

## 技術情報

## アシュラムの毒性試験の概要

塩野義製薬株式会社植物薬品開発部

ローズ・プーランアグロ株式会社

(平成2年5月20日受理)

## 薬剤の概要

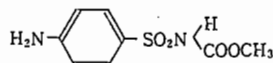
アシュラムは1961年英国の May & Baker 社 (現 Rhone-Poulanc) において発見された非農耕地、牧野・草地、樹園地等で使用できるスルフェニルアミド系の除草剤である。本剤は植物の茎葉部および根部から吸収され、地上部や地下部の分裂、成長が盛んな部位に移行し、酵素活性を阻害し、植物の代謝に影響を与え、細胞分裂を停止させる。したがって、一年生雑草のみならず、防除困難な多年生雑草にも有効である。安全性評価試験の結果、人畜および水棲動物に対しても安全性が高い除草剤である。

本剤の化学構造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: アシュラム Asulam

化学名: *N*<sup>1</sup>-methoxycarbonylsulfanilamide

構造式:



分子量: 229.23

性状: 無色結晶

融点: 142~144°C

溶解度(g/l): 水 4, メタノール 290, アセトン 300

pKa: 4.56±0.03

## 急性毒性試験

ラット、マウスおよび犬に対する各種急性毒性試験結果は次表のとおりである。

投与経路	動物種	性別	LD <sub>50</sub> (mg/kg)またはLC <sub>50</sub> (mg/l)	試験期間・報告年
経口	ラット	♂♀	>5,000	(1) 1968
		♂♀	>5,000	(2) 1981
	イヌ	♀	>5,000	(1) 1968
経皮	ラット	♂♀	>10,000	(2) 1981

吸入 ラット ♂♀ &gt;18.9 (1) 1977

(1) May &amp; Baker, (2) 日本実験医学研究所・慶応義塾大学

## 刺激性試験

## 1. 皮膚一次刺激性試験

アシュラム原体 500 mg またはアシュラム-Na 60% 液剤をウサギの背部被毛を刈った無傷または有傷皮膚に塗布し被覆した。24時間後被覆を除き、72時間後まで皮膚を観察し、刺激性の評価を行なった。

その結果、両検体とも無傷皮膚にはまったく変化はみられなかった。有傷皮膚では極軽度の刺激性の変化が見られたが、72時間後には消失した。

(May &amp; Baker, 1970 および 1977 年)

## 2. 眼一次刺激性試験

右眼を対照とし、左眼にアシュラム-Na 60% 液剤 0.1 ml をウサギに点眼し、2 または 4 秒後に洗眼群および無洗眼群を設け、7日後まで角膜、虹彩、結膜の刺激性の評価を行なった。

その結果、眼に対する刺激性はいずれにもみられなかった。(May & Baker, 1970 年)

## 3. 皮膚感作性試験

原体

アシュラム原体を生食に溶解し、0.1% 溶液としたものを初回 0.05 ml, 2 回目以降は 0.1 ml を刈毛した背部および側腹上部に週 3 回、計 10 回モルモットに皮下注射した。最終感作後 14 日に同様の溶液 0.01 ml を感作部位の直下に誘発注射した。各注射後 24 時間後に、注射部位の色調、紅斑を観察した。

その結果、誘発後紅斑を示す動物はまったくみられなかった。(May & Baker; 1977 年)

液剤

アシュラム-Na 37.2% 液剤および水で希釈した 13.33% 溶液を Draize-Shelanski 反復発作法に基づき、白人

男女の掌側前腕部皮膚に1日おき計10回塗布した。最終塗布後10日に別の部位に誘発貼布を24時間行ない、48時間後まで塗布部位の刺激性と接触感作性について観察した。

その結果、液剤およびその希釈溶液ともに刺激性も接触感作性もみられなかった。

(Biometric Testing Inc.; 1972年)

