

ホルクロルフェニユロンの毒性試験の概要

協和醗酵工業株式会社バイオケミカル事業本部バイオケミカル営業部農薬学術担当
(平成10年2月20日受理)

薬剤の概要

ホルクロルフェニユロンは合成のサイトカイニン活性を有する化合物で、東京大学薬学部の首藤教授等により発明され、協和醗酵工業株式会社が開発した植物成長調整剤である。サイトカイニン活性物質の構造相関の研究から、4-ピリジルフェニル尿素(4-PU)に強いサイトカイニン活性のあることが見出され、中でも極めて強い活性を示す4-PUの置換体として本化合物が選抜された。1980年特許の専用実施権の許諾を受けた協和醗酵がKT-30の試験名で日本植物調節剤研究協会を通じて全国各地で公的試験を開始し、1988年3月「フルメット液剤(0.10%)」の商品名で登録申請し、1989年3月登録になった。

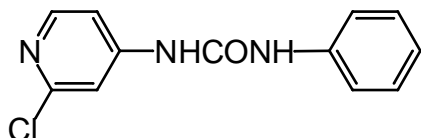
本剤は、ブドウ、キウイフルーツ、ナシ及び西洋ナシの果実肥大促進やブドウの花振り防止、メロン、スイカ、カボチャ等ウリ類の着果剤として広く利用されている。本剤は微量で作物に作用し、作物残留も検出限界(0.01ppm)以下で哺乳動物や有用生物等に対する毒性も低く環境等に及ぼす影響は少ない。

本化合物の化学構造及び物理的・化学的性質を以下に示す。

一般名：ホルクロルフェニユロン (forchlorfenuron)

化学名：1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea

構造式：



分子式：C₁₂H₁₀ClN₃O

分子量：247.68

外 観：白色の結晶性粉末

融 点：171

蒸気圧：2.5 × 10⁻¹¹ mmHg (25) (補外値)

溶解性 [g/l・測定温度20]

水：0.11；メタノール：119；無水エタノール：149；アセトン：127；

クロロホルム：2.7；アセトニトリル・水混液(1:1)：18.4

分配係数：LogP_{ow}=1.3 [n-オクタノール/水]

急性毒性試験

ホルクロルフェニユロン原体及び製剤のラット、マウスにおける経口、経皮及び吸入の各経路による急性毒性試験結果を表1に示す。ホルクロルフェニユロン原体のラットの経口投与では、中毒症状として雌雄に関係なく音及び接触に対する反射消失、自発運動減少、横転、側臥、腹臥、背臥、間代性痙攣、体温低下、流涎、流涙、血様分泌物(眼)、眼瞼下垂、眼瞼閉鎖及び被毛の汚れが観察され、死亡動物の胃に出血が認められた。マウスでもラットとほぼ同様な中毒症状が観察されたほか、死亡動物の病理解剖所見として、雄で腺胃に出血点、腎臓の肥大及びのう胞、小腸に局所的な拡張、充血及び出血、雌に腺胃の出

表1 ホルクロルフエニユロンの急性毒性試験結果

検体	動物種	投与経路	性別	LD ₅₀ 値 (mg/kg)	試験機関 (報告書作成年)
原体	ラット	経口	雄 雌	2787 1568	(財)食品農医薬品安全性 評価センター(1986)
		経皮	雌雄	>2000	
原体	マウス	吸入	雌雄	>1.82mg/l	バイオリサーチ・ラボ ラトリーズ(1987)
		経口	雄 雌	2218 2783	
製剤 (0.10%液剤)	ラット	経口	雌雄	>5000	(財)食品農医薬品安全性 評価センター(1987)
		経皮	雌雄	>2000	
	マウス	経口	雌雄	>5000	

