

## クロロネブの毒性試験の概要

デュボン ジャパン リミテッド  
農業用製品事業 企画・開発部

### 薬剤の概要

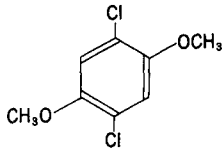
クロロネブは1965年（昭和40年）に種子消毒剤及び土壌殺菌剤として米国デュボン社によって開発された。国内では1974年（昭和49年）より、クロロネブ65%を含む水和剤（商品名：デュボンターサン SP 水和剤）として芝の主要病害防除に対して公的な生物効果の委託試験を実施し、1981年（昭和56年）の登録と同時に上市、芝専用の散布剤として現在に至っている。

本剤の物理化学的性質を以下に示す。

一般名：クロロネブ、chloroneb

化学名：1,4-ジクロロ-2,5-ジメトキシベンゼン  
(1,4-dichloro-2,5-dimethoxybenzene)

構造式：



分子式：C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

分子量：207.06

外 観：白色結晶状固体

比 重：1.66g/ml

融 点：133~135℃

沸 点：268℃

蒸 気 圧：3x10<sup>-3</sup>mm Hg (25℃)

溶 解 度：水-8 (ppm)、塩化メチル-13.3%、  
(25℃) ジメチルホルムアミド-11.8%、  
アセトン-11.5%、  
キシレン-8.9%

分配係数 (n-オクタノール/水)：1.9

安 定 性：常温・中性下で極めて安定、水や通常の有機溶媒中で安定、湿った土中で微生物の分解を受ける。

本剤の各種毒性試験結果を以下に示す。

### 急性毒性試験

検体	動物	投与経路	性別	LD50 (mg/kg)	試験機関 (報告書作成年)
原体	ラット	経口	♂♀	>8,000	動物繁殖研究所 (1978年)
		皮下	♂♀	>8,000	
		腹腔	♂/♀	6,950/7,250	
	マウス	経皮	♂♀	>2,800	バイオダイナミクスインク (1990年)
		経口	♂♀	>8,000	動物繁殖研究所 (1978年)
		皮下	♂♀	>8,000	
腹腔	♂♀	>8,000			
製剤	ラット	経口	♂♀	>11,000	米国デュボン社 ハスケル研究所 (1965年)
	マウス		♂♀	>7,100	バイオダイナミクスインク (1990年)
	ウサギ	経皮	♂	>5,000	米国デュボン社 ハスケル研究所 (1964年)

## 刺激性・感作性試験

クロロネブの眼及び皮膚に対する刺激性について白色種ウサギ及びDuncan-Hartley系モルモットを用いて検討した。

### 1. 眼一次刺激性試験

右眼を処理眼、左を対照眼としてクロロネブ50mgを点眼し、洗眼群及び非洗眼群の角膜、虹彩、結膜について投与4日後まで観察した。

その結果、クロロネブによる角膜、虹彩及び結膜への刺激性変化は、洗眼群、非洗眼群ともに認められず、刺激性はないもの(陰性)と判断された。

(米国デュボン社ハスケル研究所、1979年)

### 2-1. 皮膚一次刺激性試験

ウサギの背部を刈毛し、健常皮膚及び擦過皮膚各2ヶ所(1インチ平方)にクロロネブ0.5mlを24時間塗布し、塗布部分の刺激性変化(紅斑、浮腫)の有無について塗布終了後72時間目まで観察した。その結果、Draize法評価により、クロロネブはウサギの皮膚に対して弱い刺激性を有するものと判断された。

(米国デュボン社ハスケル研究所、1979年)

### 2-2. 皮膚一次刺激性及び皮膚感作性試験

Duncan-Hartley系モルモットを用いて、クロロネブの皮膚一次刺激性及び皮膚感作性について検討した。皮膚一次刺激性については、クロロネブの8%及び80%DMP(ジメチルフタレート)懸濁液0.05mlをモルモットの肩部の剃毛処理した健常皮膚に塗布し行った。また皮膚感作性についてはクロロネブの1.0%DMP懸濁液を週に1回、0.1mlを、計4回仙骨皮内注射し、更にその12日後に、塗布により誘発を行った。その後、両試験のそれぞれに於いて誘発24時間及び48時間後に肉眼的に適用部の紅斑及び浮腫の有無等を観察した。その結果、クロロネブによる皮膚一次刺激性及び皮膚感作性は全く認められなかった。従って、クロロネブは本試験条件下で陰性であると判断された。

