

マイレン酸ヒドラジドの毒性試験の概要

大塚化学株式会社
農薬肥料開発部

薬剤の概要

マイレン酸ヒドラジド(以下MHと略す)は、1895年にT.H.CurtiusとH.A.Foersterlingによって合成され、1949年にD.L.SchoeneとO.L.Hoffmannにより植物生長調節作用が発見された。1953年にMHジエタノールアミン(MH-DEA)およびMHナトリウム(MH-Na)を有効成分とする製剤が植物生長調節剤/除草剤として米国で登録された。我が国でも1960年頃から開発が進められ、1963年(昭和38年)にはMH-DEAを有効成分とする製剤が農薬登録された。大塚化学株式会社はMHカリウム(MH-K)を有効成分とする製剤を開発し、1978年(昭和53年)に商品名「OMH-K」(MH-K 22.0%)として登録を得て、1980年(昭和55年)から製造販売を開始した。その後、1987年(昭和62年)に32%液剤として新たに登録を取得した。

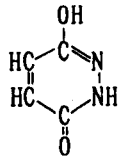
MHの生理作用については数多くの研究がなされている。高濃度で除草作用を、やや低い濃度では生育抑制作用を示し、さらに低い濃度で葉たばこの腋芽抑制、たまねぎ、ばれいしょ等の貯蔵中の萌芽抑制、根菜類の抽苔防止、果樹の霜害防止に有効である。現在は農薬取締法の改正により、葉たばこの腋芽抑制以外の用途は登録からは除外されている。

本剤の化学構造と物理化学的性質を以下に示す。

一般名：マイレン酸ヒドラジド

化学名：1,2-dihydro-3,6-pyridazinedione

構造式：



分子式：C₄H₄N₂O₂

分子量：112.1

外 観：白色結晶粉末

比 重：1.60

融 点：296℃

蒸 気 圧：なし

溶解度(g/ℓ)：水(25℃)4.0、メタノール4.5、エタノール2.0、アセトン0.1、ジメチルホルムアミド24
分配係数：4.7 (log Pow=-0.476)

以下に、本剤の各種毒性試験の結果を取りまとめて報告する。

急性毒性試験

MHのラットおよびマウスを用いた急性毒性試験結果は次表に示すとおりである。

動物種	投与経路	性別	LD50 (mg/kg)	試験機関 (実施年)
ラット	経口	雄	8200	徳島大学薬学部 (1977)
		雌	8000	
	皮下	雄	4200	徳島大学薬学部 (1977)
		雌	4600	
	腹腔内	雄	1370	徳島大学薬学部 (1977)
		雌	1250	
	経皮	雄	>2000	㈱ボゾリサーチセンター(1993)
		雌	>2000	
吸入 (LC ₅₀) (4時間全身暴露, mg/ℓ)	雄	>1314	㈱新日本科学 (1993)	
	雌	>1314		
マウス	経口	雄	6700	徳島大学薬学部 (1977)
		雌	5800	
	皮下	雄	4000	徳島大学薬学部 (1977)
		雌	4000	
	腹腔内	雄	1670	徳島大学薬学部 (1977)
		雌	1570	

MH-K32%液剤のラットおよびマウスを用いた急性毒性試験結果は次表に示すとおりである。

動物種	投与経路	性別	LD50 (mg/kg)	試験機関 (実施年)
ラット	経口	雄	>5000	大塚化学㈱ (1985)
		雌	>5000	
	経皮	雄	>2000	大塚化学㈱ (1985)
		雌	>2000	
マウス	経口	雄	>5000	㈱ボゾリサーチセンター(1993)
		雌	>5000	

一次刺激性試験

MH-K22%液剤のウサギを用いた眼粘膜および皮膚に対する一次刺激性試験結果は以下に示すとおり

である。

1. 眼粘膜一次刺激性試験

MH-K22%液剤の原液、30倍希釈液および60倍希釈液を雄ウサギの右眼にそれぞれ0.1ml点眼した。角膜、虹彩、および結膜の刺激性変化を点眼後7日間観察した。刺激性変化はDraize法の評価表に従って採点した。刺激性の評価はKay and Calandraの等級付けに従った。

