

技術情報

マレイン酸ヒドラジドコリンの毒性試験の概要

日本ヒドラジン工業株式会社開発部

(昭和62年8月20日受理)

薬剤の概要

マレイン酸ヒドラジド(以下MHと略す)は1895年に Curtius らによって合成され、その50年後に Schoene, Hoffman (1949年)らによって初めて植物の発芽抑制、生育抑制等の生理活性が報告された。次いで、Crafts, Currier (1950~59年), 伊藤 (1955~64年), 緒方, 井上 (1955~58年)らによって数多くの生理作用についての研究が行なわれ、Andreae (1953年)らによってMHは抗オーキシン物質であると発表された。

当社は1967年以来、MHの種々の塩について研究し、この中からコリン塩を選んだ。コリンは動物の臓器中や、穀類、豆類、いも類などの天然物中に広く存在している物質であり、塩化コリンの形で飼料添加物として長年使用されているところから安全性の高い物質と考えた。その後、MHコリン塩の各種植物に対する生理活性試験を実施し、他の塩類との比較においてMHコリン塩が優れていることを確認した。1976年以降に実施した各種毒性試験から、食用作物への展開が可能と判断されたので、諸種の作物に対する適用試験を行ない登録を申請した。なお、MHコリン塩を食用作物に適用するに当たり、不純物であるヒドラジンの混入量を少なくすることに留意し、製剤中のヒドラジン含有量を1ppm以下に規定することにした。本剤は昭和61年4月、ばれいしょ、たまねぎおよびてんさいの貯蔵中の萌芽抑制剤として「エルノー」の商品名で登録された。本稿では本剤の安全性評価のために実施した各種毒性試験成績の概要を報告する。

本剤の有効成分の化学構造、物理化学的性質および成分組成を以下に示す。

1. 名称および化学構造

種類名: マレイン酸ヒドラジド液剤

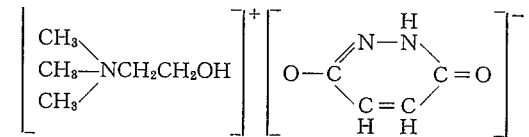
商品名: エルノー

一般名: マレイン酸ヒドラジドコリン Choline salt

of maleic hydrazide

化学名: Choline salt of 1,2-dihydro-3,6-pyridazine-dione

構造式:



分子式: $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$

分子量: 215.25

2. 原体および製剤の物理化学的性質

	原体	製剤
外観	淡黄色澄明液体	淡黄色澄明液体
比重	1.15 (25°C)	1.10 (25°C)
pH	10.1	8.6
溶解度	水に任意に溶解	水に任意に溶解
分配係数	1.42×10^{-2} (<i>n</i> -オクタノール/水)	

3. 製剤の安定性

熱および光に安定(2年9か月間直射日光下で変化なし)。アルカリ性に安定、酸では分解してMHを遊離する。

4. 製剤の成分組成

有効成分: マレイン酸ヒドラジドコリン 39.0%

補助成分: 水, 界面活性剤 61.0%

(ヒドラジン 1ppm以下)

急性毒性試験

マレイン酸ヒドラジドコリン原体(58.0%)の急性毒性試験結果を以下に示す。

投与経路	動物種	LD ₅₀ (mg/kg)	試験機関 報告書作成年
経口	マウス	♂ 11,960	日本実験医学研究所
		♀ 11,050	
経口	ラット	♂ 11,390	
		♀ 10,760	

経皮	ラット	♂ 17,090以上 ♀ 17,090以上	1974年	
皮下	マウス	♂ 820 ♀ 935	1980年	臨床医科学研究所
	ラット	♂ 1162 ♀ 1110		
腹腔内	マウス	♂ 570 ♀ 645	1980年	
	ラット	♂ 833 ♀ 755		
吸入	ラット	♂ 6.26 mg/l 以上 ^{a)}	1984年	残留農薬研究所
		♀ 5.97 mg/l 以上 ^{a)}		

^{a)} LC₅₀ 値 (4時間暴露)。

刺激性試験

試験機関: 臨床医科学研究所

報告書作成年: 1980年

1. 眼一次刺激性試験

日本白色在来種ウサギ雄1群3匹を用い、原体 (58.0%, ヒドラジン含量 3.06 ppm) および5倍水溶液 0.1 ml を点眼し、4秒後に洗浄を行なった。点眼後1時間、6時間、1日、2日、3日後に角膜、紅彩、結膜を観察した (Draize 法による)。

