

# ワルファリンの毒性試験の概要

大塚薬品工業株式会社開発研究部

(平成5年5月20日受理)

## 薬剤の概要

1930年代のはじめ、カナダやアメリカの牧草地帯で牛が原因不明の出血性疾患で死亡する例が続き、調査した結果、腐敗したクローバーの中に血液凝固阻止作用をもつダイクマロールという化合物が発見された。その後、関連化合物の研究が進められ1947年に合成されたのがワルファリンである。

本剤は抗血液凝固作用を有する累積毒殺そ剤であるため、1回の投与ではかなり多量に与えないと効果がないが、4～5日連続して少量ずつ摂取することにより中毒が発現する。毒餌を食べたネズミは、最初2～3日は外見上とくに顕著な変化を示さないが、体内にはすでに出血が起こりつつあり、5～6日くらい経過すると貧血症状となり、目立った動きをしないし餌も食べなくなる。そして肺出血による窒息、あるいは臓器内の出血による貧血によって、眠るような自然死に近い死に方をする。この間、興奮やけいれんを示さないため、ネズミの集団にストレスを起こさせないのが殺そ剤としての最大の利点である。すなわち、他のネズミに警戒心を起こさせないため、うまく用いれば最後の1匹まで殺すことができる。

人畜に対しても同様の抗血液凝固作用を示し、連続摂取した場合に蓄積した毒性が高くなる。しかし、家畜や他動物が誤って毒餌(0.025～1%)を食べても1度なら危険は少なく、連続して誤食する可能性も低いだけに安全な薬剤といえる。万一、内出血や出血の中毒症状が現れても、解毒剤であるビタミンK<sub>1</sub>を経口投与あるいは静脈注射することにより回復し、プロトロンビンタイムも約24時間で平常レベルに回復する。

ワルファリンは以上のように野そ駆除剤としての有効性と安全性の両面を供えているため、下記のとおり各社それぞれの商品名で農薬登録を取得し広く利用されている。

登録会社名	商品名	含有量(%)
イカリ薬品	ラッテスローバック	0.1
大塚薬品工業	水溶性ラテミン錠	2
	粉末ラテミン	1
	ラテミンコング	0.5
	ヤソール	0.1
	固形ラテミン	0.03
三丸製薬	強力ローダン	0.5
第一農薬	ヤンミン	0.2
	ヤンミン1	0.1

大丸合成薬品	メリーネコクマリン メリーネコ3号	1 0.1
中部製薬	チューモア「コンク」 固形チューモア2号 固形チューモア1号	1 0.2 0.1
琉球産経	サンケイクマリン20 サンケイクマリン	0.2 0.1

本剤の化学式，物理的・化学的性状等は次に示すとおりである。

一般名：ワルファリン

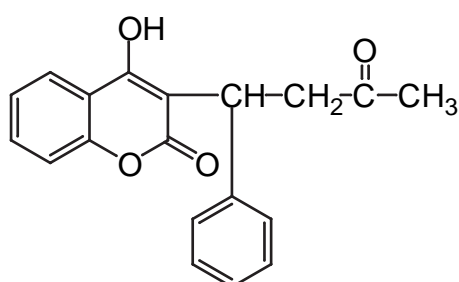
分子式：C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>

化学名：3-(4-acetylbenzyl)-4-hydroxycoumarin

分子量：308.32

化学構造：

外観：白色，結晶性粉末



融点：159～165

溶解度 (g/l, 20 )：水0.017，四塩化炭素0.15，ベンゼン3，クロロホルム56，アセトン65

ナトリウム塩，カリウム塩，リチウム塩は水やアルコールに易溶で，ナトリウム塩は水に40% (w/w) 溶けるが，カルシウム塩，マグネシウム塩，バリウム塩は水およびアルコールにほとんど不溶

### 急性毒性試験

ワルファリン原体とその1%粉剤および2%錠剤のラット，マウスにおける経口および経度の急性毒性試験の結果を以下に示す。

#### 1. 原体

動物種	投与経路	性	LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	試験機関	報告年
ラット	経口		13 6	セイフファーム ラボラトリーズ (英国)	1992年
	経皮		157 74	セイフファーム ラボラトリーズ (英国)	1992年
マウス	経口		6114 3412	セイフファーム ラボラトリーズ (英国)	1992年