### 亜急性毒性試験

#### 1. Crj; CD(SD)系ラット3カ月亜急性経口毒性試験

アシュラムを0, 500, 5000および50,000 ppm含有する飼料でラットを3カ月間飼育した。その結果、50,000 ppm群では、体重増加の抑制および肝重量の減少が雄に、水腎症および腎盂炎あるいは腎盂腎炎が雌にみられた。5000 ppm群では、アシュラム投与によると考えられる所見はみられなかったことから、本試験の最大無作用量は5000 ppm(雄345 mg/kg/日, 雌374 mg/kg/日)と判断された。(食品医薬品安全性評価センター, 1981年)

#### 2. ビーグル犬6カ月亜急性経口毒性試験

アシュラム原体をトラガカントゴム水溶液に懸濁し、0, 60, 300および1500 mg/kgの投与量で毎日6カ月間犬に強制経口投与した。

その結果、1500 mg/kg群では、雄の体重増加の抑制、雌雄に摂取量の減少傾向、赤血球およびこれに関連する検査値の減少、血糖の増加および甲状腺重量の増加がみられた。300 mg/kgでは雄の血糖の増加がみられた。60 mg/kg群では、アシュラムの投与によると考えられる所見がみられなかったことから、本試験の最大無作用量は60 mg/kg/日と判断された。

(May & Baker, Middlesex Hospital School, Royal Marsden Hospital; 1980年)

#### 3. ウサギ3週間亜急性経皮毒性

アシュラム-Na 60%液剤2 ml/kg(1200 mg)および水で希釈した40%溶液1.25 ml/kg(500 mg/kg)を刈毛した有傷および無傷の背腰部皮膚に塗布し、6時間接触後塗布部位を洗浄した。対照群には水のみ2 ml/kgを同様に塗布した。この処置を週5日、3週間継続した。

その結果、アシュラム-Na 60%液剤塗布による亜急性経皮毒性は2 ml/kg(1200 mg/kg)でもみられなかった。(Huntingdon Research Center, 1971年)

### 慢性毒性試験

#### 1. CF-1アルビノマウス18カ月発癌性試験

アシュラムを0, 1500および5000 ppm含有する飼料

でマウスを18カ月間飼育した。その結果、甲状腺重量がアシュラム投与群雌で減少していた。腸の石灰化がアシュラム投与群雌雄で増加していた。なお、アシュラムの投与に関連した腫瘍の発生は5000 ppmでもみられなかった。(Rhodia Inc., Hess & Clark, 1978年)

#### 2. CD(SD)系ラット24カ月慢性・発癌性併合試験

アシュラムを0, 1000, 5000および25,000 ppm含有する飼料でラットを24カ月間飼育した。その結果、体重増加の抑制が25,000 ppm群雌雄および5000 ppm群雌にみられた。甲状腺濾胞状過形成および副腎髓質過形成の増加が25,000および5000 ppm群雌にみられた。1000 ppm群ではアシュラムの投与によると考えられる所見はみられなかったことから、本試験の最大無作用量は1000 ppm(雄36 mg/kg/日, 雌47 mg/kg/日)と判断された。なお、アシュラムの投与に関連した腫瘍の発生は25,000 ppmでもみられなかった。

(Huntingdon Research Center, 1981年)

#### 3. ビーグル犬24カ月慢性毒性試験

アシュラムを0, 200, 2000および6000 ppm含有する飼料で犬を24カ月飼育した。その結果、6000 ppm群雌で体重増加の抑制がみられた以外、アシュラムの投与によると考えられる所見はみられなかったことから、本試験の最大無作用量は2000 ppm(雄85.7 mg/kg/日, 雌75.1 mg/kg/日)と判断された。

(Industrial Bio-Test Laboratories, 1976年)

### 次世代に及ぼす影響および催奇形性

#### 1. ラット2世代繁殖試験

アシュラムを0, 1000, 5000および25,000 ppm含有する飼料でF<sub>0</sub>親世代は35日齢から25週間、F<sub>1</sub>世代は離乳時から32週間、F<sub>2</sub>世代は離乳時から30日間ラットを飼育した。F<sub>1</sub>世代の仔の一部を次世代の親動物として用い繁殖性について検討した。