5倍水溶液群では、きわめて軽度の結膜の充血が1例みられた。原体群では、閉眼、流涙がみられ、結膜の軽度の充血および分泌物が6時間後まで認められたが、1日後には正常に回復した。

傷みは浸透性、pH、解離イオン濃度が関係しているものと思われるが、眼粘膜に対する反応などから原体には多少の刺激性があると判断した。

2. 皮膚一次刺激性試験

6匹のウサギの背中の中毛剃した皮膚 (16 cm²) に原体および5倍水溶液 0.5 ml を塗布し、4時間、1日、2日後に塗布部分の変化を観察した。

原体群、5倍水溶液群で軽度の紅斑が1例および2例、原体群で明らかな紅斑が1例とごく軽度の浮腫が1例みられたが、いずれも48時間後には回復した。

本検体には皮膚に対する局所刺激はなく、刺激性は陰性であると判断された。

マウスにおける亜急性経口毒性試験

試験機関: 日本実験医学研究所

報告書作成年: 1976年

JCL-ICR 系マウス (5週齢) 1群雌雄各10匹を用い原

体 (59.77%, ヒドラジン含量 3.32 ppm) 0, 0.04, 0.2, 1, 5, 25 ml/kg を加えた飼料を13週間摂食させた。

25 ml/kg 投与群雌で1例の死亡を認めた以外には異常は認められなかった。25 ml/kg 投与群雌雄で体重抑制、および摂餌量、食餌効率、飲水量の低下が認められた。血液学的検査および尿検査では特記すべき変化はなく、血清生化学的検査で 5 ml/kg 投与群の尿素窒素、25 ml/kg 投与群の GPT、アルカリフォスファターゼ、尿素窒素などの高値が認められたが肝、腎重量の低値および摂餌量の低下による体重増加抑制をあわせて考慮すると本検体の肝および腎への影響は栄養状態の不良による影響と推察された。臓器重量および体重比の変化が 25 ml/kg 投与群雌雄のみに認められたが体重増加抑制に起因するもので、病理組織学的検査も検体投与との関連はなかった。

以上のように 25 ml/kg 投与群雌雄では忌避により、摂餌量が減少し、体重増加が抑制された。5 ml/kg 以上の投与群雌雄で、生化学的に肝および腎の障害を思わせる変化があったがこれらの臓器重量および体重の低下が認められるところから、栄養状態の不良の影響が大であると考えられた。病理解剖および組織学的に投与に起因する一定の傾向はなかった。したがって最大無作用量は 1 ml/kg (雄 1104 mg/kg/日, 雌 1165 mg/kg/日) であると判断された。

ラットにおける亜急性経口毒性試験

試験機関: 日本実験医学研究所

報告書作成年: 1976年

ウィスター系ラット、1群雌雄各10匹を用い、原体 (59.77%, ヒドラジン含量 3.32 ppm) を 0, 0.04, 0.2, 1, 5 ml/kg 混合した飼料を13週間摂食させた。

投与期間を通じ全群検体投与による異常は認められず死亡例もなかった。5 ml/kg 投与群のみ体重抑制、および摂餌量、飲水量、食餌効率の低値が認められた。血液学的検査および尿検査では各投与群と対照群の間に有意差は認められなかった。血清生化学的検査で 5 ml/kg 投与群雌雄でコレステロールの減少、同雌で尿素窒素の増加、総タンパクの減少が認められたが、腎の病理組織学検査の結果、特記すべき変化は認められないことと体重増加抑制をあわせて考察すると本検体の肝および腎への影響は栄養状態の不良による影響と推測された。臓器重量は 5 ml/kg 投与群で若干変動が認められる臓器もあったが、これらの変化は体重増加抑制によるもので、検体投与による影響とはみなしがたい。

以上を総括すると 5 ml/kg 投与群に体重増加抑制が認

められ、これに付随して血清の生化学的検査および臓器重量および同体重比に変化があったのでこれを最小中毒量 (5 ml/kg) とし、最大無作用量は 1 ml/kg (雄 1062 mg/kg/日, 雌 1172 mg/kg/日) と判断した。

ラットにおける慢性毒性試験

試験機関: (財)残留農薬研究所

報告書作成年: 1980年

ウィスター系ラット (6週齢), 1群雌雄各 65匹を用い、原体 (58.56%, ヒドラジン含量 3.72 ppm) を 0, 500, 5000, 50,000 ppm 含有する飼料を 24か月間摂食させた。

