農薬の急性毒性に及ぼす防カビ剤及び防虫剤の影響^{*1}

(昭和 57 年 9 月 20 日受理)

一色 賢 司^{*2} 宮 田 一 正^{*3} 松 井 重 樹^{*3}
堤 将 和^{*3} 渡 辺 忠 雄^{*3}

Effects of Post-harvest Fungicides and Piperonyl Butoxide on the Acute Toxicity of Pesticides in Mice

(Safety Evaluation for Intake of Food Additives. III)

Kenji ISSHIKI^{*2}, Kazumasa MIYATA^{*3}, Shigeki MATSUI^{*3},
Masakazu TSUTSUMI^{*3} and Tadao WATANABE^{*3}

(^{*2}The Kitakyushu Municipal Institute of Environmental Health Sciences: Shin'ike-1-2-1, Tobata-ku, Kitakyushu, Japan; ^{*3}Department of Food Science & Technology, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, Japan)

Diphenyl, *o*-phenylphenol, piperonyl butoxide and thiabendazole were given to mice to confirm the potential ability of these compounds to modify the toxicity of other compounds. The acute oral toxicity (LD₅₀) values of equitoxic combinations of these food additives with pesticides as model toxicants were determined with male mice. The expected LD₅₀ of a mixture was calculated from Finney's equation, and compared with the observed LD₅₀. The pesticides studied included BPMC, carbaryl, DDVP, diazinon, EPN, fenitrothion, malathion, nicotine, parathion, parathion-methyl and pyrethrins. All the above food additives increased the toxicity of BPMC, carbaryl, diazinon, EPN and parathion on the one hand, but decreased that of DDVP, fenitrothion, malathion and parathion-methyl on the other.

(Received September 20, 1982)

Key words: 農薬 pesticides; 急性毒性 acute toxicity; オルトフェニルフェノール *o*-phenylphenol; ジフェニル diphenyl; チアベンダゾール thiabendazole; ピペロニルブトキシイド piperonyl butoxide; マウス mouse

緒 言

著者らは前報において、食品添加物として使用されている防カビ剤や防虫剤によってマウスの薬物代謝酵素系に変動が生じることを指摘した¹⁾。薬物代謝系は種々の化合物の代謝を行っており、特に生体に取り込まれた異物 (xenobiotics) を極性化する代謝は生体の恒常性を保つ重要な代謝の一つであると考えられる²⁾。この代謝系

に変動が生じた場合には、ある種の毒物の示す毒性は変化することが予想される³⁾。農薬のなかにも毒性が変化する可能性を有するものが存在すると考えられる。そこで、本実験では有機リン剤、カルバメート剤及びピレトリンなどの農薬の毒性が、防カビ剤及び防虫剤によってどのように変化するかをマウスを用いて観察した。そしてこれらの食品添加物の供試農薬の毒性に及ぼす影響について若干の知見を得たのでここに報告する。

実 験

1. 試 料

1) 食品添加物

ジフェニル, オルトフェニルフェノール, ピペロニル

^{*1} 食品添加物の摂取に関する研究 (第3報)

^{*2} 北九州市環境衛生研究所: 北九州市戸畑区新池 1-2-1

^{*3} 九州大学農学部食糧化学工学科: 福岡市東区箱崎 6-10-1

ブトキサイド, チアベンダゾール: 前報と同じものを使用した¹⁾.

2) 農薬

BPMC (97.4%), カルバリル (98.0%), フェニトロチオン (98.5%), マラチオン (96.0%), メチルパラチオン (96.0%), ピレトリン (20.0%): 三笠化学工業(株)製.

DDVP (98.0%), ダイアジノン (90.0%), EPN (90.0%): サンケイ化学(株)製.

パラチオン (97.8%): 九州三共(株)製.

ニコチン (96.0%): 和光純薬工業(株)製.

