

技術情報

トリフルラルインの毒性試験の概要

塩野義製薬株式会社植物薬品開発部
武田薬品工業株式会社アグロ事業部農薬研究所

(平成3年5月20日受理)

薬剤の概要

トリフルラルインは1960年に米国イーライリリー社において発見されたジニトロアニリン系の土壌処理型除草剤である。本剤は雑草の発芽時に幼芽および幼根から吸収され、分裂組織の細胞分裂を抑制して生育を抑える。細胞分裂の抑制は細胞分裂時の紡錘体の機能を阻害し、有糸分裂の中期で隔膜の生育を停止させ、多核細胞を形成することによるものである。

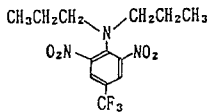
本剤は一年生のイネ科雑草および主要な広葉雑草の発芽時に作用し、雑草の発芽を抑え高い除草効果を発現する。

本剤の化学構造および物理化学的性質を以下に示す。

一般名: トリフルラルイン Trifluralin

化学名: α, α, α -trifluoro-2, 6-dinitro-N, N-dipropyl-*p*-toluidine

構造式:



分子式: $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$

分子量: 335.33

性状: 橙色の結晶

融点: 48.5~49.0°C

溶解性(g/l): 水 0.01 以下, アセトン 339.0, エタノール 73.8, キシレン 580.1

蒸気圧: 1.99×10^{-4} mmHg (29.5°C)

分配係数(*n*-オクタノール/水): $\log P=6.0$

急性毒性試験

トリフルラルイン原体, 乳剤および粒剤の各種急性毒性試験の結果を表1に示す。

表1 トリフルラルインの急性毒性試験成績

検体	有効成分含有量	投与経路	動物種	LD ₅₀ (mg/kg) または LC ₅₀ (mg/l)
原体	—	経口	ラット ¹⁾	♂2517 ♀2552
			マウス ¹⁾	♂3598 ♀3197
		経皮	ラット ¹⁾	♂♀>5000
			吸入	ラット ²⁾
乳剤	47.9%	経口	ラット ³⁾	♂1780 (原体換算)
			マウス ⁴⁾	♂5.1 ml/kg
	46.8%	経皮	ウサギ ⁵⁾	♂♀>2075
			吸入	ラット ⁵⁾
粒剤	10%	経口	ラット ⁶⁾	♂♀>500
			マウス ⁷⁾	♂♀>20,000
			ウサギ ⁶⁾	♂♀>2000

刺激性試験

1. 眼一次刺激性試験^{5,6)}

46.8% 乳剤または粉碎した10% 粒剤各0.1 mlを希釈せずに、それぞれ雌雄各3匹のNew Zealand白色種ウサギの片眼に投与し、刺激性変化(角膜混濁、虹彩充血・腫脹、結膜発赤・浮腫)を投与後14日間(乳剤)または7日間(粒剤)観察した。無処置眼を対照とした。洗眼は行なわなかった。

その結果、乳剤、粒剤とも投与後1時間目から全例の処置眼に中等度の刺激性変化が認められたが、乳剤では14日以内、粒剤では7日以内に消失した。

2. 皮膚一次刺激性試験^{5,6)}

46.8% 乳剤を2 ml/kgの用量で、また10% 粒剤を2000 mg/kgの用量で希釈せずに、それぞれ雌雄各3または5匹のNew Zealand白色種ウサギの剪毛した背部皮膚に24時間閉塞貼付した。処置部位の刺激性変化(紅斑・痂皮、浮腫)を貼付終了後14日間観察した。

その結果、乳剤では貼付終了後1日目から全例の処置

部位に中等度の刺激性変化が認められたが14日以内に消失した。粒剤では刺激性変化はほとんど認められなかった。

皮膚感作性試験⁹⁾

Buehlerの局所貼付法変法に従って試験を行なった。感作処置として、50%乳剤では水を用いた10%および40%希釈液各0.2ml、10%粒剤では50mgを希釈せずに、それぞれ雌12匹のHartley系モルモットの剪毛した背頸部皮膚に6時間閉塞貼付した。この処置を週3回連続2週間行なった。惹起処置として、最終感作処置後10日目にモルモットの剪毛した背部中央皮膚に感作と同様の処置を1回行なった。処置部位の皮膚反応(紅斑・痂皮、浮腫)を各回の感作処置後24時間目、惹起処置後24、48および72時間目に観察した。