全試験を通じ投与薬物に伴う異常は認められず死亡率は 0, 500, 5000, 50,000 ppm 投与群雄でそれぞれ 37, 51, 37, 22%, 雌で 43, 51, 39, 35% であった。50,000 ppm 投与群の雌雄に体重増加抑制が認められた。摂餌量は 50,000 ppm 投与群雌において全試験期間にわたり、雄では初期に軽度の減少を認めた。食餌効率も 50,000 ppm 投与群は雄で軽度な、雌で顕著な低値を示し、飲水量は 50,000 ppm 投与群雌でのみ軽度に減少した。

血液学的検査、血清生化学的検査および尿検査ではいずれも異常は認められなかった。臓器重量は 50,000 ppm 投与群に体重減少に伴う実重量の減少と体重比の増大があり、その他の濃度群でも散発的に有意差のみられた臓器もあったが、薬物投与による中毒性影響と考えられる重量の増減はなかった。肉眼的病理検査でも 50,000 ppm 投与群は体軀が他群に比し小型で、皮下および腹腔内の脂肪沈着も著しく少なかった。病理組織学的検査では腫瘍性病変発生頻度、非腫瘍性病変発生頻度とも薬物投与群と対照群との間に差は認められなかった。

以上のように 50,000 ppm 投与群雌雄で全試験期間にわたり、体重増加抑制が認められ、雌では摂餌量および飲水量の減少を伴った。病理学的検査を含めたその他の検査項目については薬物投与に関連すると考えられる異常は認められなかった。5000 ppm 以下の濃度群雌雄には異常は認められなかったので本試験の最大無作用量は 5000 ppm (雄 183 mg/kg/日, 雌 215 mg/kg/日) であると判断された。

犬における慢性毒性試験

試験機関: ライフ・サイエンス・リサーチ, (財)残留農薬研究所

報告書作成年: 1981年

純系ビーグル犬 (37~38週齢), 1群雌雄各 4匹を用い、原体 (58.56%, ヒドラジン含量 4.60 ppm) を 0,

100, 300, 1000 mg/kg/日で必要量を体重 1 kg 当り 2 ml の割合で調合した水溶液を胃カテーテルを用いて 104週間毎日経口投与した。

本剤投与群で 8週後まで、軟便あるいは水様便が多発した。1000 mg/kg 投与群では投与 8週間後以降も低頻度ではあるが継続して認められた。死亡例はなく、その他に薬物投与に関連づけられる異常は認められなかった。体重変化ならびに摂餌量、飲水量とも本剤投与群と対照群の間に差はなかった。血液学的検査の血液像、および血清生化学的検査での血液の生化学的組成には薬物投与による影響はなかった。尿成分には異常は認められず、臓器重量も薬物投与に起因すると思われる投与群と対照群との差を認めなかった。投与 104週剖検時、数頭の雌は正常な発情期にあり、このため子宮および卵巣重量が高値を示した。肉眼的病理検査では異常を認めず、病理組織学的検査でも非腫瘍性病変および腫瘍性病変に関して薬物投与に關係すると思われる変化はなかった。

以上のように本慢性毒性試験では薬物投与に起因すると考えられる変化は、投与 8週後までは全投与群において、また 1000 mg/kg 投与群では全期間を通じて認められた便の硬さの軽度の異常のみであった。したがって、本薬剤を最高 1000 mg/kg までの用量で 2年間毎日ビーグル犬に経口投与しても、明確な毒性作用は現わさなかったため、最大無作用量は雌雄とも 1000 mg/kg/日であると判断された。

ラットにおける次世代に及ぼす影響

試験機関: (財)動物繁殖研究所, (財)残留農薬研究所
報告書作成年: 1981年

ウィスター・イマミチ系ラット, 1群雌雄各 40匹を用い、原体 (58.56%, ヒドラジン含量 3.92 ppm) 0, 1000, 10,000 ppm 含有した飼料を全試験期間継代摂食させた。

1. 親動物および育成群

本剤摂取に起因する中毒症状の発現は観察されず、死亡例もなかった。1000 ppm 投与群の F₀ 世代雄, 10,000 ppm 投与群の F₀, F₁ 世代の雌雄にきわめて軽度の体重増加抑制がみられた。摂餌量、飲水量とも対照群に比べ、有意差はなかった。臓器の湿重量および体重比について散発的な軽度の変化はあったが、世代間の関連性がないことから特異的な毒性所見ではないと判断された。肉眼的病理検査成績に異常はなかった。

2. 繁殖所見

雄の妊孕率については F₀(親) 世代の F_{1a} および F_{1b} を得る交配でともに 97% 以上であり、対照群と投与群の間に差異は認められなかった。F₁ 世代においては F_{2a}