その結果、原液では、角膜に軽度から中等度の白濁、結膜に中等度の血管拡張と腫張がみられた。30倍希釈液では、角膜に極く軽度から軽度の白濁、結膜に軽度の血管拡張がみられた。60倍希釈では流涙がみられたが、結膜に異常は認められなかった。

以上の結果より、MH-K22%液剤のウサギの眼粘膜に対する一次刺激性は、原液では中等度の刺激性、30倍希釈液では極く軽度の刺激性があると判断された。一方、使用濃度の60倍希釈液では刺激性はないと判断された。(徳島大学薬学部 1977年)

2. 皮膚一次刺激性試験

MH-K22%液剤の原液、30倍希釈液および60倍希釈液を刈毛したウサギの背部皮膚(無傷または有傷皮膚)にそれぞれ1ヶ所0.1mlずつ24時間塗布した。観察時間は7日間とし、刺激性変化は池田らの評価基準に従って採点した。

その結果、無傷皮膚においては、原液中中等度の紅斑、30倍希釈で極く軽度の紅斑がみられた。60倍希釈液では刺激性変化は認められなかった。有傷皮膚においては、原液および30倍希釈液で軽度から中等度の紅斑および浮腫、痂皮形成がみられた。60倍希釈液では極く軽度の紅斑がみられた。

以上の結果より、MH-K22%液剤はウサギの皮膚に対し無傷皮膚においては原液では中等度、30倍希釈液では極く軽度の刺激性があり、使用濃度の60倍希釈液では刺激性はないと判断された。有傷皮膚においては、原液および30倍希釈液では軽度から中等度、60倍希釈液では極く軽度の刺激性があるものと判断された。(徳島大学薬学部 1977年)

皮膚感作性試験

MH-K22%液剤の皮膚感作性を、モルモットを用いてBuehler法の改良法を用いて評価した。陽性対照群に2,4-ジニトロクロロベンゼン(DNCB)を処置し

た。

その結果、無希釈液剤での惹起処理に対し、試験群の動物には皮膚反応は全く認められなかった。陽性対照群では10匹中5匹に明らかな皮膚反応がみられた。

以上の結果より、本剤の反復閉塞皮膚適用によりモルモットにおける皮膚感作性は誘発されなかった。

(ライフサイエンスリサーチ社 1990年)

亜急性毒性試験

1. ラットを用いた亜急性毒性試験(13週間)

MH-Kを0、1000、3000、10,000および30,000ppmの濃度で、1群雌雄各20匹のFisher344系ラットに13週間混餌投与した。

飼育関連項目において、体重の増加抑制が30,000ppm群の雌雄に認められ、それに伴い食餌効率も低下した。血液学的検査において30,000ppm群の雌雄のヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、血小板数および白血球数に軽度の異常が認められた。生化学的検査においては一部の検査項目に対照群との差異がみられたが、薬物濃度との相関は認められなかった。解剖時には本薬物に起因すると思われる肉眼的変化を認めなかった。臓器重量においては、中・高濃度群の雄の肝臓、腎臓、および副腎に、また中濃度の雌の脾臓に軽度の増加が認められた。これらは対照群との間に有意差が認められたものの、いずれも本系統ラットの正常範囲内にあり、薬物濃度との関連も認められなかった。また他の検査項目にこれらの変動と一致した異常は認められなかった。病理組織学的検査成績において、本薬物投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

以上の結果より、本薬物の最大無作用量は雌雄とも10,000ppm(雄:684mg/kg/日、雌:694mg/kg/日)、また最小中毒量は30,000ppm(雄:2,083mg/kg/日、雌:2,073mg/kg/日)と判定された。

(助残留農薬研究所 1980年)

2. マウスを用いた亜急性毒性試験(14週間)