血点，腎臓ののう胞が認められた．生存動物の病理解剖所見で，腎臓ののう胞が雌雄に，脾臓の腫大及び腸間膜リンパ節の腫大が雌にみられた．

ラットにおける経度毒性は弱く，観察期間中，中毒症状等は認められず死亡例もなかった．ラットの吸入試験では暴露直後から鼻面赤化がみられ，1日後消失．1日後から5日後まで鼻孔からの流出物が認められた．製剤の経口投与ではラット，マウスとも中毒症状として，失調性歩行，自発運動減少，側臥，腹臥，眼瞼下垂等が認められたが，観察終了時の病理解剖所見には肉眼的異常は認められなかった．製剤の経度投与では肉眼的異常はなかった．

一次刺激性試験

1．眼一次刺激性試験

ホルクロルフエニユロン100mgを日本白色種ウサギ9匹の左眼に投与し，右目を対照眼として角膜，虹彩及び結膜の異常を観察した．3匹については適用後2～3分に微温湯で洗眼した．洗眼群には刺激性は認められず，非洗眼群において角膜及び虹彩の刺激性変化がみられたが72時間後には消失した．結膜にも発赤や浮腫が投与後1時間から認められたが72時間後には消失した．

以上よりホルクロルフエニユロンは眼粘膜に対し刺激性があるものの，適用役速やかに洗眼すれば刺激性はなくなるものと推察された．

製剤についてもその0.1mlを供試し，原体と同様な方法で投与後1，24時間その後は7日まで1日1回観察した．非洗眼群で，角膜の混濁，虹彩の充血，結膜の発赤や浮腫のほか，閉眼及び分泌物が観察された．洗眼群にも，非洗眼群と同様な変化がみられたが，その程度，頻度等は軽微で洗眼効果が認められた．以上の結果から製剤はウサギの眼に対し，強い刺激性を有し洗眼効果を認めると判断された．(ボゾリサーチセンター，1987年)

2．皮膚一次刺激性試験

ホルクロルフエニユロン500mgを常法により日本白色ウサギ6匹の刈毛した背中の皮膚

に貼付し，4時間被覆固定した．その結果，いずれの動物においても紅斑，浮腫等の異常は認められなかった．

以上よりホルクロルフエニユロンはウサギの皮膚に刺激性を有しないものと考えられた．

一方，製剤0.5mlを供試し，原体と同様に試験した結果，検体除去1時間後の観察において，動物全例に軽度な紅斑が認められたが，72時間後にはすべて消失した．以上より製剤はウサギの皮膚に対し，軽度の刺激性ありと評価された．

(ボゾリサーチセンター，1986・1987年)

皮膚感作性試験

ホルクロルフエニユロン原体及び製剤につき，それぞれHartley系モルモット1群20匹を用いMaximization法で試験した．

陽性対照にはジニトロクロロベンゼンを用いた．その結果，原体については皮膚に特記すべき変化は認められなかった．ジニトロクロロベンゼンには明らかに陽性の皮膚感作性がみられた．製剤についても原体と同様，特記すべき変化は認められず，ホルクロルフエニユロン原体及び製剤には本試験条件において皮膚感作性はないと判断された．

(ボゾリサーチセンター，1986・1988年)

亜急性毒性試験

1．ラットを用いた強制経口投与による亜急性毒性試験

ホルクロルフエニユロンの0.5%CMC溶液を125，250,500，1000及び2000mg/kgの5投与用量で，1群5または10匹のWistar系ラットに1日1回，30日間連続強制経口投与した．500mg/kg投与群以下には特記すべき症状は認められず，死亡例もなかった．

1000mg/kg以上の投与群では，鼻周囲の汚れ，立毛，不規則呼吸，消瘦，衰弱，低体重，摂餌量及び飲水量の減少が認められ，60%以上の動物が死亡した．

血液生化学的検査では，血清総蛋白の減少，コレステロールの増加，BUN及び総脂質の増加傾向がみられた．病理組織学的検査では500mg/kg投与群以上の腎臓で尿細管上皮の変性，脱落がみられ1000mg/kg投与群では，さらにリンパ，造血器系組織に萎縮性変化が認められた．以上の結果より，本試験における最大無作用量は250mg/kgと推定された．

