

DBN の毒性試験の概要

アグロ・カネショウ株式会社
北興化学工業株式会社

薬剤の概要

DBN は、1960年にオランダの Philips Duphar 社で発見された除草剤である。日本では、水稻の除草剤として開発され、当時問題になっていたマツバイに卓効を示すことが確かめられ、1963年、水和剤が農薬登録された。さらに、「いぐさ、麦類」にも適用拡大された。

水田における除草剤の使用剤型として粒剤化が望まれるところから、粒剤化の研究をすすめ、1965年に「2.5%粒剤」を登録した。

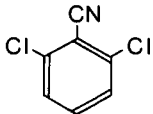
一方、果樹園、桑園等では、接触型の茎葉散布の液剤で防除できない宿根性の多年生雑草が増加したところから、これを防除できる粒剤が望まれ、1972年に「6.7%粒剤」を登録した。

本剤の化学構造式および物理化学的性質は、以下に示すとおりである。

一般名：ジクロロベニル

化学名：2, 6-dichlorobenzonitrile (IUPAC)

構造式：



分子式：C₇H₃Cl₂N

分子量：172.02

外 観：芳香臭を伴った白色結晶

比 重：1.57

融 点：145~146℃

沸 点：270℃

蒸気圧：5.5×10⁻⁴mm Hg (25℃)

溶解度(g/l)：水 0.018、アセトン 50、メタノール 28、エタノール 50、二塩化メチレン 100、キシレン 50、ベンゼン 50、テトラヒドロフラン 90、ジメチルホルムアミド 167、ジメチルアミン 30

分配係数：(n-オクタノール/水)：logPow=2.66

以下、本剤を用いた各種の毒性試験結果をとりまとめて報告する。

急性毒性試験

DBN 原体、DBN45%水和剤およびDBN6.7%粒剤のラット、マウスに対する種々の投与経路における急性毒性試験結果は、表1のとおりである。

表1 急性毒性試験結果

検 体	投与経路	動物種	性	LD50(mg/kg)	試験機関	報告書作成年
原 体	経 口	ラット	♂♀	>2,150	P.Duphar	1962年
			♂	2,140	P.Duphar	1962年
	♀	2,100				
	経 皮	ラット	♂♀	>5,000	東邦大学	1979年
45%水和剤	経 口	ラット	♂	5,420	Biosearch Inc.	1983年
			♀	4,630		
	経 口	マウス	♂	2,500	東京歯科大学	1962年
6.7%粒剤	経 口	ラット	♂♀	>5,000	Duphar B.V.	1983年
			♂	7,249		
	♀	12,781				
	経 皮	ラット	♂♀	>2,000	Duphar B.V.	1985年

(Biosearch Inc. 1983年)

眼および皮膚刺激性試験**1. ウサギを用いた眼粘膜一次刺激性試験**

水和剤：9匹のNew Zealand 白色ウサギの片眼に検体0.1gを適用し、3匹は30秒後に洗眼した。適用後1時間、1, 2, 3, 4および7日目に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察した。

その結果、角膜、虹彩の刺激性変化は、洗眼群、非洗眼群ともに認められなかった。結膜の刺激性変化は軽度のみられ洗眼群では、非洗眼群に比べて、その持続時間は短縮された。

以上の結果から、DBN 水和剤は、ウサギの眼粘膜に対してわずかな刺激性があるものと思われる。

(Biosearch Inc.1983年)

粒剤：6匹のNew Zealand 白色ウサギの片眼に検体0.1gを適用し、1, 24, 48および72時間毎に角膜、虹彩、結膜の刺激性変化を観察した。

その結果、投与後1時間では1例の虹彩および全例の結膜に軽度な刺激性変化が認められ、虹彩にみられた変化は24時間後には消失し、結膜にみられた変化は72時間には消失した。

以上の結果から、DBN 粒剤は、ウサギの眼粘膜に対して極めて軽度な刺激性があるものと考えられる。

(RCC NOTOX 1990年)

2. ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

原体：3匹のNew Zealand 白色ウサギの剃毛した背部皮膚に検体0.5gを1%トラガカント懸濁液で湿らせて塗布し、適用4時間後に除去した。検体除去30~60分、24, 48および72時間後に塗布部位の刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)を観察した。

その結果、全く異常は認められず、DBN 原体は、皮膚に対する刺激性はないと判断された。

(Duphar B.V. 1985年)

水和剤：6匹のNew Zealand 白色ウサギの剃毛した背部皮膚に検体0.5gを適用し、適用4時間後に除去した。検体除去30~60分、24, 48および72時間後に塗布部位の刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)を観察した。

その結果、24時間後まで、軽い紅斑が認められたが、48時間後には消失した。

以上の結果から、DBN 水和剤は、弱い皮膚刺激性があるものと思われる。

粒剤：3匹のNew Zealand 白色ウサギの剃毛した背部皮膚に検体0.5gを1%トラガカント懸濁液で湿らせて塗布し、適用4時間後に除去した。検体除去30~60分、24, 48および72時間後に塗布部位の刺激性変化(紅斑、痂皮、浮腫)を観察した。

その結果、皮膚適用局所に異常は認められず、DBN 粒剤は、皮膚に対する刺激性はないと判断された。

(Duphar B.V. 1985年)

皮膚感作性試験

水和剤：Hartley 系雄モルモット(1群20匹、陽性対照群10匹)を用い Buehler 法により検討した。

感作は動物の刈毛した左腹側部に検体50%懸濁液0.5mlを6時間閉塞貼付して行なった。一方、陽性対照群には、1% DNCB を0.5gを同様に適用した。また、対照群には、等量の溶媒をそれぞれ適用した。これらの感作処置を7日ごとに合計3回行なった。

誘発は、最終感作の14日後に動物の刈毛した右腹側部に検体2%懸濁液または0.1% DNCB 各0.5mlを24時間閉塞貼付して行なった。誘発処置24および48時間後に、適用部位の紅斑および浮腫の有無等を観察した。

その結果、検体感作群の24時間および検体対照群の24時間後の観察においていずれも20例中各1例にまばらな軽い紅斑が認められたのみであった。陽性物質感作群では軽度から強度の紅斑が全例に認められた。

以上の結果から、DBN 水和剤の皮膚感作性は陰性であると判断された。

(臨床医科学研究所 1992年)

粒剤：Hartley 系雌モルモット(1群20匹)を用い Maximisation 法により検討した。

感作は、動物の刈毛した背部に、①フロイドのコンプリートアジュバントと注射用水を等量混合した試料、②注射用水中検体1%濃度とした試料、③フロイドのコンプリートアジュバントと注射用水の等量混合液中検体1%の濃度とした試料を各0.1ml皮内注射した。注射1週間後、同部を再び刈毛して、検体50%蒸留水を48時間貼付した。対照群には同量の検体を含まない試料を投与した。

誘発は、最後感作の14日後に検体10または20%懸濁液を24時間貼付した。

その結果、20匹中9匹に対照群より顕著な皮膚反応

が認められた。

以上の結果から、DBN 粒剤は、中等度の皮膚感作性があると判断された。

(Huntingdon Research Centre 1986年)

亜急性毒性試験

1. ラットを用いた亜急性毒性試験

1群雌雄各12匹の Wistar 系ラットに DBN 原体を 100, 1000, 3000, および10000ppmの濃度で混入した飼料を90日間にわたって自由摂取させた。一般症状および死亡の有無を観察し、体重を測定した。投与終了後に尿検査、血液学的検査を行ない、解剖後に臓器重量測定、肉眼的病理検査、病理組織学的検査を行なった。

その結果、一般状態の異常は、全期間を通じ認められず、死亡率は、3000ppm以下の投与群で検体による影響はみられなかった。3000および10000ppm投与群では体重増加抑制がみられた。血液学的検査では3000および10000ppm投与群においてヘモグロビン量、軽度のヘマトクリット値の低下がみられた。尿検査では、全群において投与による影響はみられなかった。臓器重量において1000ppm以上の投与群で、肝臓、腎臓、精巣の体重比が増大した。病理組織学的検査では、3000および10000ppm投与群において、肝細胞の顆粒状腫大、小葉中心性実質細胞空腔化、脂肪集積が認められ、10000ppm投与群では、壊死、胆管増生も認められた。