その結果、乳剤では両希釈液とも2~4回目の感作処置後から全例に紅斑および浮腫が観察され始め、感作処置回数が増すに従いこれらの皮膚反応は著明となった。惹起処置に対しては、10%希釈液を処置した1例を除く全例が陽性の皮膚反応を示し、感作性は陽性であった。粒剤では感作期間中および惹起処置後のいずれにも皮膚反応は認められず、感作性は陰性であった。

亜急性経皮毒性試験⁹⁾

トリフルラリンを1群雌雄各5匹のNew Zealand白色種ウサギの背部に、0および1000mg/kg/日の用量で21日間毎日経皮投与した。

その結果、1000mg/kg群雌雄に中等度~高度の皮膚刺激性と、それに付随して白血球数、好中球数および血小板数の増加、およびリンパ球数の減少が認められたが、全身性の毒性症状は認められなかった。

慢性毒性/発がん性試験

1. ラットにおける慢性毒性/発がん性試験⁵⁾

トリフルラリンを1群雌雄各60匹のFischer 344系ラットに0、813、3250および6500ppmの濃度で24カ月間混餌投与した。中間屠殺は行なわなかった。

その結果、6500ppm群雌に生存率の低下、3250および6500ppm群雌雄に顕著な体重増加の抑制および食餌効率の低下、肝臓重量の増加、進行性糸球体腎症の発生率の上昇および重篤化、腎結石、腎盂上皮過形成、腎臓(雄のみ)および膀胱の腫瘍の発生率の上昇が認められた。813ppm群ではこれらの腎毒性がごく軽度に認められ、雄では腎臓の腫瘍の発生率の上昇も認められた。しかし膀胱および腎臓の腫瘍の発生率の上昇は、高率に発

生した腎結石が原因である可能性も考えられ、腫瘍の総発生率にはトリフルラリン投与による影響は認められなかった。

上記の腎毒性に関する最大無作用量を求めるために、腎毒性試験を実施した⁹⁾。この試験ではトリフルラリンを1群40匹または60匹のFischer 344系雄ラットに0、50、200、800、3200および6400ppmの濃度で4カ月間混餌投与し、その後6週間の回復期間を設けた。

その結果、800ppm以上の投与群に蛋白、酵素(アスパラギン酸トランスアミナーゼ、LDH)および電解質の尿中排泄の増加および/または腎皮質尿細管上皮細胞の細胞質内硝子滴形成の用量に依存した重篤化が認められた。200ppm群では軽度の腎皮質尿細管上皮細胞の細胞質内硝子滴形成が認められるのみであった。これらの腎毒性は3200ppm以下の投与群では可逆的であった。

上記の試験成績を総合して、ラットにおける慢性毒性/発がん性試験における最大無作用量は50ppm(2.5mg/kg/日)であると判断された。

2. マウスにおける慢性毒性/発がん性試験⁵⁾

トリフルラリンを1群雌雄各80匹または120匹のB6C3F₁系マウスに0、563、2250および4500ppmの濃度で24カ月間混餌投与した。中間屠殺は行なわなかった。

その結果、2250および4500ppm群雌雄に体重増加の抑制、肝臓重量の増加および腎臓重量の減少、4500ppm群雌に進行性糸球体腎炎の発生率の上昇および重篤化が認められた。したがって最大無作用量は雌雄とも563ppm(雌雄合わせた概算で40mg/kg/日)であると判断された。また発がん性は認められなかった。

3. イヌにおける慢性毒性試験²⁾

トリフルラリンを1群雌雄各2~3匹のビーグル犬に0、10および25mg/kg/日の用量で、カプセルに入れて36カ月間毎日経口投与した。

その結果、25mg/kg群雌雄に肝臓重量の増加が認められたことから、最大無作用量は雌雄とも10mg/kg/日であると判断された。

繁殖/催奇形性試験

1. ラットにおける2世代繁殖試験¹⁰⁾

トリフルラリンを1群雌雄各25匹のCD(SD)系ラットに0、200、630および2000ppmの濃度で、F₀世代は5週齢時から36週齢時まで、F₁世代は5~8週齢時から35週齢時まで混餌投与した。両世代とも2回の交配試験を行ない、F₀世代の第1産仔の中からF₁世代の親動物を選抜した。第1回交配前の投与期間は両世代と