MH-Kを0、1000、3000、10,000および30,000ppmの濃度で、1群雌雄各20匹のICR系マウスに14週間混餌投与した。

その結果、30,000ppm投与群の雌雄に体重増加抑制と食餌効率の低下がみられた。雄では飲水量も増加した。30,000ppm投与群では、尿検査において、雌雄に蛋

白強陽性を示す個体が増加したが、この異常に一致した変化は他の検査に認められなかった。また血液生化学的検査においても、30,000ppmの雌雄に血漿タンパクの有意な減少、雄にカルシウムの有意な減少を認めた。しかしこれらの値は対照群と比較して有意ではあるが、その差は軽度であり特に異常な値であるとは考えられなかった。血液学的検査および病理学的検査においては、対照群と投与群との間に差を認めなかった。

以上の結果より、本薬物の最大無作用量は雌雄とも10,000ppm（雄：1,240mg/kg/日、雌：1,459mg/kg/日）、または最小中毒量は30,000ppm（雄：3,801mg/kg/日、雌：4,473mg/kg/日）と判定された。

（助残留農薬研究所 1980年）

慢性毒性試験／発癌性試験

1. マウスを用いた経皮投与による発癌性試験

DMBA (7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン) およびTPA (12-O-テトラデカノイルフォルボール-13-アセテート) による2段階腫瘍発生作用に対するMHの影響とMHそれ自体の腫瘍イニシエーター作用を調べた。供試動物として55日齢のICR系雌マウス(1群25~30匹)を用いた。MHは温水およびアセトンに、DMBA (腫瘍イニシエーター) およびTPA (腫瘍プロモーター) はアセトンに溶解し、刈毛したマウスの背部皮膚に塗布した。

DMBAによって誘発される腫瘍に対するMHの作用を調べるために、DMBA処理前に4回、処理後に3回それぞれMHを処理した。対照群動物にはDMBA処理前後にアセトンを同様に処理した。最終処理3週間後にプロモーター (TPA) を処理した。プロモーション処理5週後に、MH処理群および対照群に乳頭腫がみられ、7週後に測定可能となった。9週後、MH処理群での乳頭腫を有する動物数は対照群の約半数であった。また、担癌動物当たりの乳頭腫の個数は対照群の2.6個と比べ、MH処理群で2.0個と少なかった。従ってDMBAの催腫瘍性に対するMHの抑制作用は親化合物の無水マイレン酸の作用と酷似していた。

MHそれ自体の腫瘍イニシエーター作用を調べるために、マウスに2週間以上にわたり500 μ gずつ10回処理した。対照群には90 μ gのDMBAを単回処理した。3週後に、TPAを両方の試験群に処理した。イニシエ

ーターとしてMH、およびプロモーターとしてTPAを処理した群では腫瘍はみられなかった。一方、イニシエーターとしてDMBAを処理した群では27%のマウスに乳頭腫がみられた。

以上の結果より、MHにはDMBAによって誘発される腫瘍に対して抑制作用があり、また「腫瘍イニシエーター」作用はないことが確認された。

(J.Agric Food Chem.,24:672-674 1976年)

2. マウスおよびラットを用いた飼料混入投与並びに皮下投与による発癌性試験

MHを各群10~15匹の雌雄のマウスおよびラットに100週間、1%の混餌投与または水溶液として500mg/kg (ナトリウム塩) の用量で隔週に皮下投与した。対照群にはMHを添加していない飼料を与え、同用量の生理食塩水を皮下投与した。試験終了時には、大部分の動物が死亡年齢に達していたため、動物には特に肺や肝臓など諸臓器に広範囲の病理学的変化がみられた。成長および一般状態に及ぼす影響は認められなかった。対照群ならびに検体投与群ともに共通して多く認められた腫瘍は、雌ラットの乳腺線維上皮腫とマウスの肺腺腫であった。これらの腫瘍は通常の飼育マウスおよびラットに広く観察されるものであった。また、本剤投与群にみられた腫瘍の種類は、対照群のものと同様であった。MH投与群で腫瘍発生率の増加は認められなかった。

以上の結果より、本剤はマウスおよびラットに対し発癌性を有しないと判断された。

(Nature 180:62-64 1957年)