2. 毒性試験

ddY 系雄マウスを九動(株)より3週令で購入し水及び飼料(日本クレア(株)製, CE-2)を自由に摂取させ7日間馴育し, 4週令体重 19~25 g の時点において実験に供した. 試料はすべてコーンオイルに溶解, 又は懸濁させ胃ゾンデを用いてマウスに投与した. 投与容量は体重 20 g 当たり 0.2 ml とした. 対照区のマウスにはコーンオイルのみを投与した. 投与後, 水及び飼料を自由に摂取させて7日間観察を続けた. 本試験に先だって1群3匹のマウスを5~8群用いて予試験を行った. 死亡

率 1/3 及び 2/3 となった投与量の平均値を中心として本試験の試料の投与量を設定し, 1群5匹のマウス5~8群に投与した. 混合物の同時投与実験では Keplingerらの方法⁴⁾に従って, それぞれの試料について得られた LD₅₀ を基にして等毒性比 (equitoxic ratio)⁵⁾ になるように試料を混合して投与した. すなわち試料 A, B の LD₅₀ を LD₅₀(A) 及び LD₅₀(B) とすると, 混合物は LD₅₀(A):LD₅₀(B) の比にA及びBを混ぜ合わせて調製した. この混合物についての LD₅₀ の期待値 LD₅₀(A, B) は, 下記の Finney の理論式 (1) より算出した⁶⁾. f_A , f_B は, 混合物中の試料 A, B の含有率である.

$$\frac{1}{LD_{50}(A, B)} = \frac{f_A}{LD_{50}(A)} + \frac{f_B}{LD_{50}(B)} \quad (1)$$

LD₅₀ の実測値は, Litchfield-Wilcoxon 法⁷⁾に従って推定した.

結果及び考察

防カビ剤及び防虫剤単独のマウスへの経口投与による毒性試験を行ったところ, Table 1 に示す結果が得られた. ジフェニル又はオルトフェニルフェノールを投与されたマウスは, しだいに動きが少なくなり下痢症状を呈する例も見られた. 死亡例は2日目までにすべて観察さ

Table 1. Survival of Male Mice Administered Orally with Some Food Additives^{a)}

Food additive	Dose (mg/kg)	Survival days					Death rate ^{b)}	LD ₅₀ (mg/kg) ^{c)}
		1	2	3	4	>7		
Diphenyl	1250					5	0/5	1900
	1540			1		4	1/5	(1600-2200) ^{d)}
	1890		3			2	3/5	
	2330		1	3		1	4/5	
	3520		3	2			5/5	
o-Phenylphenol	2120					5	0/5	3100
	2600		1			4	1/5	(2700-3600)
	3200		2	1		2	3/5	
	3940		3	1		1	4/5	
	4840		3	2		0	5/5	
Piperonyl butoxide	1760					5	0/5	2600
	2170		1			4	1/5	(2300-3000)
	2670		1	1	1	2	3/5	
	3280		3	1		1	4/5	
	4030		4		1	0	5/5	
Thiabendazole	1000					5	0/5	1600
	1230		1			4	1/5	(1300-2000)
	1500			1	1	3	2/5	
	1850			3	1	2	3/5	
	2280		1	3		1	4/5	
	2800		4	1		0	5/5	

a) Four-weeks old ddY mice (19-25 g) were used.

b) Number of dead/number of treated

c) Values were evaluated with Litchfield-Wilcoxon method.

d) Confidence limit (95%)

れ、その後死亡するマウスはなかった。ジフェニルの LD₅₀ 値は 1900 mg/kg であった。また、オルトフェニルフェノールの LD₅₀ 値は 3100 mg/kg であった。ピペロニルブトキシサイドを投与したマウスは、数分後にはうずくまり、時折振せんを起し毛並が乱れていった。高濃度投与区では眼や鼻の充血や黒色の軟便の排泄が観察された。多くの死亡例は投与後24時間以内に見られたが、2又は3日目に死亡した例もあった。ピペロニルブトキシサイドの LD₅₀ 値は、2600 mg/kg であった。チアベンダゾールを投与されたマウスは、初めはケージ中を動き回り振せん、立毛を呈する例も見られたが、その後ほとんど動かなくなった。チアベンダゾールの LD₅₀ 値は、1600 mg/kg であった。