## 2. 製剤（1%粉剤）

動物種	投与経路	性	LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	試験機関	報告年
ラット	経口		2558	セイフファーム ラボラトリーズ（英国）	1992年
	経皮		>2000 >2000	セイフファーム ラボラトリーズ（英国）	1992年
マウス	経口		>5000 >5000	セイフファーム ラボラトリーズ（英国）	1992年

## 製剤（2%錠剤）

動物種	投与経路	性	LD <sub>50</sub> 値 (mg/kg)	試験機関	報告年
ラット	経口		909 969	セイフファーム ラボラトリーズ（英国）	1993年
	経皮		>2000 >2000	セイフファーム ラボラトリーズ（英国）	1993年
マウス	経口		>5000 >5000	セイフファーム ラボラトリーズ（英国）	1993年

ワルファリンは動物種あるいは系統により感受性に差があることが知られており、今回の試験でもラットとマウスの感受性に大きな差がみられた。抗血液凝固作用による毒性であるためか急性毒性試験においては各投与濃度段階における死亡率にばらつきがみられ、各LD<sub>50</sub>値に対する95%信頼限界が大きくなった。さらに今回の試験では個体による感受性にも比較的大きな差がみられ、とくに1%製剤のラットにおける急性経口毒性においてはばらつきが大きく雌雄別のLD<sub>50</sub>値を求めることができなかった。

原体のマウスにおける急性経口毒性試験で投与4時間後および1日目に死亡が認められた以外は、死亡が認められたのは2日目以降からであった。

各試験とも、おもな中毒症状として嗜眠、呼吸頻度の減少、呼吸困難、運動失調、四肢の蒼白化等が認められた。試験期間中に死亡あるいは切迫屠殺した動物に認められた剖検時の異常は、胸腔の血液充満、肺の出血あるいは異常な赤色化や蒼白化、心臓の蒼白化、肝臓の蒼白化あるいは斑状蒼白化、腎臓の暗色化あるいは蒼白化、胃の出血あるいは蒼白化等であった。生存動物は試験期間を通じて正常か、中毒を起こしても試験終了時までには回復し、試験終了時の剖検においても異常は認められなかった。

## 刺激性試験

### 1. 眼一次刺激性試験

製剤のウサギの眼に対する刺激性を投与後に洗浄を行なった場合と行なわなかった場合の両方について評価するために試験を行なった。非洗浄試験では、検体を右眼に点眼し漏

出を避けるため約1秒間両眼を閉じさせてから自由にさせた。左眼は無処理とし対照とした。洗浄試験では、検体の点眼に続いて2-3分後に投与眼を微温の蒸留水100mlで静かに洗浄したことを除いて非洗浄動物と同様に処理した。左眼も同様に洗浄した。投与量は0.1mlとし、1%粉剤はそのまま、錠剤は投与直前に粉碎したものをを用いた。

投与約1, 24, 48, 72時間後にDraizeの評価法に従って眼の損傷および刺激性を評価し、最後に修正Key and Calandra分類法により検体の眼刺激性を評価した。

非洗浄の場合、1%粉剤では虹彩の炎症および中程度の結膜に対する刺激性が認められた。投与72時間後には有害な眼の作用は認められなかった。同じく非洗浄の場合、2%錠剤では散在性の角膜混濁、虹彩の炎症および最小限度から軽度の結膜に対する刺激性が認められた。投与72時間後あるいは7日後には処置眼は正常になっていた。一方、検体投与後洗浄した場合、1%粉剤では最小限度の結膜に対する刺激性が認められたが、投与24時間後にはすべての処理眼が正常となった。2%錠剤では虹彩の炎症および最小限度の結膜に対する刺激性が1匹の処置眼に認められた。投与24時間後にはすべての処置眼は正常になっていた。

修正Key and Calandra分類法によるとワルファリン1%粉剤、2%錠剤ともにウサギの眼に対して、非洗浄の場合「軽度の刺激性物質」、洗浄した場合は「最小限度の刺激性物質」と分類された。(セイフファームラボラトリーズ, 1992, 1993年)