3. ラットを用いた飼料混入投与による繁殖性と発癌性の組合せ試験

各群雌50匹と雄25匹のSPFラットに、交配1週間前から0、1.0および2.0%の濃度でMHを混餌投与し、繁殖試験を行った。1週間の交配期間、妊娠および哺育期間を通じて検体混入飼料を与えた。この結果、受精率、仔動物の生存率、哺育率、および不妊のラット数は、各検体投与群と対照群間で同等であった。

離乳時に雌雄ラットを試験群の同腹仔から無作為に選び、発癌性試験に供した。2.0%群には雌雄各65匹、対照群および1.0%群には雌雄各55匹の動物を試験に供した。離乳後、それらの動物を親と同じ濃度の検体混入飼料で28ヶ月間飼育した。各群雌雄各5匹の中間屠殺は12ヶ月時に行った。

1.0%および2.0%の混餌濃度でMHを投与した雌では、実験開始から半年間に増体重の有意な低下が認められた。対照群動物と検体投与群動物では一般状態および行動において影響はなかった。また、死亡率についても検体投与の影響はなかった。飼料消費量については投与による影響はなかったが、摂水量の有意な増加が2.0%混餌投与群で18から25週の間のみられた。1.0%混餌投与群では摂水量の顕著な増加はみられなかった。尿タンパク値および尿中のタンパク/クレアチニン比は1.0%および2.0%混餌投与群で6および12ヶ月時に有意に増加した。他の尿検査項目および行動、飼料消費量、死亡率、臨床検査項目を含む毒性学的に意義のある観察項目では、MHの混餌投与による異常はみられなかった。12ヶ月時に屠殺した対照群、1.0%および2.0%混餌投与群の雌雄ラットの臓器重量についても、MHの投与によると思われる影響は認められなかった。12および28ヶ月時に屠殺したラットの肉眼的ならびに組織学的病理検査でも、投与による非腫瘍性変化は認められなかった。全動物、すなわち死亡動物と生存動物の腫瘍発生頻度、腫瘍発生部位ならびに種類についても、各群の雌雄動物で検体投与による差はみられなかった。腫瘍発生率、腫瘍の種類および死亡と関係する腫瘍発生時期については、いずれも対照群と検体投与群間で差はなかった。また、腫瘍発生に至る潜伏期間についても影響は認められなかった。検体投与と腫瘍発生の早期化との関連はなかった。

本試験では、MHにより1.0%および2.0%の混餌濃度で雌ラットの初期生育の低下がみられた。尿中のタンパク質/クレアチニン比の上昇により腎機能障害が示唆されたにもかかわらず、12および28ヶ月で腎臓の病理組織学的所見および重量に異常は認められなかった。また、この実験より、腎臓が本剤の標的臓器であり、1.0%以上の混餌濃度では腎機能障害が誘発されると結論された。

以上の結果、本剤はラットに対し発癌性を有しないと判断された。しかし、本剤を1.0%含む混餌投与群で腎機能に異常がみられたので、ラットに対する無作用量は混餌投与で1.0%未満と判断された。

(Toxicology 19: 139-150 1981年)