も 10 週間であった。

その結果、両世代とも 630 および 2000 ppm 群の親動物に体重増加の抑制、摂餌量の減少および/または食餌効率の低下がみられ、これに付随して 2000 ppm 群の哺育仔に発育遅延が認められたが、繁殖に及ぼす影響は認められなかった。したがって最大無作用量は、親動物に関しては 200 ppm (15 mg/kg/日)、繁殖に関しては 2000 ppm (148 mg/kg/日) 以上であると判断された。

2. ラットにおける催奇形性試験⁸⁾

トリフルラリンを 1 群 25 匹の CD (SD) 系妊娠ラットに 0, 100, 225, 475 および 1000 mg/kg/日の用量で妊娠 6 日～15 日の 10 日間、毎日強制経口投与した。妊娠 20 日に動物を屠殺し、催奇形性について検査した。

その結果、475 および 1000 mg/kg 群の親動物に体重増加の抑制および摂餌量の減少が認められ、1000 mg/kg 群の胎仔の平均体重が低値であった。したがって最大無作用量は親動物に関しては 225 mg/kg/日、胎仔に関しては 475 mg/kg/日であると判断された。催奇形性は 1000 mg/kg/日でも認められなかった。

3. ウサギにおける催奇形性試験⁹⁾

トリフルラリンを 1 群 25 匹の Dutch Belted 系妊娠ウサギに 0, 100, 225 および 500 mg/kg/日の用量で妊娠 6 日～18 日の 13 日間、毎日強制経口投与した。妊娠 28 日に動物を屠殺し、催奇形性について検査した。

その結果、225 および 500 mg/kg 群で親動物に流産、死亡、体重増加の抑制および摂餌量の減少が認められ、500 mg/kg 群に胎仔の発育遅延、出生前の胚胎仔死亡の増加および心肥大症が認められた。しかしこれらの胎仔毒性は母獣毒性に付随するものであり、心肥大症は同腹仔に発生したことから遺伝的要因も大きいと考えられた。したがって最大無作用量は、親動物に関しては 100 mg/kg/日、胎仔に関しては 225 mg/kg/日であると判断され、催奇形性は 225 mg/kg/日以下の用量では認められなかった。

変異原性試験

1. 細菌を用いた復帰変異試験¹¹⁾

ヒスチ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、ラットの肝臓から調製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 らの方法により復帰変異誘発性を検定した。

その結果、トリフルラリンでは直接法、代謝活性化法とも 3000 μ g/プレートの濃度においても、溶媒対照に比し復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。した

がってトリフルラリンは復帰変異を誘発しないと判断された。

2. 前進突然変異試験⁶⁾

マウスリンパ腫細胞に対する突然変異誘発性を、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で検定した。

その結果、トリフルラリンでは細胞増殖が 50～90% 抑制される濃度 (直接法; 2.5～20 μ g/ml, 代謝活性化法; 5.0～20 μ g/ml) においても、溶媒対照に比し突然変異細胞出現率の上昇は認められなかった。したがってトリフルラリンは前進突然変異を誘発しないと判断された。

3. マウスにおける宿主経由試験¹¹⁾

トリフルラリンを 1 群雄 6 匹の ICR 系マウスに 0, 200 および 500 mg/kg/回の用量で、24 時間間隔で 2 回強制経口投与した。最終投与直後にヒスチジン要求性のサルモネラ菌 G46 株を腹腔内に投与し、その 3 時間後に動物を屠殺して腹腔内菌液を回収し、復帰変異菌数および生存菌数を測定した。

その結果、トリフルラリンでは全投与群とも溶媒対照群に比し突然変異出現率 (生存菌数に対する復帰変異菌数の比) の上昇は認められなかった。したがってトリフルラリンの宿主経由試験における変異原性は陰性であると判断された。