(米国デュボン社ハスケル研究所、1980年)

## 慢性毒性試験

### 1. ラットに於ける24ヶ月慢性毒性試験

クロロネブを0,100,500及び2,500ppmの濃度で含有した飼料を1群雌雄各36匹のChR-CD系ラットに24ヶ月間摂食させた。(尚、検体は試験開始から34週目まではクロロネブ75%水和剤、それ以降終了時までにはクロロネブ65%水和剤含有飼料を摂取させた。)その結果、全投与期間を通して、検体投与に関連した中毒症状は認められず、死亡率に於いても対照群と各投与群とで差異を認めなかった。

投与後13週目から52週目にかけて2,500ppm投与群の雌で対照群に比して有意な体重増加抑制が認められ、後半の1年間では、2,500ppm投与群の雌雄両性において、体重増加抑制が認められた。摂餌量については、2,500ppm投与群の雌で試験の最初の1年間、対照群に比して有意な減少が認められた。

血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査に於いてはいずれも検体投与による変化は認められなかった。投与開始1年後及び試験終了時の臓器重量測定では、2,500ppm投与群の雌で対照群と比較して体重増加抑制に起因すると思われる心重量及び脾重量の低下、更に相対脳重量(対体重比)、相対甲状腺重量及び相対腎重量の有意な増加が認められた。

又、肉眼的病理検査では検体投与に関連する変化は認められず、組織病理学的検査に於いては、2,500ppm投与群の雌で12ヶ月時に軽度の甲状腺機能亢進が認められただけであった。しかしながら、24ヶ月時の検査では、全く認められなかった。以上の結果より、クロロネブのラットに於ける24ヶ月間混餌投与試験による最大無作用量は、2,500ppm投与群で体重増加抑制及び摂餌量減少が認められたのを考慮して500ppm(9.96mg/kg/日)であると判断した。

(米国ヘイズルトン研究所、1967年)

### 2. イヌに於ける24ヶ月慢性毒性試験

クロロネブを0,100,500及び2,500~10,000ppm(33週以降徐々に濃度を高くし、最大10,000ppmとし、86週以降再び7,500ppmに下げた。)の濃度で含有した飼料を1群雌雄各4匹のビーグル犬に24ヶ月間摂食させた。(尚、検体は試験開始から29週目まではクロロネブ75%水和剤、それ以降終了時までにはクロロネブ65%水和剤含有

飼料を摂取させた。)その結果、全投与期間を通して検体投与に関連した中毒症状及び死亡例は認められず、2,500~10,000ppm投与群の雄雌で投与後59週から85週時に体重減少が認められたのみで、摂餌量及び血液学的検査に関しても対照群に比べて有意差は認められなかった。

血液生化学的検査では、投与後18ヶ月時に2,500~10,000ppm投与群の3例で血清グルタミン酸-ピルビン酸アミノ基転移酵素及び/又はアルカリフォスファターゼ活性値の上昇が認められた。尿検査及び肉眼的検査では検体投与による変化は認められなかった。臓器重量については2,500~10,000ppm投与群で対照群に比べて肝重量及び相対肝重量(対体重比)の中等度の増加、又、副腎及び相対副腎重量の軽度の増加が認められた。

病理組織学的検査では、2,500~10,000ppm投与群に於いて甲状腺の機能亢進、肝の色素沈着及びカタル性胃炎が認められた。以上の結果より、クロロネブのイヌに於ける24ヶ月間摂餌投与慢性毒性試験による最大無作用量は2,500~10,000ppm投与群に於ける体重減少、血液生化学的検査値の上昇及び臓器重量の増加等を考慮して、500ppm(13.35mg/kg/日)であると判断した。

(米国ヘイズルトン研究所、1967年)

## 繁殖性試験

### ○ラットに於ける3世代繁殖毒性試験

クロロネブを0、100及び500ppmの濃度で含有した飼料を雌雄各群それぞれ20及び10匹のChR-CDラットに3世代(P、F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>)にわたり自由摂取させた。