その結果、25,000 ppm群F<sub>1</sub>親動物において、雌の交配前体重の減少が、また、同群雄の甲状腺重量の増加および雌の肝重量の減少がみられた。交尾率、妊娠率、授精率、分娩率のいずれにも投与に関連した変化はみられなかった。腹当り新生仔数に対照群との差はみられなかったが、生産仔数はF<sub>1</sub>では5000および25,000 ppm群で、F<sub>2</sub>は5000 ppm群で減少がみられたが、25,000 ppm群では対照群との差はみられなかった。また、25,000 ppm群ではF<sub>1</sub>雌に肝重量の減少、F<sub>2</sub>雌に下垂体および甲状腺重量の増加、F<sub>2</sub>雄に腎重量の増加がみられた。1000 ppm群では検査したすべての指標において、異常な所見はみられなかった。

以上より、本試験における最大無作用量は 1000 ppm と判断された。(May & Baker, 1981 年)

## 2. ラットにおける催奇形性試験

アシュラムを 0, 500, 1000 および 2000 mg/kg の投与量で妊娠 6 日から 15 日までの 10 日間毎日強制経口投与した。妊娠 21 日に帝王切開し、黄体数、着床数、生存・死亡胎仔数を調査し、生存胎仔の体重・外形・骨格・内臓異常を検査した。

その結果、2000 mg/kg でも催奇形性作用、母動物および胎仔に対する作用いずれもみられなかったので、本試験における最大無作用量は 2000 mg/kg/日と判断された。

(Life Science Research, 1982 年)

## 3. ウサギにおける催奇形性試験

アシュラムを 0, 150, 300, 750 および 1500 mg/kg の投与量で妊娠 5 日から 20 日までの 16 日間毎日強制経口投与した。陽性対照群にはサリドマイド 150 mg/kg を同様に投与した。妊娠 29 日に帝王切開し、黄体数、着床数、生存・死亡胎仔数を調査し、生存胎仔の体重、外形・骨格・内臓異常を検査した。

その結果、1500 mg/kg 群は投与開始と同時に体重増加と摂餌量が急激に低下し、多数例が死亡した。750 mg/kg 以下の群ではアシュラムの投与によると考えられる影響は母動物および胎仔にもみられず、催奇形性もみられなかった。陽性対照として用いたサリドマイド投与群では死亡胎仔数および重度奇形の発生が増加した。

以上より本試験における最大無作用量は 750 mg/kg/日と判断された。(May & Baker, 1981 年)

## 変異原性試験

### 1. Rec-assay

枯草菌の組換え修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、Rec-assay 法で DNA 損傷の誘発性を検定した。

その結果、最高濃度 (2000  $\mu\text{g}/\text{disk}$ ) においても両株にまったく生育阻止がみられず、アシュラムには DNA 損傷の誘発性がないと判断された。

(残留農薬研究所, 1977 年)

### 2. 復帰変異性試験

ヒスタジン要求性のサルモネラ菌 5 株およびトリプトファン要求性の大腸菌 1 株を用い、ラット肝から調整した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で、Ames らの方法により遺伝子突然変異性を検定した。

その結果、供試菌株に生育阻止が生ずる濃度までアシュラムを使用しても、S-9 Mix の有無にかかわらず、いずれの株においても対照に比べて復帰変異コロニー数の

増加は認められず、アシュラムには代謝活性化を含む条件下で復帰変異誘発性はないと判断された。

(残留農薬研究所, 1977 年)

### 3. 宿主経路試験

アシュラムを 0, 2000 および 5000 mg/kg の投与量で雄マウスに 24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。2 回目の投与直後にヒスタジン要求性のサルモネラ菌 G46 をマウスの腹腔内に注入した。3 時間後に腹腔内から菌液を回収し培養後、復帰変異菌数および生存菌数を調査した。