以上の結果から、本試験における最大無作用量は、100ppmと判断された。

(Univ.of Rochester school of Medicine and Dentistry 1961年)

2. イヌを用いた亜急性毒性試験

1群雌雄各2匹の純系ビーグル犬に DBN 原体を50, 150および450ppmの濃度で飼料に混入し、90日間毎日摂取させた。一般症状および死亡の有無を観察し、体重、摂餌量を測定した。6週間後及び投与終了後に血液学的検査、血液生化学検査、尿検査を行ない、解剖後に臓器重量測定、肉眼的病理検査、病理組織学的検査を行なった。

その結果、全期間を通じ一般状態の異常は認められず、死亡もみられなかった。体重変化、摂餌量においても投与による影響は、みられなかった。血液学的検査、尿検査において投与による影響はみられなかった

が、血液生化学検査では、450ppm投与群で ALP、GPT のわずかな増加がみられ、臓器重量検査では、450ppm投与群で肝重量および腎重量の増加がみられ、150ppm投与群で肝重量の増加がみられた。病理組織学的検査では、検体投与による影響が認められなかった。

以上の結果から、本試験における最大無作用量は、50ppm (1.6mg/kg/日) と判断された。

(TNO/CIVO 1967年)

慢性毒性及び発がん性試験

1. イヌを用いた慢性毒性試験

1群雌雄各4匹の純系ビーグル犬に DBN 原体を20, 50および350ppmの濃度で飼料に混入し、24カ月間毎日摂取させた。一般症状および死亡の有無を観察し、体重、摂餌量を測定した。投与13, 26, 52, 78週および投与終了後に血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査を行ない、解剖後に臓器重量測定、肉眼的病理検査、病理組織学的検査を行なった。

その結果、全期間を通じ一般状態の異常は認められず、死亡もみられなかった。体重変化、摂餌量において投与による影響は、みられなかった。血液学的検査、尿検査において投与による影響はみられなかったが、血液生化学的検査で、350ppm投与群で ALP、GPT が増加し、これは、検体投与の影響とみられた。臓器重量測定では、350ppm投与群で肝臓、甲状腺の重量増加がみられた。病理組織学的検査において、350ppm投与群で多量のグリコーゲン蓄積をともなった小葉中心部肝細胞の腫大と軽い炎症がみられた。

以上の結果から、本試験における最大無作用量は、50ppm (1.3mg/kg/日) と判断された。

(TNO/CIVO 1969年)

2. ラットを用いた慢性毒性・発がん性試験

1群雌雄各70匹の Fischer F344系ラットに DBN 原体を50, 400および3200ppmの濃度で混入した飼料を2カ年にわたって自由摂取させた。一般症状および死亡の有無を観察し、体重、摂餌量、飲水量を測定し、投与52, 78週および投与終了後に血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査を行ない、解剖後に臓器重量測定、肉眼的病理検査、病理組織学的検査を行なった。

その結果、一般状態では、3200ppm投与群で、貧血、粗毛、瘦削などの異常を示す動物数が増え、死亡率も

増加した。体重変化では、400および3200ppm投与群で体重増加抑制がみられた。血液学的検査では、3200ppm投与群でヘマトクリット値、ヘモグロビン量の低下がみられた。血液生化学的検査では、3200ppm投与群で、総コレステロールの増加、尿素窒素の増大、無機リンの増加、血糖の減少、アルブミンの減少がみられた。尿検査では、3200ppm投与群で尿量の増加、これと平行する比重の減少、糖の増加、色調の黄褐色化がみられた。臓器重量測定では、3200ppm投与群で肝臓、腎臓、精巣／卵巣、甲状腺、副腎の重量増加、400ppm投与群で肝臓の重量体重比の増加がみられた。病理組織学的検査では、3200ppm投与群で肝臓の脂肪変性、慢性腎症、膵臓に好酸性細胞の出現、上皮小体の肥大、骨異栄養症、胃粘膜・腎実質・血管等の石灰沈着がみられ、400ppm投与群で慢性腎症、上皮小体の肥大がみられた。

