

トリクロピルの毒性試験の概要

ダウ・エランコ日本株式会社 研究開発本部登録部

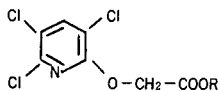
薬剤の概要

トリクロピルは、既登録のピリジン環をもつホルモン系の除草剤である。本剤は、米国ザ・ダウ・ケミカル・カンパニーで1963年に発見され、わが国においては、昭和51年より開発を公的に開始し、クズ、かん木、カタバミ、チドメグサなど多くの雑草に効果を示すことを確認した。

本剤の化学構造と物理化学的性質は以下に示す通りである。

化学名：3、5、6-トリクロロ-2-ピルジルオキシ酢酸(酸)、トリエチルアンモニウム=3、5、6-トリクロロ-2-ピルジルオキシセタート(アミン塩)およびブトキシエチル-3、5、6-トリクロロ-2-ピルジルオキシセタート(ブトキシエチルエステル)
 ザイトロンアミン液剤にはトリクロピルアミン塩が、ザイトロン微粒剤にはブトキシエチルエステルが使用されている。

化学構造：



R：H(酸)

R：HN⁺(C²H₅)₃(アミン塩)および

R：CH₂-CH₂O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃
 (ブトキシエチルエステル)

分子量：256.48(酸)

357.67(アミン塩)

356.68(ブトキシエチルエステル)

性状：線毛様類白色固体(酸)
 類白色結晶状固体(アミン塩)
 淡黄色透明油状液体
 (ブトキシエチルエステル)

物性：融点 148~150℃(酸)
 119~121℃(アミン塩)
 沸点 149~150℃/0.15mm Hg
 (ブトキシエチルエステル)

溶解度：(アミン塩)

水	2100 g/l
ベンゼン	54 g/l
アセトン	65 g/l
クロロホルム	667 g/l
アセトニトリル	129 g/l
n-ヘキサン	0.35 g/l
キシロール	16 g/l
(ブトキシエチルエステル)	
水	0.0023 g/l
有機溶媒	易溶

ここでは本剤の登録取得のために実施された安全性評価のための各種毒性試験成績について、とりまとめて報告する。

急性毒性試験(経口、経皮および吸入)

種々の投与経路による急性毒性試験を行ない、表1に示す結果を得た。

表1

検体	動物種	投与経路	供試数	LD ₅₀ (mg/kg)	試験機関	報告年
原体 (酸)	ラット	経口	♂・♀10	♂1030 ♀1110	日本実験医学研究所・慶応大学	1978年
	ラット	経皮	♂・♀10	♂♀>5000	日本実験医学研究所・慶応大学	1978年
	マウス	経口	♂・♀10	♂935 ♀700	日本実験医学研究所・慶応大学	1978年

原体 (エステル)	ラット	経口	♂・♀10	♂1050 ♀980	日本実験医学研究所・慶応大学	1978年
	ラット	経皮	♂・♀2	♂♀>3980	ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー	1973年
	ラット	吸入	♂・♀5	♂♀>4.8mg/ℓ	ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー	1988年
	マウス	経口	♂・♀10	♂850 ♀900	日本実験医学研究所・慶応大学	1978年
原体 (アミン塩)	ラット	経口	♂・♀10	♂1350 ♀1530	日本実験医学研究所・慶応大学	1978年
	ラット	経皮	♂・♀2	♂♀>3980	ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー	1973年
	マウス	経口	♂・♀10	♂1245 ♀1020	日本実験医学研究所・慶応大学	1978年
製剤 (アミン液剤)	ラット	経口	♂・♀5	♂2574 ♀1847	ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー	1988年
	ウサギ	経皮	♂・♀5	♂♀>2000	ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー	1988年
	ラット	吸入	♂・♀5	♂♀>2.6mg/ℓ	ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー	1988年
	マウス	経口	♂・♀5	♂1175 ♀1215	ボゾ・リサーチ・センター	1992年
製剤 (微粒剤)	ラット	経口	♂・♀5	♂♀>5000	セーフファーム	1992年
	ラット	経皮	♂・♀5	♂♀>2000	セーフファーム	1992年
	マウス	経口	♂・♀5	♂♀>5000	セーフファーム	1992年

トリクロピルの経口投与の場合には、ラットおよびマウスにおいて高投与量群で自発運動の低下、立毛、流涎などがみられた。経皮投与の場合には、ほとんど臨床症状は認められなかった。