## 2. 皮膚一次刺激性試験

製剤のウサギの皮膚に対する刺激性を評価するため、6匹のウサギの非擦過皮膚に、1%粉剤はそのまま0.5gを容量0.5mlの蒸留水で湿潤したものを、2%錠剤は粉碎後の0.5gを0.5mlの蒸留水で湿潤したものを、それぞれガーゼパッチに塗布し、4時間、半閉塞条件下で貼付した。検体除去約1, 24, 48および72時間後に適用部位の一次刺激性の有無を調べ、Draizeによる分類法に従って採点した。その他の有害な皮膚反応も記録し、皮膚反応の可逆性を評価するため7日目に追加の観察を行なった

その結果、1%粉剤では非常に軽度からはっきりした紅斑および非常に軽度から軽度の浮腫が認められた。投与7日目に、1例の投与部位に限り剥離が認められた。2%錠剤では非常に軽度の紅斑と浮腫が認められたが、投与7日目にはすべての投与部位は正常になっていた。

ワルファリン1%粉剤および2%錠剤の皮膚一次刺激指数はそれぞれ、0.8および0.5で、Draizeの分類法によるとウサギの皮膚に対してともに「軽度の刺激性物質」と分類された。腐食作用は認められなかった。(セイフファームラボラトリーズ, 1992, 1993年)

## モルモットを用いた皮膚感作性試験

ワルファリン1%粉剤および2%錠剤のモルモットにおける皮膚感作性をBuehler法で評価した。

本試験では、試験動物20匹と対照動物10匹を用いた。使用した濃度は、1%粉剤は感作、惹起とも落花生油中75% (w/w)、2%錠剤は感作に蒸留水中75% (w/w)、惹起に蒸留水中75%および50% (w/w) とし、投与量は0.5mlとした。

各10匹の動物群を用いて、既知の感作性物質2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) による陽性対照試験を同時に行なった。1%粉剤は、感作濃度として無水エタノール中0.5% (w/v)、惹起濃度として無水エタノール中0.15% (w/v) を用い、2%錠剤は感作濃度として無水エタノール中0.5% (w/v)、惹起濃度として無水エタノール中0.05% (w/v) を用いた。惹起濃度が異なるのはDNCBのバッチの違いにより最大無刺激濃度が異なったためである。

陽性皮膚反応の発現率は1%粉剤においては検体が0%、陽性対照が70%、2%錠剤においては検体が0%、陽性対照が100%であった。

以上の結果よりワルファリン1%粉剤、2%錠剤とも本条件下ではモルモットの皮膚に対して感作性のない物質であると判断された。

(セイフファームラボラトリーズ, 1992, 1993年)

### 復帰変異原性試験

ワルファリンの遺伝子突然変異誘発性を *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA1537および *E. coli* WP2uvrAの5菌株を用いAmesの方法で検討した。予備試験の結果からブレインキュベーション法を用い、代謝活性化による場合 (S9 Mix添加) と代謝活性化によらない場合 (S9 Mix無添加) で実施した。また、試験濃度は、5000, 2500, 1250, 625および312.5  $\mu$ g/plateで実施した。

その結果、菌の生育阻害は全菌株とも認められず、復帰変異コロニー数は、全菌株とも代謝活性化による場合および代謝活性化によらない場合とも、溶媒対照の2倍以上の値を示さず、また濃度に依存した増加も認められなかった。以上よりワルファリンには遺伝子突然変異誘発性はないと判断された。

(日本バイオリサーチセンター羽島研究所, 1987年)

### 要 約

ワルファリンに対する感受性がマウスとラットで異なり、原体のラットにおける急性の経口および経度毒性は比較的高かったが、製剤の急性毒性は1%粉剤、2%錠剤とも比較的低かった。製剤の眼刺激性および皮膚刺激性もきわめて軽く、皮膚感作性および復帰変異原性は認められなかった。殺そ剤としての使用濃度における死亡は2日目以降からみられるようになり、中毒期間は比較的長い。水剤は累積毒殺そ剤であるため、万一、人畜が誤食しても連続摂取しなければ中毒する危険は少ない。その上ビタミンK<sub>1</sub>という解毒剤が確立していることから安全性は高いといえる。

本剤にはネズミに警戒心を起こさせないという累積毒殺そ剤の利点があり、定められた使用基準を遵守すれば安全性の高い薬剤であり、野そ防除に有用な農業資材の一つである。

問合せ

大塚薬品工業株式会社開発研究部

〒350 川越市下小坂168