P、F<sub>1</sub>及びF<sub>2</sub>の各世代で2度の交配を行い、次世代を得た。第2産仔動物の一部を離乳後選出し、次世代の親動物とした。F<sub>3</sub>世代の第2産仔動物の対照群及び各投与群より、それぞれ雌雄10例の離乳ラットを選出し、肉眼的及び病理組織学的検査を実施した。その結果、対照群を含む全投与群に於いて、その交配能力、繁殖能力及び病理組織学的検査結果に検体投与に関連した変化は認められなかった。以上の結果より、クロロネブのラットに於ける3世代繁殖毒性試験による最大無作用量は500ppm以上であると判断した。

(米国ヘイズルトン研究所、1967年)

## 催奇形性試験

### ○ラットに於ける催奇形性試験

クロロネブを0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液に懸濁し、0、300、1,000及び3,500mg/kgの投与レベルで1群25匹のCrI:COBS®CD BR系ラットに妊娠後5日目から14日目までの10日間、毎日1回経口投与した。母体については、妊娠20日目に黄体数、着床数、生存及び死亡、吸収胎仔を検査、生存胎仔については外表異常、骨格異常及び内臓異常の有無を検査した。

その結果、母親動物に対する影響としては、1,000mg/kg投与群に於いて唾液分泌過多、腹部被毛の尿汚染、腹部の赤色滲出液及び脱毛が認められた。また体重増加量及び飼料摂取量では、母動物の全検体投与群に於いて、体重増加抑制及び飼料摂取量の低下が認められ、特に1,000及び3,500mg/kg投与群では、妊娠20日目の帝王切開時まで体重増加抑制が続いた。胎仔については、検体投与によると思われる影響は何ら認められなかった。以上の結果より本検体は最高投与量である3,500mg/kg/日投与に於いても胎仔に対して催奇形性を及ぼさないものと判断した。母親動物については、本試験の低薬量投与群である300mg/kg投与群で平均体重及び飼料摂取量の低下が認められたため最大無作用量は判定できなかった。(米国アーガスリサーチ研究所、1983年)

## 変異原性試験

### 1. DNA修復性

枯草菌の*Bacillus subtilis*の組換修復機構保持株(H-17)と欠損株(M-45)を用い、rec-assay法でクロロネブを20、100、200、500、1,000及び2,000µg/diskの濃度で処理した時のDNA損傷誘発性を検討した。尚、陰性対照及び陽性対照としてカナマイシン及びミトマイシンCをそれぞれ用いた。

その結果、最高濃度である2,000µg/diskに於いても両株に生育阻止が認められなかったことから、クロロネブのDNA損傷誘発性は陰性であると判断した。

(助残留農薬研究所、1978年)

### 2. 遺伝子突然変異原性

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌2株(TA98、TA100

株)を用い、ラットの肝より調製した薬物代謝酵素系(S-9Mix)の存在下及び非存在下でAmesらの方法により、10、50、100、500、1,000及び5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の濃度で処理したときの遺伝子突然変異性を検討した。尚、陽性対照として2-Aminoanthracene及びAF-2[2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide]を用いた。

その結果、薬物代謝酵素系の存在及び非存在にかかわらず最高濃度である5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ に於いても対照群に比べ復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、クロロネブの復帰変異誘発性は陰性であると判断した。(助残留農業研究所、1978年)

### 3. In Vitro 染色体異常誘発性

チャイニーズハムスターの卵巣(CHO)細胞を用い、代謝活性化系の存在下及び非存在下に於いて、クロロネブをそれぞれ333.3( $\text{ng}/\text{ml}$ )、1.0、3.3、10.0、33.3、100.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (非活性化系)及び6.25、12.50、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (活性化系)の濃度で処理した時の染色体異常誘発性を検討した。尚、陽性対照としてトリエチレンメラミン(非活性化系)及びシクロホスファミド(活性化系)を用いた。その結果、最高濃度である100.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に於いても異常を有する細胞数の増加が認められなかったことから、クロロネブの染色体異常誘発性は陰性であると判断された。

(米国リットンバイオネティックスインク、1981年)