4. *In Vitro* 染色体異常試験¹²⁾

チャイニーズハムスター卵巣由来培養細胞 (CHO) に対する染色体異常誘発性を、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下で検定した。

その結果、トリフルラリンでは沈殿がわずかに生じる濃度 (直接法; 30 μ g/ml, 代謝活性化法; 100 μ g/ml) においても、溶媒対照に比し染色体異常細胞出現率の上昇は認められなかった。したがってトリフルラリンは染色体異常を誘発しないと判断された。

5. *In Vivo* 姉妹染色分体交換試験⁶⁾

トリフルラリンを 1 群雌 2～3 匹のチャイニーズハムスターに 0, 200, 300, 400 および 500 mg/kg の用量で 1 回強制経口投与し、King らの方法により骨髄細胞における SCE 出現率を調べた。

その結果、トリフルラリンでは 300 mg/kg 以上の投与群で細胞毒性が認められたが、全投与群とも SCE 出現率の上昇は認められなかった。したがってトリフルラリンの *in vivo* 姉妹染色分体交換試験における変異原性は陰性であると判断された。

6. 細菌を用いた DNA 修復試験¹¹⁾

枯草菌の組換え修復機構保持株および欠損株を用い、賀

田らの Rec-assay 法により DNA 損傷の誘発性を検定した。

その結果、トリフルラリンでは最高濃度の 2000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ においても両株間に生育阻止の差は認められなかった。したがってトリフルラリンは DNA 損傷を誘発しないと判断された。

7. ラットにおける優性致死試験⁶⁾

トリフルラリンを 1 群雄 15 匹の Wistar 系ラットに 0, 100 および 1000 mg/kg/日の用量で、連続 5 日間強制経口投与した。最終投与日から連続 10 週間、1 週間ずつ異なる無投与の処女雌ラットと 1:1 で同居交配し、繁殖に関する指標を調べた。

その結果、全投与群の雄に橙色尿、1000 mg/kg 群雄に投与期間中における体重増加の抑制がみられたが、繁殖に関する指標にはトリフルラリン投与による影響は認められなかった。したがってトリフルラリンは優性致死作用を有しないと判断された。

経皮吸収試験¹³⁾

¹⁴C-トリフルラリンを雌雄各 2 匹のアカゲザルの右前腕腹側部に 2.0 mg/kg の用量で 1 回経皮投与した。経皮投与の 21 日後に同じ動物に同用量の ¹⁴C-トリフルラリンを 1 回静脈内投与し、各回の投与後 168 時間目まで経時的に血液、尿および糞を採取して、血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) および糞尿中排泄率の経皮投与と静脈内投与の比により経皮吸収率を求めた。

その結果、経皮投与ではいずれの時点でも血漿中濃度は検出限界以下であった。糞尿中排泄率の比から求めた経皮吸収率は約 0.1% であり、トリフルラリンの経皮吸収率はきわめて低いと判断された。

生体機能に及ぼす影響に関する試験¹⁴⁾

1. 一般薬理試験

ラット、マウス、モルモット、ウサギおよびイヌを用い、*in vivo* および/または *in vitro* でトリフルラリンの一般薬理作用を調べた。また本剤は慢性毒性/発がん性試験で腎臓および肝臓に対する影響が認められたため、腎機能検査および肝機能検査も行なった。投与用量は経口投与の場合は 0, 150, 500 および 1500 mg/kg、十二指腸内投与の場合は 0, 50, 150 および 500 mg/kg、*in vitro* の場合は 10^{-7} , 10^{-8} および 10^{-5} g/ml とした。

その結果、中枢神経系に対しては 500 および 1500 mg/kg を経口投与したマウスに異常歩行および眼瞼下垂が観察され、1500 mg/kg ではその他に死亡、振せん、筋弛緩、正向反射の鈍化、間代性けいれんが認められた。ま

た 1500 mg/kg を経口投与したウサギに振戦、中腰・腹ばい姿勢、自発運動の減少が観察された。その他腎機能検査で 500 および 1500 mg/kg を経口投与したラットに尿量および尿中電解質排泄量の増加、肝機能検査で 150 mg/kg 以上の用量を経口投与したラットに血清中 ICG 濃度の上昇が認められ、トリフルラリンは利尿作用および肝機能抑制作用を有することが示された。呼吸・循環器系、自律神経系および平滑筋、消化管、末梢神経系および血液に対する作用は認められなかった。