次いで、トリクロピルアミン液剤をラットに吸入させ、経気道による毒性を検討した。本剤の濃度(2.6mg/ℓ)でも死亡例は全く認められなかった。

また、トリクロピルブトキシエチルエステルをラットに吸入させ、経気道による毒性を検討した。一般症状として、暴露中、流涙、流涎がみられた。本剤の濃度(4.8mg/ℓ)でも死亡例は全く認められなかった。

以上のことから、通常の使用上の注意を守れば問題ないものと考えられる。

刺激性試験

トリクロピル製剤の眼および皮膚における一次刺激性を確かめるため、ウサギを用いて実施した。

1. 眼刺激性

一方を対照眼、他方を処理眼として、アミン液を0.1ml点眼した。角膜、虹彩および結膜について21日間観

察し、刺激性の評価を行った。全動物に角膜・虹彩および結膜の刺激性変化が認められた。角膜混濁を除き、他の変化は、21日目までに消失していた。

(ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー 1988年)

また、アミン液19倍希釈液を同様に、0.1ml、ウサギの眼に適用し、刺激性変化を観察した。適用後1日目に、結膜充血、軽度結膜浮腫がみられた他に変化はなかった。これらは適用後2日目には消失した。

(ヘーゼルトン研究所 1979年)

微粒剤では、100mgを右眼に適用して、角膜、虹彩および結膜について72時間観察し、刺激性の評価を行った。全例で、軽度から中等度の結膜刺激性が、適用後1時間にみられ、軽度の結膜刺激が24時間後に6例中4例、48時間後に6例中1例でみられた。これらの症状は72時間後に消失した。

(セーフファーム研究所 1992年)

以上の結果より、トリクロピルアミン液剤は原液では刺激性があるが、19倍希釈液では、ほとんど刺激性がないものと判定される。また、微粒剤はほとんど刺激性がないものと判断される。

2. 皮膚刺激性

刈毛したウサギ背部皮膚(10cm²)にアミン液0.5mlを4時間塗布し、皮膚の刺激性変化を調べた。観察期間中、いかなる変化もみられなかった。

(ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー 1988年)

同様に、ウサギ皮膚(2.5×2.5cm)に、微粒剤ピーナッツ油液0.5mlを4時間塗布し、刺激性変化を調べた。1および24時間で軽度の紅斑が6例中2例にみられたが、48時間後には全動物が回復した。

(セーフファーム研究所 1992年)

以上の結果より、トリクロピルの刺激性はほとんどないものと判定された。

皮膚感作性試験

ハートレー系モルモットを用い、Maguire法に準じて、トリクロピルアミン液の原液0.1mlを48時間毎に10日以内に4回皮内注射した。感作終了後、2週間の休薬期間後、同動物で誘発を行った。誘発後、24及び48時間に適用部位の紅斑、浮腫を調べた。陽性対照にはDER 331エポキシ樹脂を用いた。その結果、いずれの時期にも、変化はみられなかった。

(ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー 1985年)

同様に、モルモットを用い、Bubler法に準じて、トリクロピル微粒剤ピーナッツ油液0.5mlを、7日毎に3回適用した。感作終了後、2週間後、同動物で誘発を行った。誘発後24及び48時間に適用部位の反応を観察した。陽性対照には、DCNBを用いた。その結果、いずれの時期にも変化はみられなかった。

(セーフファーム研究所 1992年)

一方、いずれの試験でも、陽性対照群では、明白な変化が表われた。

以上の結果より、トリクロピルの感作性は陰性であると判断された。

亜急性毒性試験

1. ラットにおける3カ月亜急性毒性試験

一群雌雄各10匹のFischer系ラットにトリクロピル(酸)を基礎飼料と混合し0、5、20、50及び250mg/kg/日の用量で摂取させた。

その結果、試験期間中死亡例はなく、投与に関連した臨床症状も認められなかった。250および50mg/kg/日

投与群の雌雄で体重増加抑制がみられた。血液学的検査項目では、250mg/kg/日投与群の雌雄で血小板が有意に減少した以外に検体投与に伴う変化は認められなかった。血液生化学的検査項目では、250mg/kg/日投与群の雌雄でGPTが増加し、同群の雄で総蛋白の減少、また同群及び50mg/kg/日投与群の雄で尿素窒素がわずかに減少した。尿検査では、250mg/kg/日投与群の雄で対照群と比較し糖が検出された動物数が増加した他に検体投与に伴う変化は認められなかった。臓器重量では、平均体重の減少に伴って、250mg/kg/日投与群の雄では脳、心臓、肝臓及び精巣の重量に明らかな影響が見られた。また、50mg/kg/日投与群の雄及び250mg/kg/日投与群の雌雄の相対臓器重量も増加した。病理組織検査では、20mg/kg/日以上投与群の雌雄で、尿管上皮細胞の変性が認められた。さらに250mg/kg/日投与群の雄では腎の尿管で蛋白質小滴の吸収量の減少と腎小体の萎縮低下が認められた。また同群雄で肝小葉中心部の好酸性も増した。上記以外に検体投与に伴う変化は認められなかった。