以上の結果から、本試験における最大無作用量は、50ppm (3.16mg/kg/日) と判断された。また、催腫瘍性はないものと判断された。

(食品農薬品安全性評価センター 1983年)

3. ハムスターを用いた発がん性試験

1群雌雄各50匹のゴールデンハムスターにDBN原体を5, 26, 132および675ppmの濃度で混入した飼料を88週間にわたって自由摂取させた。一般症状および死亡の有無を観察し、体重、摂餌量を測定し、投与52, 78週および投与終了後に血液学的検査を行ない、解剖後に臓器重量測定、肉眼的病理検査、病理組織学的検査を行なった。

その結果、一般状態で異常は認められず、死亡率も変化がなかった。体重変化において675ppm投与群で体重増加抑制がみられた。臓器重量測定では、675ppm投与群で肝重量の増加がみられた。肉眼的病理検査では675ppm投与群での肝臓の微小陥没、脂肪組織の減少がみられた。病理組織学的検査では、675ppm投与群で肝細胞の腫大および副腎の皮質過形成が認められた。

以上の結果から、本試験における最大無作用量は、132ppm (9.39mg/kg/日) と判断された。また催腫瘍性はないものと判断された。

(Huntingdon Research Centre 1991年)

繁殖性に及ぼす影響および催奇形性試験

1. ラットを用いた繁殖性試験

1群雌雄各30匹のCrl; CD(SD)BR系ラットを用い、DBN原体を60, 350および2000ppmの濃度で混入した飼料を与えて二世代(P, F1)にわたって飼育し、繁殖性に及ぼす影響を調べた。

その結果、2000ppm投与群で体重増加抑制がみられた。PおよびF1世代ともに交尾率、妊娠率、妊娠期間、出生率、生存率等に検体投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験における最大無作用量は、60ppmと判断された。

(Hazleton Laboratories 1988年)

2. ラットを用いた催奇形性試験

1群25匹のWistar系妊娠ラットにDBN原体を1%トラガカントゴム溶液中に懸濁させ、20, 60および180mg/kg/日の投与量を、妊娠6~15日に毎日1回強制経口投与した。妊娠21日目に帝王切開して妊娠状況を観察するとともに胎仔の外表面、内臓および骨格検査を行なった。

その結果、60および180mg/kg/日の投与群で親動物の体重増加抑制および摂餌量の低下がみられた。胎仔の奇形発生率に有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、母動物における最大無作用量は、20mg/kg/日であり、母動物に影響のある最高投与量の180mg/kg/日においても胎仔に対して催奇形性はないものと判断された。

(TNO/CIVO 1984年)

3. ウサギを用いた催奇形性

1群18匹のニュージーランドホワイト系妊娠ウサギにDBN原体を1%トラガカントゴム溶液中に懸濁させ、15, 45および135mg/kgの投与量を、妊娠7~19日に毎日1回強制経口投与した。妊娠29日目に帝王切開して妊娠状況を観察するとともに胎仔の外表面、内臓および骨格検査を行なった。

その結果、135mg/kgの投与群において母動物の体重増加抑制および摂餌量の低下がみられた。胎仔では、135mg/kg投与群においてのみ奇形胎仔の発現率が有意に高かった。これは毒性の強く現われた母動物から得られた胎仔に奇形が多く認められたためであり、母動物に体する毒性のためと考えられた。

以上の結果から、最大無作用量は母動物および胎仔とともに45mg/kgと判断された。

(Hazleton Laboratories 1989年)

変異原性試験

1. 復帰変異試験

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌5株(TA100, TA1535, TA98, TA1537, TA1538)およびトリプトファン要求性の大腸菌1株(WP2 hcr)を用い、ラット肝臓から調製した薬物代謝酵素系の存在下および非存在下でAmesらの方法により変異原性を検定した。DBN原体はDMSOに溶解し5, 10, 50, 100, 500, 1000および5000 μg /プレートの濃度を用いた。