2. 解毒試験

ラットを用い 3 種の解毒薬による解毒効果を調べた。解毒薬として、トリフルラリンに肝機能抑制作用が認められたことから肝機能改善効果のあるグルタチオンおよびグルクロン酸アミドを、振戦が認められたことから副交感神経遮断薬である硝酸アトロピンを選定した。

トリフルラリンを経口 LD₅₀ 値に相当する 3000 mg/kg の用量でラットに 1 回経口投与し、投与後 2 時間目に 3 種の解毒薬を処置した。観察期間は 7 日間とし、グルタチオンおよびグルクロン酸アミドは観察期間中も毎日 1 回処置した。

その結果、いずれの解毒薬を処置した場合も 7 日間の死亡率は 0~20% に低下し、明らかな解毒効果が認められた。

要 約

トリフルラリンの安全性評価のための各種毒性試験を実施した。

本剤の急性毒性は弱く普通物に該当する。しかし乳剤、粒剤ともウサギにおいて眼刺激性が認められ、乳剤では皮膚刺激性も認められた。また乳剤ではモルモットにおける皮膚感作性が陽性であった。一方、原体のサルにおける経皮吸収率は約 0.1% ときわめて低く、ウサギにおける亜急性経皮毒性試験でも全身性の毒性症状は認められなかった。

慢性毒性/発がん性試験では、中間・高用量群のラットおよびマウスに体重増加の抑制、肝臓重量の増加、および進行性糸球体腎症 (炎)、腎結石等の腎毒性が認められた。イヌでは高用量群に肝臓重量の増加が認められたのみであった。発がん性はマウスでは認められず、ラットでは中間・高用量群で膀胱腫瘍、全用量群で腎臓腫瘍の発生率が上昇したが、腫瘍の総発生率にはトリフルラリン投与による影響は認められなかった。

ラットにおける 2 世代繁殖試験では繁殖に及ぼす影響は認められず、催奇形性試験では、ラットでは 1000 mg/kg/日以下、ウサギでは 225 mg/kg/日以下の用量で催奇

形性は認められなかった。各種変異原性試験の結果はすべて陰性であった。

薬理試験ではトリフルラリンに特異的な作用というよりもむしろ急性中毒症状と考えられる異常歩行、振戦等の中枢神経系に対する影響が認められたが、トリフルラリンのおもな薬理作用は利尿作用および肝機能抑制作用であった。本剤の解毒薬としてはグルタチオン、グルクロン酸アミドおよび硫酸アトロピンが有効であった。

トリフルラリンは昭和41年、乳剤の大豆、ラッカセイ、カンショ、ナタネ、小麦、ニンジン、キャベツ、大根、トマトで日本において初めて登録され、昭和44年には2.5%粒剤のラッカセイ、3.0%粒剤の水稻に登録された。その後他作物への適用拡大を順次実施し、畑作物、野菜を始め、花き花木、工芸作物、果樹、公園・庭園等幅広い分野に登録された。

トリフルラリンの登録残留基準値は、米、麦・雑穀、果実、野菜、イモ類、豆類、茶のいずれも0.01 ppm(ただしニンジンは0.2 ppm)と設定されている。

トリフルラリンは定められた使用基準を遵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得ている。

試験機関および報告年

- 1) 環境保健生物研究センター, 1979年
- 2) リリー研究所, 1966年
- 3) 塩野義製薬株式会社研究所, 1965年
- 4) 東京歯科大学, 1965年
- 5) リリー研究所, 1980年
- 6) リリー研究所, 1983年
- 7) 環境保健生物研究センター, 1986年
- 8) リリー研究所, 1984年
- 9) リリー研究所, 1985年
- 10) リリー研究所, 1986年
- 11) 残留農薬研究所, 1977年
- 12) リリー研究所, 1989年
- 13) リリー研究所, 1988年
- 14) 環境保健生物研究センター, 1991年

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

武田薬品工業株式会社アグロ事業部農薬研究所

〒103 東京都中央区日本橋 2-12-10