以上の結果より、本試験におけるトリクロピル(酸)の最大無作用量は5mg/kg/日と判断された。

(ダウ・ケミカル USA 1984年)

2. ラットにおける亜急性毒性試験

一群雌雄各10匹のSD系ラットに、トリクロピル(エステル)を0、66.6、200、600及び1800ppm含有した飼料を3カ月間摂取させた。

その結果、試験期間中死亡例はなく、投与に関連した臨床症状もなかった。体重増加抑制も認められなかったが、食餌効率も、600ppm以上の投与群で減少した。血液学的検査項目では、200及び600ppm投与群でヘマクリット値及びヘモグロビンの増加が認められた。1800ppm投与群で白血球数の増加が、また同群雄で赤血球数の増加が認められた。66.6ppm投与群のみで雌に単球の比率の増加が認められた。血液生化学的検査項目では、600ppm以上の投与群の雄でZTT(硫酸亜鉛混濁試験)の値の減少が認められた。また1800ppm投与群の雌雄でアルブミンの減少、A/G比の増加、同群の雄で尿素窒素及び総コレステロールの減少がみられた。尿検査では、対照群と比べて差はみられなかった。臓器重量では、200ppm以上の投与群で臓器重量及び相対重量の増加が認められた。また、1800ppm投与群で副腎重量及び相対重量の増加が認められた。病理組織検査では、600ppm

投与群の雌及び1800ppm投与群の雌雄で、肺気管支及び血管周囲の好酸球の浸潤が認められたが、検体投与に起因した変化であるか明らかではなかった。

以上の結果より、本試験におけるトリクロピル(エステル)の最大無作用量は、66.6ppm(約5.5mg/kg/日)と判断された。

(東京歯科大学・関東医師製薬㈱ 1978年)

3. マウスにおける3カ月亜急性毒性試験

一群雌雄各10匹のICR系マウスにトリクロピル(酸)を0、45、134及び400ppm含有した飼料を3カ月間摂食させた。

その結果、試験期間中死亡例はなく、投与に関連した臨床症状もなかった。血液学的検査項目では、45ppm以上の投与群の雄で、ヘマクリット値及びヘモグロビンの増加が、134ppm以上の投与群の雄で赤血球数の増加が認められた。また、134ppm以上の投与群の雌で白血球数の増加が、400ppm投与群の雄で、白血球分画中、分葉白血球数が増加、リンパ球数が減少したが、以上の血液学的検査でみられた変動は、すべて正常範囲内であり、偶発的に統計学的有意差がみられたもので、検体投与による影響ではないと考えられた。血液生化学的検査項目では、134ppm以上の投与群の雌でGPTが減少したが、毒性学的意義は明らかではなかった。臓器重量では、400ppm投与群の雄の肝臓相対重量が減少し、45ppm投与群の雌の肝臓及び肺の相対重量が減少した。病理組織学的検査では、検体投与に伴う影響はみられなかった。

以上の結果より、本試験におけるトリクロピル(酸)の最大無作用量は、134ppm(雄17.87mg/kg/日、雌20.31mg/kg/日)と判断された。

(東京歯科大学・関東医師製薬㈱ 1978年)

催奇形性試験

1. ラットにおける催奇形性試験

トリクロピル(酸)を0、50、100及び200mg/kg/日の用量で、ラットの妊娠6日から15日目までの器官形成期に強制経口投与した。妊娠20日目に雌動物を屠殺、開腹し、子宮内の胎仔の位置、生存胎仔数、吸収胚数、着床数及び黄体数を調べ、生存胎仔の性別、体重及び外表異常を調べ、各同腹群の2/3の胎仔については骨格異常を検査し、残りの1/3の胎仔については内臓異常の

検査を行った。50ppm以上の投与群の親では、粗毛、脱毛、腹痛、呼吸困難及び軽度の振戦が観察された。また、100mg/kg/日以上以上の投与群で体重増加抑制及び妊娠6から16日に摂餌量の減少が認められたが、投与終了時では摂餌量の減少は認められなかった。胎仔では、200mg/kg/日投与群において頭蓋骨の化骨遅延の増加が認められた。また、同投与群で2例に奇形がみられたが、発生率が低いことより、検体投与の影響は考えられなかった。その他の検査項目に対照群との差は認められなかった。