催奇形性および発育毒性試験

1. ラットを用いた催奇形性試験および発育毒性試験

MEA-MH(モノエタノールアミン塩)およびNa-MH(ナトリウム塩)の催奇形性および発育毒性について、Moli:WIST系雌ラット(11週齢)を用いて調べた。

MEA-MHまたはNa-MHを、500、1,500および3,000mg/kg/日の投与用量で、妊娠6~15日の10日間、強制経口投与した。また、3,000mg/kg/日の投与用量で、妊娠6~9日、9~12日または12~15日の4日間強制経口投与した。また、妊娠1~21日の21日間、3,000mg/kg/日の投与用量で強制経口あるいは、混餌投与し、両被験物質の催奇形性について調べた。その結果、MEA-MHの3,000mg/kg/日混餌投与群の母動物では体重および増体重の有意な減少がみられたが、同用量を強制経口投与した群ではこのような成長抑制や、飼料消費量の変動はなかった。Na-MHの3,000mg/kg/日強制経口投与群で、妊娠1~6日にみられた飼料消費量の減少を除き、投与期間を通じて母動物に悪影響は何ら認められなかった。また、繁殖に関するデータにおいて、MEA-MHの3,000mg/kg/日混餌投与群では、対照群と比べ、胎仔の平均体重は減少し、吸収胚数が増加した。Na-MH投与群では、本剤投与による影響はみられなかった。奇形の発現頻度については、両被験物質の1,500および3,000mg/kg/日の強制経口投与群で、胸骨分節の非対称、肋骨癒合、頸肋骨原基痕跡などの変異の発現数が対照群と比べ、幾分多かったが、統計学的有意差は認められなかった。MEA-MHの3,000mg/kg/日混餌投与群では、胸骨および頭骨以外の化骨遅延がみられた。これら以外の検査項目については検体投与による影響は認められなかった。以上の結果より、Na-MHはMEA-MHと比べ、母動物に対する毒性は低いと結論される。また、Na-MHおよびMEA-MHとも、低用量投与群(500mg/kg/日)では、催奇形性に関するすべての検査項目で毒性学上の影響は認められなかった。従って、両被験物質とも明らかな催奇形性作用は認められなかった。

MEA-MHの仔動物に及ぼす影響を調べるために、3,000mg/kg/日の投与用量で、母動物には、妊娠6~21日の16日間および哺育期間(仔動物の離乳時まで)、仔

動物には離乳後から試験終了時まで混餌投与した。投与動物により哺育されたF₁動物では、35日齢まで体重および増体重の明らかな低下がみられたが、増体重は離乳後で群間に差はなかった。発育に関する検査データでは、投与動物により哺育された雌雄仔動物とも13日齢で音刺激に対する飛上り反応が有意に遅延した。この減少は、雌雄共にみられたので、有意な影響と考えられる。MEA-MHを投与した親動物から生まれた仔動物では、3日齢の耳介の開口遅延を除き、発育に関する検査項目についてMEA-MHによる影響は何ら認められなかった。

(Bull. Environ. Contam. Toxicol. 33: 184-192 1984年)

2. ウサギを用いた催奇形性試験

MHを0、50、250、500mg/kg/日の用量で1群20匹のニュージーランドホワイト種妊娠ウサギに、妊娠7日から19日までの13日間、胃管を用いて経口投与し、被験物質の胚-胎仔毒性および催奇形性誘発能を調べた。

その結果、全ての投与群で死亡例はみられなかった。また、検体投与に起因する流産や早産もみられなかった。全ての臨床症状の観察結果および剖検所見は検体投与に関連したものとは考えられなかった。黄体数、着床数、同腹仔数、生存胎仔数、初期および後期吸収胚数、胎仔体重、性比および総吸収胚の百分率の腹毎の平均は全ての投与群間でほぼ等しく、それらに統計学的有意差はなかった。同様に、胎仔に外表、内臓および骨格奇形ならびに変異は検体投与により誘発されなかった。MHの500mg/kg/日投与群では投与期間中の母動物の体重増加量が対照群の33%に減少したので、母動物に対する最大無作用量は250mg/kg/日と判断された。また最高用量である500mg/kg/日においても、外表、内臓および骨格異常の発現頻度は対照群と同等であったことから、MHの発生毒性に対する最大無作用量は500mg/kg/日と考えられる。

以上の結果より、MHは、催奇形性を有さないものと判断された。

(アーガスリサーチラボラトリーズ社 1993年)

変異原性試験

1. 細菌を用いた復帰変異原性試験

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 *Salmonella*

typhimurium (TA100、TA1535、TA98およびTA1537) およびトリプトファン要求性大腸菌 *Escherichia coli* (WP2hcr(*uvrA*)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らの方法で、プレインキュベーション法によりMH-Kの変異原性を調べた。

その結果、MH-Kは代謝活性化を含め最高濃度である5000 μ g/plateの濃度においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。一方、陽性対照として用いたAF-2、ENNG、9-AA、BPおよび2-AAでは全ての検定菌株で明らかな復帰変異コロニー数の増加がみられた。

以上の結果より、検体は代謝活性化を含む本試験条件下で復帰変異誘発性を有しないものと判断された。

(大塚化学株式会社、1986年)