その結果、5000 mg/kg の投与量でも復帰変異菌数の増加はみられず、アシュラムは宿主経路の条件下で復帰変異誘発性はないと判断された。

(残留農薬研究所, 1977 年)

### 4. 細胞形質転換試験

クローニング出現率が 78% 低下する濃度から順次希釈したアシュラム溶液 (256, 512, 1024 および 2048  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 24 時間培養したマウスの継代培養細胞 C3H/10 T<sub>1/2</sub>CL8 に処理した。処理 18 時間後にアシュラムを除き 35 日間培養し、形質転換について Reznikoff の基準に従い判定した。

その結果、アシュラム処理細胞における II 型増殖巢の発生は陰性対照より少なく、III 型増殖巢もみられなかった。アシュラムは C3H/10 T<sub>1/2</sub> 細胞に対し形態的形質転換を起こさないと判断された。

(Maison Research Institute, 1979 年)

### 5. マウスにおける優性致死試験

アシュラムを 0, 1500 および 5000 ppm 含有する飼料で CF-1 雄マウスを 45 日間飼育した。これらの雄をアシュラム無投与の雌と 1 週間に 2 匹ずつ計 2 週間交配させた。交配させた週の半ばから 13 日目に雌を帝王切開し妊娠率、着床数、胎仔死亡数について検査した。

その結果、いずれの指標にも対照群との差はみられなかった。アシュラムによる優性致死作用はないものと判断された。(Rhodia Inc., Hess & Clark, 1975 年)

## 生体機能に及ぼす影響

### 1. マウスの神経系に及ぼす作用

アシュラムを 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 および 6400 mg/kg の投与量で、マウスに 1 回強制経口投与し、アーウィンの方法により一般症状を調べた。

その結果、1600 mg/kg 以下の投与量では、異常症状はまったくみられなかった。3200 mg/kg では、軽度の鎮静作用が、6400 mg/kg では、体温の低下を伴う明らかな鎮静作用がみられたが、投与後 24 時間で正常に戻

た。

## 2. 麻酔ネコの神経筋伝達に及ぼす急性経口作用

アシュラムを0および1000 mg/kgの投与量で麻酔ネコに1回強制経口投与した。坐骨神経に短形波により最大下刺激を与え、その結果起こる脛骨筋の収縮および血圧を測定した。

その結果、アシュラム投与群でも対照群と同様に、神経筋伝達に対しわずかに可逆的阻害がみられたが、投与群のほうが若干強い程度であり、有意差はみられなかった。また、血圧に対し、アシュラム投与による明らかな一貫した影響はみられなかった。

## 3. *in vitro*におけるモルモットの回腸に及ぼす作用

マグヌス法に従い、共働作用は表面還流法で、拮抗作用は組織浸漬法でモルモットの摘出回腸への影響について調べた。

その結果、アシュラムは $8.5 \times 10^{-6} \sim 8.5 \times 10^{-3}$  M濃度で回腸に対する直接刺激作用は5/6試料でみられなかった。1/6試料で小さな収縮がみられたが、アシュラム濃度との相関性はみられなかった。また、アシュラム $8.5 \times 10^{-3}$  Mは6試料すべてにおいて回腸のアセチルコリンおよび5-ヒドロキシトリプタミンに対する反応にまったく影響しなかった。一方、アトロピンおよびメチセルジドでは明らかな拮抗作用がみられた。

## 4. ネコおよび犬における経口投与による急性心血管作用

アシュラムを0および1500 mg/kgの投与量で麻酔ネコまたは麻酔犬および無麻酔犬に投与し、それぞれ心血管系および気管支内圧または心血管系におよぼす影響について検討した。また、麻酔犬については、アシュラムの胃腸管からの吸収の個体差を考慮して、経口投与5時間後にさらにアシュラム100 mg/kgを1回静注して、心血管系に及ぼす影響について同様に検討した。