その結果、薬物代謝酵素系の有無にかかわらず、いずれの変異株においても対照と比べて復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上の結果から、DBN原体の復帰変異誘発性は陰性であると判断された。(残留農業研究所 1981年)

2. *in vitro* 細胞遺伝学的試験

ヒトリンパ球を用い、代謝活性化酵素系の存在下および非存在下で染色体異常誘発性を検討した。DBN原体の処理濃度は、0.1, 0.5および1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。

その結果、薬物代謝酵素系の有無にかかわらず、いずれの濃度においても染色体異常発現率の有意な増加はみられなかった。

以上の結果から、DBN原体の染色体異常誘発性は陰性であると判断された。

(Huntingdon Research Centre 1984年)

3. *in vitro* 細胞遺伝学的試験

チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)を用い、薬物代謝酵素系存在下および非存在下で染色体異常誘発性を検討した。DBN原体の処理濃度はあらかじめ実施した細胞増殖抑制試験の結果より、薬物代謝酵素系非存在下では30, 45, 60, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、薬物代謝酵素系存在下では10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。

その結果、薬物代謝酵素系の有無にかかわらず、染色体異常細胞の発現率に有意な増加は認められなかった。

以上の結果から、DBN原体の染色体異常誘発性は陰性であると判断された。

(Hazleton Laboratories 1990年)

4. DNA修復試験

枯草菌の組換え修復機構保持株(H-17)および欠損株(M-45)を用い、Rec-assay法でDNA損傷誘発性を検討した。DBN原体は、DMSOに溶解し、濃度は20~5000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ とした。

その結果、いずれの濃度においても両菌株ともに生育阻止帯を誘起しなかった。

以上の結果から、DBN原体にはDNA損傷誘発性がないものと判断された。(残留農業研究所 1981年)

一般薬理試験

ラット、ネコ、ウサギ、モルモットを用い、下記試験を実施した。

①循環器系及び呼吸器系に及ぼす影響(心電図、心拍数、動脈血圧、呼吸数/ラット、同/ネコ、心拍数、心収縮力、冠動脈血流量/ウサギ摘出心臓、心拍数、心収縮力、冠動脈血流量/ウサギ耳介)

②泌尿生殖器系に及ぼす影響(尿排泄量/ラット、自動運動/ウサギ摘出子宮、精管運動/モルモット摘出精管)

③自律神経系に及ぼす影響(自動運動/モルモット摘出回腸およびウサギ摘出小腸、横隔膜攣縮性/ラット摘出横隔膜)

④中枢神経系に及ぼす影響(脳波/ネコ、鎮痛/ラット)

その結果、DBNの麻酔作用に因る循環器系特に心臓に対する抑制、末梢血管の拡張、尿量の減少、平滑筋運動の抑制等がみられた。

(Shell Research Ltd. Tunstall Laboratories 1964年)

要約

DBNの安全性評価を行なうため各種毒性試験を実施した。その結果、本剤はラットおよびマウスに対する急性毒性がきわめて低く、普通物に該当することが示唆された。眼に対する刺激性は、きわめて軽度であった。皮膚に対する刺激性は、水和剤では弱い刺激性があり、粒剤では刺激性がなかった。皮膚感作性は、水和剤では陰性であり、粒剤では中等度の皮膚感作性であった。亜急性および慢性毒性・発がん性試験では高・中用量群で、体重増加抑制や一部臓器重量の変化がみられ、血液学的検査、血液生化学検査でも項目の一部

に変化がみられた。病理組織学的検査では、特に問題となるような病変はみられず、催腫瘍性も認められなかった。また繁殖性および催奇形性にも異常はなかった。変異原性についても全く陰性であった。一般薬理試験について特に低薬量では異常は認められなかった。

DBN は、昭和54年3月20日付で環境庁告示された登録保留基準値が、米0.05ppm、麦・雑穀0.05ppm、果実0.2ppmと設定された。DBN は定められた使用基準を遵守すれば、安全性が高い薬剤であり、農業資材として有用であると考えられる。

問合せ

アグロ・カネショウ株式会社

〒100 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

北興化学工業株式会社

〒103 東京都中央区日本橋本石町4丁目4番20号