## 一般薬理試験

### ○中枢神経系に対する作用

#### 1. 一般症状の観察

クロロネブを1,000、3,000及び10,000 $\text{mg}/\text{kg}$ の濃度で、Slc:ICR系雄マウスに経口投与し、投与前及び投与後30、60、120、180、240並びに300分後の一般症状をIrwinの多次元観察法に基づいて観察した。その結果、1,000 $\text{mg}/\text{kg}$ 投与群で有意な体温下降が認められたが、180分後には回復した。3,000 $\text{mg}/\text{kg}$ 投与群では、有意な体温下降、反応性(Reactivity)の低下、触反応(Touch Response)でのやや過敏な反応、振せん(Tremor)、興奮状態、攣縮(Twitch)及び握力(Grip tone)の低下が認められ、瞳孔径でも投与前値と比較して、縮小傾向がみられた。しかしながら、投与300分後には、攣縮及び振せんを除く殆どの症状が回復した。

### 2. 運動協調性に及ぼす影響並びに筋弛緩作用

#### a) ロータ・ロッド法

クロロネブを1,000、3,000及び10,000 $\text{mg}/\text{kg}$ の濃度でコーン油に懸濁させ、Slc:ICR系雄マウスに経口投与し、1分間に14回転する直径3cmの回転棒(Rota-rod treadmill)上に乗せ、1分以内に落下する動物を観察した。その結果、3,000 $\text{mg}/\text{kg}$ 投与群で10匹中最高4匹の落下例が認められ、これらの動物には振せんが見られた。

#### b) 斜板法

クロロネブを1,000、3,000及び10,000 $\text{mg}/\text{kg}$ の濃度で、Slc:IRC系雄マウスに経口投与し、30度に傾斜したスリガラス板上に乗せ、10秒以内に落下する動物数を観察した。その結果、全ての検体投与群で斜板から落下する動物は認められなかった。

### 3. ペントバルビタール睡眠に及ぼす影響

クロロネブを100、300及び1,000 $\text{mg}/\text{kg}$ の濃度で、Slc:ICR系雄マウスに1回経口投与した後、120分後にペントバルビタール50 $\text{mg}/\text{kg}$ を腹腔内投与し、正向反射の消失から回復までの時間を睡眠時間として測定した。またクロロネブを1,000 $\text{mg}/\text{kg}$ の濃度で1日1回ずつ4日間連続投与し、上記同様に観察した。その結果、検体の1回経口投与では、300及び1,000 $\text{mg}/\text{kg}$ 投与群で、睡眠時間の延長がみられた。4日間連続投与群に於いても睡眠時間の延長が認められたが1回投与群に比べて延長の程度は少なかった。

### ○肝機能に及ぼす影響

クロロネブを1,000、3,000及び10,000 $\text{mg}/\text{kg}$ の濃度で、Slc:Wistar/ST系雄ラットに経口投与した後、120分後に1% BSP生理食塩液を静脈内投与した。BSP投与15分後に、腹部大動脈より採血し、血清BSP濃度を算出した。その結果、いずれの検体投与群に於いても対照群と比較して血清BSP濃度に差は認められなかった。

以上の結果より、クロロネブの中枢神経系への興奮作用及び体温下降作用、並びにペントバルビタール睡眠の増強作用と、ペントバルビタールの代謝への影響の可能性が示唆された。

(徳臨床医科学研究所、1990年)

## 要 約

クロロネブについて、各種毒性試験を実施し、安全性を評価した。その結果、ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験に於いて、一時的に弱い刺激性が認められたのみで、経口／経皮毒性も非常に低く、急性中毒の発現を示唆する有意な症状も認められず普通物に該当した。慢性毒性試験に於いても催腫瘍性は認められず、その他の繁殖性、催奇形性及び変異原性試験に於いても特記すべき毒性症状の発現は認められなかった。クロロネブは魚毒性も低く、その使用方法及び一般的注意事項を遵守すれば、環境及び作業者への安全性の高い薬剤であり、有用な農業資材の1つとして評価されている。

### 問合せ

デュポン ジャパン リミテッド

農業用製品事業 企画・開発部

〒105 東京都港区虎ノ門2丁目10番1号

新日鉱ビル デュポンタワー