以上の結果より、母動物の最大無作用量は求められず、胎仔動物に対する最大無作用量は100mg/kg/日であると判断された。(ダウ・ケミカルUSA 1979年)

2. ウサギにおける催奇形性試験

トリクロピル(酸)を、0、10、25及び75mg/kg/日の用量で、ウサギの妊娠6から18日までの器官形成期に強制経口投与した。妊娠28日目に雌動物を屠殺、開腹し、子宮内の胎仔の位置、生存胎仔数、吸収胚数、着床数及び黄体数を調べた。また、生存胎仔の性別、体重及び外表異常、内臓異常の検査を行い、その後骨格異常の検査を行った。75mg/kg/日投与群では、母動物に1例死亡例がみられた。また、生存胎仔では、25mg/kg/日投与群の1例で肺動脈及び半月弁狭窄が、75mg/kg/日投与群の1例で肝のう欠損がみられた。これらの奇形は例数が少なく統計学的有意差もみられないため、投与による影響とは考えられなかった。その他の検査項目に対照群との差はみられなかった。

以上の結果より、母動物の最大無作用量は25mg/kg/日、また最高投与量の75mg/kg/日でも催奇形性は認められなかった。

(ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー 1988年)

変異原性試験

変異原性の有無を検討するために、微生物を用いてDNA損傷性および復帰変異試験(代謝活性化を含む)を、また、ラットを用いて染色体異常誘発試験を行った。

1. 復帰変異試験及びRec assay

復帰変異試験では、通常よく用いられるSalmonella typhimurium(TA100及びTA98株)を用いた。本試

験では、S-9 mixture を添加する系での代謝活性化も行った。トリクロピル(酸)添加量は、S-9 mixture の添加および無添加ともに、1~5000 μ g/plate とした。一方、トリクロピル(エステル)添加量は、S-9 mixture の添加および無添加ともに、10~5000 μ g/plate とした。陽性対照薬として、2-amino anthracene、AF-2を用いた。トリクロピルは、代謝活性化を含め、いずれの濃度においても、復帰変異菌数の増加は認められなかった。また、陽性対照は、いずれも対照と比較して明らかな復帰変異菌数の増加を認めた。

Bacillus subtilis の組換え修復機構保持株(H-17)と、欠損株(M-45)を用い、DNA の損傷の誘発性を検定した。試験濃度は、トリクロピル(酸)で、20~2000 μ g/disk、トリクロピル(エステル)で1~100v/v% とし、培養後阻止帯の長さを測定した。また、溶媒対照としてDMSO、陰性対照としてカナマイシン、陽性対照としてマイトマイシンCを用いた。トリクロピルは、いずれの濃度においても両株に全く生育阻止帯を認めなかった。一方、陽性対照では明らかな生育阻止帯を生じた。

以上より、トリクロピルは、復帰変異誘発性、DNA 損傷誘発性ともに陰性であると判断した。

(残留農業研究所 1978年)

2. ラットの骨髄細胞を用いた *in vivo* による染色体異常試験

SD系雄ラットにトリクロピル(酸)を、0.7、7.0、70mg/kgの用量で単回経口投与して、6、24及び48時間後に屠殺し、大腿骨で標本を作製して染色体異常を調べた。陽性対照としてトリエチレンメラミンをまた陰性対照として0.85% NaCl 溶液を投与して24時間後に屠殺した。陰性対照及びトリクロピルは全く染色体異常を誘発しなかった。

以上より、トリクロピルにおけるラットの骨髄細胞を用いた染色体異常試験での変異原性は陰性であると判断される。(リットンバイオネティクス 1973年)

3. チャイニーズハムスターの肺線維芽細胞を用いた染色体異常試験

チャイニーズハムスターの肺線維芽細胞を用い、S-9 mixture を添加する系での代謝活性化も行った。トリクロピル(エステル)の添加量は、代謝活性化を併用しない場合には、0.15~0.60mg/ml、代謝活性化を併用

する場合には、1.25~5.00mg/mlであった。トリクロピルはいずれの場合、濃度でも染色体異常は誘発しなかった。

以上より、トリクロピルにおけるチャイニーズハムスターの肺線維芽細胞を用いた染色体異常試験の変異原性は陰性であると判断される。

(オリンパス光学工業染色体研究センター 1992年)

生体機能に及ぼす影響試験

トリクロピル(酸・エステル)の生体機能に及ぼす影響について、マウス(ICR系、雄)、ラット(Wistar系、雄)、モルモット(Hartley系、雄)、ウサギ(日本白色ウサギ、雄)を用いた一般薬理試験を行い評価した。