その結果、アシュラムは1500 mg/kgでも心血管系および呼吸に対して顕著な作用を及ぼさなかった。麻酔ネコおよび無麻酔犬においては作用はきわめて軽微であった。麻酔犬では経口投与の場合、一部の動物に血圧の低下と心拍量の減少が認められたが、作用に一貫性がなく、その後の静脈内投与ではほとんど作用が認められなかったことから、経口投与ではアシュラムの吸収が不十分であるか、またはアシュラム本来の作用が弱く、非常に限定された一過性作用をもつにすぎないと考えられた。

## 5. ウサギの血小板凝集に及ぼす作用

ウサギの左頸動脈から採取して得た血小板にアシュラムを0, 0.1, 1.0, 10および100  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で加え、

1分後にコラーゲン、ADPまたはトロンビンを加えて血小板凝集に及ぼす作用について検査した。また、麻酔ウサギにコラーゲンを30分ごとに静注し、2回目の投与直後にアシュラムを0および1500 mg/kgの投与量で1回強制経口投与し、血管内血小板凝集に及ぼす作用について検査した。

その結果、コラーゲン、ADPまたはトロンビンにより誘発された*in vitro*におけるウサギの血小板凝集に対して、アシュラムは100  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で抑制作用も相乗作用もみられなかった。同様に、1500 mg/kg経口投与によるウサギの血管内におけるコラーゲン誘発性血小板凝集に対しても、アシュラムは抑制作用も相乗作用も示さなかった。したがって、アシュラムが血小板凝集を起こしたり、血小板の正常な止血作用を妨げることは、多量の経口摂取( $\leq 1500$  mg/kg)によって血中濃度が高いレベル( $\leq 100$   $\mu\text{g/ml}$ )に達すると仮定しても考えられない。

## 6. ウサギの全血および洗浄赤血球に及ぼす溶血作用

ウサギの頸動脈から採取し、全血または洗浄した赤血球にアシュラム濃度が0, 0.1, 1.0, 10および100  $\mu\text{g/ml}$ となるように加え溶血の有無について検査した。また、アシュラムを1500 mg/kgを1回強制経口投与後、3時間後に耳の動脈から採血し溶血の有無をアシュラムの投与前の試料と比較し検査した。

その結果、*in vitro*でアシュラムは0.1~100  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、ウサギの全血または洗浄赤血球と混合したとき、いずれも対照に比し有意な溶血はみられなかった。また*in vitro*で、経口投与したアシュラム1500 mg/kgがウサギの全血中の赤血球の溶血を引き起こすことはなかった。(May & Baker, 1981年)

## 要 約

アシュラムの安全性評価のための各種毒性試験を行なった。その結果、本剤の急性毒性は低く、哺乳動物および人に対する皮膚刺激性および感作性も、眼に対する刺激性もみられなかった。亜急性毒性、慢性毒性および発癌性試験における高用量群または中間用量群で体重増加の抑制、一部の臓器重量の増加または減少等の変化、さらにラット慢性毒性試験では甲状腺または副腎髓質の過形成、マウス発癌性試験では腸の石灰化がみられた。犬亜急性毒性試験では赤血球に関連する項目および血糖に変動が見られたが犬24ヵ月慢性毒性試験ではこれらの検査項目に異常はみられなかった。また、発癌性はラット、マウスともにみられなかった。次世代に及ぼす影響および催奇形性はみられず、変異原性も陰性であった。

アンジュラムは昭和47年2月に非食用作物、昭和62年に食用作物の除草剤として登録を取得した。

登録保留基準は果実0.2 ppm (ただし、夏みかん外果皮0.5 ppm)、野菜0.2 ppm、さとうきび0.5 ppmと設定された。

アンジュラムは定められた使用基準を厳守すれば、安全性の高い農薬であり、有用な農業資材の一つとして上市

以来好評をえている。

問合せ

塩野義製薬株式会社植物薬品開発部

〒541 大阪市中央区道修町 3-1-8

ローズ・プーランアグロ株式会社

〒107 東京都港区赤坂 1-9-20 第16興和ビル別館