前報¹⁾で述べたように、ジフェニル、オルトフェニルフェノール、ピペロニルブトキシサイド及びチアベンダゾ

ールは薬物代謝系に変化を与えたと考えられた。これらの食品添加物もそれぞれ薬物代謝系によって代謝されることから^{8)~10)}、同時に摂取された場合には毒性に変化が生じる可能性があると考えられた。そこまでは Finney の理論式 (1)⁶⁾ より種々に組み合わせた混合物についての LD₅₀ の期待値を算出した。そして、実際に各食品添加物を等毒性比に混合しマウスに投与して LD₅₀ 値を測定した。混合物についての LD₅₀ の期待値、実測値及び両者の比は Table 2 のとおりであった。両者の値に大きな差は観察されず、両者の比は 0.66~1.11 の範囲にあり、1 よりも小さな比を示すものが多かった。従って、これらの食品添加物の混合物の毒性は相乗的というよりも相加的あるいは毒性が弱くなる傾向にあることが判明した。

次に、防カビ剤及び防虫剤のもつ薬物代謝への影響力

Table 2. Expected and Observed LD₅₀ of Combinations of Food Additives in Mice^{a)}

Combination	Expected LD ₅₀ ^{b)} (mg/kg)	Observed LD ₅₀ ^{c)} (mg/kg)	Ratio ^{d)} E/O
Diphenyl	2500	2800	0.89
+ <i>o</i> -phenylphenol			
Diphenyl	2300	3500	0.66
+piperonyl butoxide			
Diphenyl	1800	1900	0.95
+thiabendazole			
<i>o</i> -Phenylphenol	2900	3200	0.91
+piperonyl butoxide			
<i>o</i> -Phenylphenol	2400	2600	0.92
+thiabendazole			
Piperonyl butoxide	2100	2300	0.91
+thiabendazole			
Diphenyl	2500	3400	0.75
+ <i>o</i> -phenylphenol			
+piperonyl butoxide			
Diphenyl	2200	2900	0.76
+ <i>o</i> -phenylphenol			
+thiabendazole			
Diphenyl	2000	1800	1.11
+piperonyl butoxide			
+thiabendazole			
<i>o</i> -Phenylphenol	2400	3200	0.75
+piperonyl butoxide			
+thiabendazole			
Diphenyl	2300	2100	1.10
+ <i>o</i> -phenylphenol			
+piperonyl butoxide			
+thiabendazole			

a) Food additives were mixed at the equitoxic ratio (based on the LD₅₀), and the mixture was administered orally into mice (ddY, 4 weeks old, male, 19-25 g).

b) Values were calculated from Finney's equation.

c) Values were evaluated with Litchfield-Wilcoxon method.

d) The ratio of the expected LD₅₀ to the observed LD₅₀.

Table 3. Survival of Male Mice-(ddY) Administered Orally with Pesticides^{a)}

Pesticides	Dose (mg/kg)	Survival day				Death rate ^{b)}	LD ₅₀ (mg/kg) ^{c)}
		1/24	1/8	1	2>7		
BPMC	120				5	0/5	200
	145		1		4	1/5	(154-260) ^{d)}
	180	2			3	2/5	
	220	3			2	3/5	
	272	2	2		1	4/5	
Carbaryl	160				5	0/5	220
	185			1	4	1/5	(190-240)
	200		2		3	2/5	
	214		3		2	3/5	
	268	3	1		1	4/5	
	330	5			0	5/5	
DDVP	83				5	0/5	140
	101			1	4	1/5	(110-190)
	124	2			3	2/5	
	165	3			2	3/5	
	186	5			0	5/5	
Diazinon	14				5	0/5	17
	16			2	3	2/5	(14-20)
	18	1	2		2	3/5	
	20	2	3		0	5/5	
EPN	21				5	0/5	30
	26		1	1	3	2/5	(23-37)
	32		2	1	2	3/5	
	39		2	2	1	4/5	
	48	1	4		0	5/5	
Fenitrothion	700				5	0/5	1300
	900			1	4	1/5	(1050-1610)
	1200		1	1	3	2/5	
	1500	1	1	1	2	3/5	
	1800	1	3	1	0	5/5	
Malathion	700			1	5	5/5	1100
	900			1	4	1/5	(920-1310)
	1000		2		3	2/5	
	1200		2	1	2	3/5	
	1500		3	2	0	5/5	
Nicotine	76			1	4	1/5	100
	94	1	1		3	2/5	(80-124)
	112	3			2	3/5	
	130	4			1	4/5	
	150	5			0	5/5	
Parathion	6				5	0/5	8.0
	7	1	1		3	2/5	(6.3-10)
	9		3		2	3/5	
	11	1	4		0	5/5	
Parathion-methyl	21		1		4	1/5	30
	27	1	1		3	2/5	(24-38)
	33	2	1		2	3/5	
	42	1	2	1	1	4/5	
Pyrethrins	350				5	0/5	520
	460		2		3	2/5	(380-710)
	590		2	1	2	3/5	
	770		2	2	1	4/5	
	1000		2	3	0	5/5	