1. 中枢神経系に対する作用

トリクロピルをマウス及びラットに0、30、100および300mg/kg(酸)、また、0、100、300及び1000mg/kg(エステル)を強制経口投与し、マウスについては一般症状に及ぼす影響(本試験のみ、0、30、100、300および1000mg/kg)、睡眠時間延長、自発運動量、痙攣誘発作用、抗痙攣作用、協調運動に対する作用を調べ、ラットに対しては正常体温に対する作用を調べた。

その結果、酸体では300mg/kg以上で、自発運動の低下、反応性の低下、睡眠時間の軽度な延長(1.4倍)がみられた。以上より、トリクロピル(酸)は中枢神経系に対し抑制的に作用するものと考えられた。

また、エステル系では、1000mg/kgで、軽度の自発運動の低下、睡眠時間の延長が認められた。トリクロピル(エステル)も神経抑制作用をもつものと考えられた。

2. 循環器系に対する作用

トリクロピル(酸)を0、30、100及び300mg/kgの用量でラットに強制経口投与し、血圧及び心拍数を測定した。

また、エステル体をウサギに0、3、10および30mg/kgの濃度で静脈内投与し、呼吸数、血圧及び心電図に対する作用を調べた。

その結果、いかなる影響もみられず、トリクロピルの血圧、心拍数に対する作用はないものと考えられた。

3. 自律神経系に対する作用

トリクロピル（酸及びエステル）をラット摘出輸精管及びモルモット摘出回腸に、 10^{-6} 、 10^{-5} 及び 10^{-4} Mの濃度で添加して収縮に対する影響について調べた。

その結果、酸の 10^{-4} Mでラット摘出輸精管収縮に有意な減少が認められた。トリクロピル（酸）は、軽度な自律神経抑制作用を示すものと考えられた。

一方、エステルでは何ら影響は認められなかった。

4. 消化器系に対する作用

トリクロピルをマウスに0、30、100及び300mg/kg（酸）、また、0、100、300及び1000mg/kg（エステル）の用量で強制経口投与して、腸管輸送能に対する作用を調べた。

その結果酸体ではいずれの用量でも影響はみられず、トリクロピル（酸）は消化管に対する作用は有さないものと考えられた。一方、エステル体では、1000mg/kgで亢進作用がみられた。トリクロピル（エステル）では、消化器亢進作用があるものと考えられた。

5. 骨格筋に対する作用

トリクロピル（酸及びエステル）をラット横隔膜神経標本に 10^{-6} 、 10^{-5} 及び 10^{-4} Mの濃度で添加して収縮に対する影響を調べた。

その結果、いずれの濃度でも影響はみられず、トリクロピルは、骨格筋に対する作用は有さないものと考えられる。

6. 血圧に対する作用

トリクロピルをラットに0、30、100および300mg/kg（酸）、また0、100、300及び1000mg/kg（エステル）の用量で強制経口投与し血液凝固に対する作用を調べた。

その結果、いずれの用量でも影響はみられず、トリクロピルは血液凝固に対する作用は有さないものと考えられた。

以上より、トリクロピル（酸）の主要な薬理作用は、LD₅₀の約1/3量以上での中枢神経系抑制作用であると推察された。一方、エステル体では、高用量1000mg/kgでのみ、中枢抑制作用及び腸管輸送亢進作用がみられた。

（三菱化成安全科学研究所 1992年）

要 約

トリクロピルの安全性評価のために各種毒性試験を実施した。その結果トリクロピルの急性毒性は弱く普通物に相当した。眼に対しては、アミン液で原液で刺激性はあるものの、19倍希釈液ならびに微粒剤では刺激性は認められなかった。皮膚刺激性もなく、皮膚感作性も陰性であった。

ラット及びマウスを用いた亜急性毒性試験では、高用量で体重増加抑制、食餌効率の減少などが認められた。また、ラットに酸体を投与した際、腎尿管上皮細胞変性が認められた。エステル体投与試験では、病理学的所見はみられなかったものの腎重量及び副腎重量の増加が認められた。

催奇形試験ではラット及びウサギに対する催奇形性はみられず、変異原性試験において全ての結果は陰性であった。

トリクロピルは、林地、芝生、非農耕地向の除草剤として開発された。昭和56年8月にサイトロンアミン液剤がまた昭和56年9月にサイトロン微粒剤が農林水産省に農薬登録され現代に至っている。

問合せ

ダウ・エランコ日本株式会社 研究開発本部登録部
〒105 東京都港区芝浦1-2-1