 1°	Grade 2°	Grade 3°	Grade 4°
	0 mg/m ³	0 mg/m ³							
Mixture of inactive ingredient	0	0	Male	9	9	0	0	0	
			Female	10	10	0	0	0	
Mixture of inactive ingredient (control)	/	0	Male	10	10	0	0	0	
			Female	10	10	0	0	0	
Tween 80 solution	0	0	Male	7	7	0	0	0	
			Female	10	10	0	0	0	
Tween 80 solution (control)	/	0	Male	10	10	0	0	0	
			Female	10	10	0	0	0	
Bacterial α-amylase	238	238	Male	7	0	0	0	3	
			Female	9	0	0	0	5	
Bacterial α-amylase (control)	/	238	Male	10	10	0	0	0	
			Female	10	10	0	0	0	