^{a)} Four-weeks old mice (19-25 g) were used.^{b)} Number of dead/number of treated.^{c)} Confidence limit (95%).

Table 4. Expected and Observed Oral LD₅₀ of Combinations of Diphenyl and Pesticides in Mice^{a)}

Combination	Expected LD ₅₀ (mg/kg) ^{b)}	Observed LD ₅₀ (mg/kg) ^{c)}	Ratio E/O ^{d)}
Diphenyl	1050	600	1.75
+BPMC			
Diphenyl	1060	540	1.96
+carbaryl			
Diphenyl	1020	1620	0.63
+DDVP			
Diphenyl	960	690	1.40
+diazinon			
Diphenyl	965	700	1.38
+EPN			
Diphenyl	1650	2700	0.61
+fenitrothion			
Diphenyl	1500	2100	0.71
+malathion			
Diphenyl	1000	1040	0.96
+nicotine			
Diphenyl	954	700	1.36
+parathion			
Diphenyl	965	2240	0.43
+papathion-methyl			
Diphenyl	1210	1350	0.90
+pyrethrins			

a) Diphenyl and pesticide were mixed at the equitoxic ratio based on the LD₅₀, and the mixture was administered orally into mice (ddY, 4 weeks old, male, 19-25 g).

b) Values were calculated from Finney's equation.

c) Values were evaluated with Litchfield-Wilcoxon method.

d) The ratio of the expected LD₅₀ to the observed LD₅₀.

Table 5. Expected and Observed Oral LD₅₀ of Combinations of *o*-Phenylphenol and Pesticides in Mice^{a)}

Combination	Expected LD ₅₀ (mg/kg) ^{b)}	Observed LD ₅₀ (mg/kg) ^{c)}	Ratio E/O ^{d)}
<i>o</i> -Phenylphenol	1650	1030	1.60
+BPMC			
<i>o</i> -Phenylphenol	1660	800	2.10
+carbaryl			
<i>o</i> -Phenylphenol	1620	3520	0.46
+DDVP			
<i>o</i> -Phenylphenol	1560	1130	1.39
+diazinon			
<i>o</i> -Phenylphenol	1565	1250	1.25
+EPN			
<i>o</i> -Phenylphenol	2250	3700	0.61
+fenitrothion			
<i>o</i> -Phenylphenol	2100	4300	0.49
+malathion			
<i>o</i> -Phenylphenol	1600	1580	1.01
+nicotine			
<i>o</i> -Phenylphenol	1554	1300	1.20
+parathion			
<i>o</i> -Phenylphenol	1565	3630	0.43
+parathion-methyl			
<i>o</i> -Phenylphenol	1810	2000	0.91
+pyrethrins			

a) *o*-Phenylphenol and pesticide were mixed at the equitoxic ratio based on the LD₅₀, and the mixture was administered orally into mice (ddY, 4 weeks old, male, 19-25 g).

b) Values were calculated from Finney's equation.

c) Values were evaluated with Litchfield-Wilcoxon method.

d) The ratio of the expected LD₅₀ to the observed LD₅₀.