(協和醗酵工業株式会社，1981年)

2．ラットを用いた混餌経口投与による亜急性毒性試験

ホルクロルフエニユロンの0，500，1000，2500，5000及び10,000ppmを含有する飼料を1群雌雄各5匹のWistarラットに28日間自由に摂取させた．中及び高投与群の一部の動物については，さらに4週間投与を持続した．その結果，10,000ppm投与群では，体重増加抑制，貧血傾向，総蛋白の減少やコレステロールの増加，前立腺・精のうの萎縮，腎臓と骨髄の腿色等がみられた．

5000ppm投与群では，体重増加抑制傾向がみられたが，その他の検査項目には検体投与の影響がなかった．

250ppm以下の投与群に異常はなかった．

(協和醗酵工業株式会社，1981年)

3．マウスを用いた混餌経口投与による亜急性毒性試験

ホルクロルフエニユロンの0，500，1000，2500，5000，10,000及び20,000ppmを含有す

る飼料を1群雌雄各6匹のICR系のSPFマウス(Crj:CD-1)に4週間自由に摂取させた。20,000ppm投与群には顕著な体重増加抑制や死亡例がみられたほか血液学的検査,血液生化学検査項目で検体投与による影響がみられた。10,000ppm以下の投与群に異常はなかった。(残留農薬研究所,1983・1984年)

慢性毒性及び発がん性試験

1. ラットを用いた24ヵ月慢性毒性・発がん性試験

ホルクロルフェニユロンの0,50,500,2500及び5000ppmを含有する飼料を1群雌雄各60匹のSlc:Wistar系ラットに24ヵ月間自由に摂取させた。死亡率が5000ppm投与群雄のみで有意に低かった。2500ppm以上の投与群で摂餌量及び体重増加抑制が認められた。病理組織学的検査では検体投与による異常はなく,また腫瘍性病変も増加しなかった。

以上の結果より,本試験の最大無作用量は500ppm[雄:22.0,雌:25.9mg/kg/day]で,催腫瘍性はないと判断された。(協和醗酵工業株式会社,1987年)

2. マウスを用いた24ヵ月慢性毒性・発がん性試験

ホルクロルフェニユロンの0,50,500,5000及び10,000ppmを含有する飼料を1群雌雄各80匹のICR系SPFマウス(Crj:CD-1)に24ヵ月間自由に摂取させた。

10,000ppm投与群では雌雄ともに体重,飼料摂取量,食餌効率及び飲水量が減少した。雄で尿細管萎縮及び副腎被膜下細胞増生が増加した。腫瘍性病変では腎臓皮質上皮性腫瘍が増加し,その前段階病変の尿細管上皮過形成も増加した。病理組織学的検査では,10,000ppm投与群の雄において副腎被膜下細胞増生と腎臓尿細管上皮の萎縮と過形成を含む増殖性病変が観察された。尿細管上皮の増殖性病変と毒性変化の相関を調べるため,PCNA法により細胞増殖活性を検査したところ,陽性率は10,000ppm投与群の雄で対照群に比し高かった。このことから検体投与による腎毒性のため,尿細管障害が持続し,結果的に腎臓近血尿細管上皮増殖活性を高めたもので,検体投与が尿細管上皮の増殖活性を直接高めたものではないことが示唆された。5000ppm投与群でも体重,摂餌量が減少したほか,雄に腎臓の増殖性病変と副腎被膜下細胞増生が軽度増加した。

500ppm以下の投与群には検体投与による影響はみられなかった。以上の結果より,本試験における無作用量は500ppm[雄:46.1,雌:48.5mg/kg/day]と判断された。

(残留農薬研究所,1987・1994年)