2. In vitro染色体異常誘発性試験

CHL細胞(チャイニーズハムスター肺由来腺維芽細胞)を用いて、MH-Kの染色体異常誘発性の有無を調べた。細胞増殖抑制試験の最高濃度は、約10mMである1.50mg/plateとした。試験の結果、直接法、代謝活性化法とも最高濃度で細胞増殖抑制作用がほとんど認められなかったため、染色体異常試験の最高濃度を1.50mg/plateとした。

染色体異常試験の結果、直接法、代謝活性化法ともすべての処理群で、構造異常および倍数性細胞の出現率の増加は認められず陰性と判定した。

以上の結果より、MH-Kは本条件下で染色体異常誘発性を有しないと判断された。

(ビー・エム・エル 1990年)

生体機能に及ぼす影響

MHの生体機能に及ぼす影響をラット、マウスまたはウサギを用いて調べた。

その結果、技術的に投与可能な最高用量である1,000mg/kg投与では行動観察を除く中枢神経系、自律神経系、消化器系、血液および肝機能に対して何ら影響は認められなかった。行動観察において、行動的プロフィールでは視覚位置、受動性、触反応および疼痛反応の低下あるいは鈍化、神経学的プロフィールでは針金に対する動作性(握力)、腹筋緊張度および同側性屈曲反射の低下がみられた。これらの変化のうち、行動的プロフィールの変化については賦形剤(0.5%

CMC)対照群にも認められていることから、検体投与による影響とは考えられなかった。また神経学的プロフィールの変化についても、筋弛緩作用、鎮痛作用および麻酔作用等を調べた個別試験でいずれの作用も認められなかったことから、検体投与による明らかな薬理作用とは考えられなかった。

腎機能に関しては、1,000mg/kg投与では尿量の増加、ナトリウムの増加およびpHの上昇がみられたが、500mg/kg投与では影響は認められなかった。

以上の結果より、MHは500mg/kgの用量では生体機能に対して何ら影響を及ぼさないものと思われる。

(大塚化学株式会社 1993年)

要約

MHの安全性評価のための各種試験を実施した。

MHは急性毒性試験の結果、普通物に分類される薬物であった。

MH-K22%液剤は原液および30倍希釈液では刺激性を示したが、使用濃度の60倍希釈液では刺激性はなかった。また、ウサギの皮膚に対し無傷皮膚においては原液および30倍希釈液で刺激性があり、使用濃度の60倍希釈液では刺激性はなかった。有傷皮膚においては、原液および30倍希釈液で刺激性があり、60倍希釈液では弱い刺激性があった。皮膚感作性試験は陰性であった。

亜急性毒性試験および慢性毒性試験/発癌性試験では、マウス、ラットにおけるMH高用量投与群において体重増加抑制と食餌効率の低下がみられたが、臨床病理学的検査に異常はなかった。マウスを用いた経皮投与およびマウス、ラットを用いた混餌投与、皮下投与のいずれの試験においても発癌性は認められなかった。ラットを用いた28ヶ月間の混餌投与試験では1%の混餌群で腎機能に異常がみられたが、発癌性は認められなかった。

ラットを用いた繁殖/催奇形性試験およびウサギにおける催奇形性試験では、繁殖に及ぼす影響も催奇形性も認められなかった。

変異原性試験では、細菌および培養細胞を用いた試験系では、変異誘発性が認められなかった。

薬理試験では、1,000mg/kg投与では行動観察を除く中枢神経系、自律神経系、消化器系、血液および肝機能に対して影響は認められなかった。腎機能に関して

は、1,000mg/kg投与では尿量の増加、ナトリウムの増加およびpHの上昇がみられた。

MH-Kは昭和53年2月に22%液剤として登録を取得し、その後昭和62年12月に32%液剤として新たに登録を取得した。本剤は上市以来、葉タバコの腋芽抑制剤として高い評価を受けている。

MH-Kは定められた使用基準および作業基準を遵守すれば安全性の高い農薬であり、農業資材の一つとして有用であると考えられる。

問合せ

大塚化学株式会社 農薬肥料開発部

〒540 大阪市中央区大手通3-2-27