Table 6. Expected and Observed Oral LD₅₀ of Combinations of Piperonyl Butoxide and Pesticides in Mice^{a)}

Combination	Expected LD ₅₀ (mg/kg) ^{b)}	Observed LD ₅₀ (mg/kg) ^{c)}	Ratio E/O ^{d)}
Piperonyl butoxide +BPMC	1400	550	2.55
Piperonyl butoxide +carbaryl	1410	560	2.52
Piperonyl butoxide +DDVP	1370	3200	0.43
Piperonyl butoxide +diazinon	1310	1040	1.26
Piperonyl butoxide +EPN	1315	480	2.74
Piperonyl butoxide +fenitrothion	1950	3300	0.60
Piperonyl butoxide +malathion	1850	3850	0.48
Piperonyl butoxide +nicotine	1350	1620	0.83
Piperonyl butoxide +parathion	1304	780	1.67
Piperonyl butoxide +parathion-methyl	1315	3460	0.38
Piperonyl butoxide +pyrethrins	1560	1150	1.36

a) Piperonyl butoxide and pesticide were mixed at the equitoxic ratio based on the LD₅₀, and the mixture was administered orally into mice (ddY, 4 weeks old, male, 19-25 g).

b) Values were calculated from Finney's equation.

c) Values were evaluated with Litchfield-Wilcoxon method.

d) The ratio of the expected LD₅₀ to the observed LD₅₀.

Table 7. Expected and Observed Oral LD₅₀ of Combination of Thiabendazole and Pesticides in Mice^{a)}

Combination	Expected LD ₅₀ (mg/kg) ^{b)}	Observed LD ₅₀ (mg/kg) ^{c)}	Ratio E/O ^{d)}
Thiabendazole +BPMC	900	530	1.70
Thiabendazole +carbaryl	910	440	2.10
Thiabendazole +DDVP	870	1610	0.54
Thiabendazole +diazinon	809	660	1.23
Thiabendazole +EPN	815	680	1.20
Thiabendazole +fenitrothion	1500	1800	0.83
Thiabendazole +malathion	1350	2400	0.56
Thiabendazole +nicotine	850	1180	0.72
Thiabendazole +parathion	804	600	1.34
Thiabendazole +parathion-methyl	815	1540	0.53
Thiabendazole +pyrethrins	1060	960	1.10

a) Thiabendazole and pesticide were mixed at the equitoxic ratio based on the LD₅₀, and the mixture was administered orally into mice (ddY, 4 weeks old, male, 19-25 g).

b) Values were calculated from Finney's equation.

c) Values were evaluated with Litchfield-Wilcoxon method.

d) The ratio of the expected LD₅₀ to the observed LD₅₀.

が他の化合物の毒性にも影響を与える可能性の有無を確認するために11種の農薬をモデルとして同時投与毒性試験を行った。まず各農薬のマウスへの単独投与実験を行い Table 3 の結果を得た。続いて、各食品添加物と各農薬とのマウスへの同時投与実験を行い Table 4~7 の結果を得た。ジフェニルは、BPMC、カルバリル、ダイアジノン、EPN、パラチオンの毒性を増加させ、DDVP、フェニトロチオン、マラチオン、メチルパラチオンの毒性を低減させた (Table 4)。また、オルトフェニルフェノールは、BPMC、カルバリル、ダイアジノン、EPN、パラチオンの毒性を増加させ、DDVP、フェニトロチオン、マラチオン、メチルパラチオンの毒性を低減させた (Table 5)。ピペロニルブトキサイドは、BPMC、カルバリル、ダイアジノン、EPN、パラチオン、ピレトリンの毒性を増加させ、DDVP、フェニトロチオン、マラチオン、ニコチン、メチルパラチオンの毒性を低減させた (Table 6)。さらに、チアベンダゾールは、BPMC、カルバリル、ダイアジノン、EPN、パラチオンの毒性を増加させ、DDVP、フェニトロチオン、マラチオン、ニコチン、メチルパラチオンの毒性を低減させた (Table 7)。このように農薬のなかには防カビ剤や防虫剤と混合されることによりその毒性に変動が生じるものがあることが明らかになった。毒性が増強される BPMC、カルバリル、ダイアジノン、EPN、パラチオンなどはチトクローム P-450 を中心とする薬物代謝酵素系によって解毒されると考えられる^{11),12)}。そしてその代謝系が防カビ剤や防虫剤による影響を受け解毒されにくくなるため毒性が強くなると推定された。一方、毒性が弱くなるDDVP、フェニトロチオン、マラチオン、メチルパラチオンは、いずれも二つのメチル基を持つ有機リン剤であった。細胞質に存在するグルタチオン-S-アルキルトランスフェラーゼの特異性は二つのメチル基を持つ有機リン剤に高いと報告されている^{13),14)}。これらの有機リン剤の毒性の低下の一因として、この酵素と薬物代謝系酵素系に対する防カビ剤や防虫剤の影響力の違いが推察された。また、マラチオンは、影響を受けにくいと考えられる細胞質のカルボキシエステラーゼによる解毒作用¹⁵⁾も毒性低下の一因であろうと思われた。