3. イヌを用いた12ヵ月経口慢性毒性試験

ゼラチンカプセルに封入したホルクロルフェニユロンの0,20,100及び500mg/kg/dayを1日1回1群雌雄各4匹のビーグル犬に12ヵ月間連続経口投与した。

すべての投与群の雌雄において,一般状態,体重,摂餌量及び血液学,血液生化学ならびに病理組織学的検査を含む諸検査に異常は認められなかった。以上の結果より,本試験における無毒性量は500mg/kg/day以上と判断された。

(食品農医薬品安全性評価センター,1997年)

繁殖性に及ぼす影響及び催奇形性試験

1. ラットを用いた2世代繁殖試験

ホルクロルフェニユロンの0,300,1000及び3000ppmを含有する飼料を1群雌雄各25

匹のWistar-Imamichiラット（SPF）のF₀及びF₁ 2世代にわたって投与開始から児離乳時までの約17週間自由に摂食させ、繁殖能に及ぼす影響について検討した。一般状態、生死、交尾率、妊娠率、出産率、1腹平均の出産児数及び哺育児生存率や生殖器系の肉眼的病理組織学的検査にも検体投与の影響はみられなかった。1000ppm投与群以上で摂餌量の低下による体重増加抑制や飲水量の増加、脾臓重量の上昇、卵巣重量の低下が認められた。

本試験におけるF₁世代の体重増加抑制は、離乳時における再現性に乏しい偶発的な体重低下に起因するものと考えられたが、確認のため0、30、100及び300ppmの用量で追試した結果、F₁児の発育に及ぼす影響はいずれの用量においても認められなかった。以上、本試験及び追加試験の結果より100ppm [雄：9.32，雌：10.14mg/kg/day] を無作用量、300ppm [雄：29.16，雌：30.63mg/kg/day] を毒性学上の無毒性量と判断した。

（動物繁殖研究所，1987・1995年）

2．ラットを用いた催奇形性試験

0.5%CMC水溶液に懸濁したホルクロルフェニユロンの0、60、180及び540mg/kg/dayを1群24匹のWistar-Imamichiラットに妊娠6日目から15日目までの10日間、毎日1回強制経口投与した。ラットは妊娠21日に帝王切開し、胎児毒性及び催奇形性の有無を検討した。

540mg/kg投与群の母動物に摂餌量及び飲水量の低下による体重増加抑制がみられ胎児の発育を軽度抑制したが、母動物の妊娠維持に影響を及ぼさず、胎児に対して催奇形性及び致死作用を示さなかった。以上の結果より、母体及び胎児における無作用量はそれぞれ、60及び180mg/kg/dayと推察された。

（動物繁殖研究所，1986年）

3．ウサギを用いた催奇形性試験

0.5%CMC水溶液に懸濁したホルクロルフェニユロンの0、50、150及び400mg/kg/dayを1群16匹のニュージーランドホワイト種ウサギに妊娠6日目から18日目までの13日間毎日1回強制経口投与した。ウサギは妊娠28日に帝王切開し、胎児毒性及び催奇形性の有無を検討した。

150mg/kg投与群以下では一般状態等も含め胎児毒性及び催奇形性の異常はみられなかった。400mg/kg投与群では投与期間中に体重及び摂餌量の減少がみられ、妊娠20及び21日に各1例の流産がみられたほか、死胚数の増加傾向と生存胎児数の減少傾向が認められた。胎児に対する催奇形性はみられなかった。以上の結果より、本試験における母動物及び胎児に対する無作用量は、それぞれ150及び400mg/kg/dayと推察された。

（ボゾリサーチセンター，1986年）

変異原性試験

1．復帰変異性試験（Ames test）

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌5株（*Salmonella typhimrium* TA98, TA100, TA1535, TA1537及びTA1538K株）及びトリプトファン要求性大腸菌（*Escherichia coli* WP2 hcr株）を用い、ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系（S-9Mix）の存在下及び非存在下でAmesらの方法により、復帰変異性を検討した。ホルクロルフェニユロンの用量はS-9Mixの存在下及び非存在下とも0、0.5、1、5、10、50、100、500及び1000 µg/plateとし溶媒にはDMSOを用いた。