および F_{20} の交配を通じ、各投与群とも全例の個体の妊娠能のあることが確認された。雌の妊娠率についても対照群と投与群の間に差は認められず、各世代ともに第2回目の交配では90%以上の妊娠率を示した。すなわち、妊娠率および妊娠率とも薬物投与の影響は認められなかった。分娩日および哺育期間中の観察でも各投与群とも対照群と差がなく、本剤の繁殖に及ぼす影響はないと判断された。

3. 哺育所見

哺育生存率に関しては各世代、各産次のいずれの投与群においても対照群との間に有意差は認められず97.2%以上の良好な成績であった。哺育仔の形態的分化状態および機能検査では各世代とも薬物投与に関連した変動は認められなかった。性成熟に関する観察でも薬剤投与に関連するとみられる差異は認められなかった。

4. 催奇形性所見

帝王切開時の観察において生存仔の外表奇形としては F_1 胎仔においては対照群に無尾症が1例(0.75%)、 F_2 胎仔において1000 ppm 投与群に耳頭症が1例(0.67%)認められた以外に外表奇形は観察されず、これら外表奇形は自然発症奇形率の範囲内であった。黄体数、着床数、生胎仔数については各世代とも対照群と投与群の間に差はなくいずれの値も本系統ラットにおける正常範囲内に含まれていた。さらに、着床率、胎仔死亡率に関しては F_0 、 F_1 世代とも群間に有意差は認められず、優生致死作用や胎仔毒性はないことが確認された。生胎仔体重では1000 ppm 投与群の F_2 胎仔で対照群に比して有意に低かったが、10,000 ppm 投与群ではまったく認められなかった。胎仔の奇形学的観察で骨格の異常は数例認められたが、いずれも対照群との間に有意差は認められなかった。化骨進行度については1000 ppm 投与群の F_2 胎仔において第3指骨の化骨核数および中足骨の化骨核数が対照群に比して有意に少なかった。しかし10,000 ppm 投与群では対照群との間に差は認められなかった。内臓検査において散見的に現われた異常は F_1 および F_2 胎仔とも対照群と投与群の間に有意差は認められなかった。以上のように外表、骨格および内臓において、本剤の摂取によって誘発されたと考えられる奇形は観察されなかったため、本剤の催奇形性作用はないと判断した。

以上の結果より、最高用量 10,000 ppm (F_0 : 雄 576 mg/kg/日、雌 1009 mg/kg/日、 F_1 : 雄 652 mg/kg/日、雌 1007 mg/kg/日、 F_2 : 雄 904 mg/kg/日、雌 923 mg/kg/日)を用いても各世代とも中毒症状および死亡例は認められ

ず、妊娠能、妊娠能は正常で、分娩および哺育行動にも異常は観察されず F_0 世代から F_2 世代まで正常に継代された。また、催奇形性作用を示さず、胎仔毒性もなかった。ゆえに本剤は繁殖ならびに次世代に対して何ら影響を及ぼさないものと判断した。

変異原性試験

試験機関: (財)残留農薬研究所

報告書作成年: 1983年

1. Rec-assay

原体 (59.20%, ヒドラジン含量 2.83 ppm) について枯草菌の組換え修復機構野生株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、賀田らの rec-assay 法で DNA への損傷の誘起性を検定した。

本検体の存在下においては、両株の生育阻止帯を誘起しなかった。一方、陰性対照として用いた Kanamycin では両株に同程度の生育阻止帯を示し、陽性対照として用いた Mitomycin C では H-17 株に比べ M-45 株に著明な生育阻止帯を生じた。

以上の結果より本剤の DNA 損傷誘起性は認められなかった。

2. 復帰変異試験

原体 (58.20%, ヒドラジン含量 2.83 ppm) についてヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*S. typhimurium* TA 1535, TA1537, TA1538, TA98, TA100 株) およびトリプトファン要求性大腸菌 (*E. Coli* WP2 hcr (*uvrA*) 株) を用い、ラット肝から調製した薬物代謝酵素系の存在下および非存在下で Ames らの方法で変異原性を検定した。陽性対照として AF-2, ENNG, 9-AA, 2-NF および 2-AA を用いた。

本検体の存在下では S-9 Mix の有無にかかわらず、いずれの株においても対照群と比べ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, 2-NF では S-9 Mix の添加なしで、2-AA では S-9 Mix の添加により対照と比較して著明な復帰変異コロニー数の増加が認められた。

以上の結果から本剤の復帰変異誘起性は認められなかった。

問合せ

日本ヒドラジン工業株式会社開発部

〒100 東京都千代田区内幸町 2-1-1 飯野ビル