Keplinger らは、100 種類を越える化合物の同時投与毒性試験の結果を検討し、毒性の増加又は低減作用の判断基準に考察を加えている⁴⁾。そして、LD₅₀ の期待値と実測値の比1.00を判断の中心 (相加的) と見るよりも、経験的に0.90程度の比率を中心とみなす方が良いと述べている。毒性試験における用量反応曲線 (投与量対死亡率) は、原点を通る直線ではないことなどを考えると0.90程度の比は毒性の低減を示すものではなく、また1.00という比は相加的というよりも毒性がやや強くあらわれる傾向があると考えた方が妥当であるように思われた。いずれにしても今回実験を行った農薬のなかには防

カビ剤や防虫剤との同時投与によってその毒性に変化を生じるものがあつた。そして、防カビ剤や防虫剤の影響を受けて毒性に変化を生じる化合物はこの他にも存在する可能性があると考えられた。

要 約

防カビ剤及び防虫剤を農薬と同時にマウスに経口的に投与し、急性毒性を観察し次のような結果を得た。

- 1) ジフェニルは、BPMC、カルバリル、ダイアジノン、EPN、パラチオンの毒性を増加させた。
- 2) ジフェニルは、DDVP、フェニトロチオン、マラチオン、メチルパラチオンの毒性を低下させた。
- 3) オルトフェニルフェノール、チアベンダゾール及びピペロニルブトキサイドも、ジフェニルと同様に農薬の毒性を変化させた。

なお、本研究の一部は第5回国際農薬化学会議 (1982年8月、京都) において発表した。

文 献

- 1) 一色賢司, 宮田一正, 松井重樹, 堤 将和, 渡辺忠雄: 食衛誌. 24, 161~165 (1983).
- 2) 森 陽, 菅家祐輔: “食品衛生の生物科学” p. 33~42 (1982) 三共出版.
- 3) Franklin, M. R.: Environ. Health Perspectives 14, 29~37 (1976).
- 4) Keplinger, M. L., Deichman, W. B.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 10, 586~595 (1967).
- 5) Smyth, H. F. Jr., Weil, C. S., West, J. S., Carpenter, C. P.: *ibid.* 17, 498~503 (1970).
- 6) Finney, D. J.: “Probit Analysis, 2nd ed.” p. 131~136 (1952) Cambridge Univ. Press, Cambridge, England.
- 7) Litchfield, J. T. Jr., Wilcoxon, F.: J. Pharmacol. Exp. Therap. 96, 99~113 (1949).
- 8) Wiebkin, P., Fry, J. R., Jones, C. A., Lowing, R., Bridges, J. W.: Xenobiotica 6, 725~743 (1976).
- 9) Hodgson, E., Philpot, R. M.: Drug Metab. Rev. 3, 231~301 (1974).
- 10) Wilson, C. G., Parke, D. V., Green, J., Cawthorne, M. A.: Xenobiotica 9, 343~351 (1979).
- 11) Eto, M.: “Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry” p. 158~204 (1974) CRC Press Inc., Cleveland, Ohio, U. S. A..
- 12) 山下恭平, 水谷純也, 藤田稔夫, 丸茂晋吾, 江藤守総, 高橋信考: “農薬の科学” p. 161~179 (1979) 文永堂.
- 13) Fukami, J., Shishido, T.: J. Econ. Entomol. 59, 1338~1346 (1966).
- 14) Levine, B. S., Murphy, S. D.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 40, 393~406 (1977).
- 15) Matsumura, F., Ward, C. T.: Arch. Environ. Health 13, 257~269 (1966).