S-9Mixの有無にかかわらず、ホルクロルフェニユロンの最高用量である1000 µg/plateに

においても復帰変異コロニー数の増加は認められず，ホルクロルフエニユロンには復帰変異誘発性はないと判断された。（残留農薬研究所，1981年）

2．細菌を用いたDNA修復試験（Rec-assay）

枯草菌（*Bacillus subtilis*）の組換修復機構保持株（H-17）と欠損株（M45）を用い，非活性化法によってDNA損傷の誘発性を検定した．ホルクロルフエニユロンの用量は0，6，20，60，200，600，2000及び6000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ とし溶媒にはDMSOを用いた．検体は陰性対照のカナマイシンと同様に両株に同程度の生育阻止帯を示した．

本検体にはDNA損傷の誘発性はないものと判断された。（残留農薬研究所，1981年）

3．チャイニーズハムスター肺線維芽細胞（CHL）を用いた *in vitro* 染色体異常試験

継代培養したチャイニーズハムスター肺線維芽細胞（CHL）を用い，ラットの肝臓から調製した薬物代謝酵素系（S-9Mix）の存在下及び非存在下でホルクロルフエニユロンによる染色体の異常を計測した．本試験濃度は直接法（非活性化法）で0.2mM，活性化法で0.5mMまでとし，各濃度100個の分裂中期像を観察した．直接法では染色体異常の誘発は認められなかった．代謝活性化法でS-9Mix存在下あるいは非存在下で，0.1，0.2，0.3，0.4及び0.5mMの各濃度で6時間処理後18時間経過した細胞を観察したところ，0.4mM以上の濃度で構造異常の出現頻度に有意な増加が認められたが，その頻度はS-9Mix存在下の方が低かった．

以上の結果より，検体には*in vitro* の染色体異常の誘発作用があるが，その活性は代謝されることによって減弱されるものと考えられた。（協和醗酵工業株式会社，1987年）

4．マウスを用いた経口投与による小核試験

ホルクロルフエニユロンの0.3%CMC懸濁液を250，500及び1000mg/kgの各用量で1群5匹のICR系SPF雄マウスに1回強制経口投与した．陽性対照としてマイトマイシンCの3mg/kg水溶液を腹腔内投与した．投与後30時間に屠殺し，大腿骨の骨髓塗抹標本を作成し，1個体につき1000個の多染性赤血球を観察し，小核の有無を検討した．投与群の小核出現頻度及び全赤血球に対する多染性赤血球の割合に異常は認められなかった．陽性対照群には明らかな変化がみられた．以上の結果より，本検体には*in vivo* 染色体異常誘発性はないものと推察された。（協和醗酵工業株式会社，1987年）

生体機能への影響に関する試験

1．中枢神経系に対する作用

ホルクロルフエニユロンの0.3%CMC懸濁液もしくは50%PEG-400溶液をddy系雄マウスまたはWistar系雄ラットに，それぞれ強制経口もしくは静脈内投与し，中枢神経系作用につき，観察した．検体投与による影響として自発運動の減少，麻酔増強作用，鎮痛作用及び電撃痙攣の抑制作用が認められ，中枢神経系に対しては抑制的に作用するものと判断された．行動観察では1000mg/kg投与群に自発運動の減少，歩行異常，眼瞼下垂を呈して死亡する例が認められ，これらの死因は中枢神経系の抑制に起因するものと考えられた．

2．呼吸，循環器系に対する作用

ホルクロルフエニユロンの50%PEG400溶液を供試し，呼吸循環器系作用につき観察した結果，10mg/kg, i.v. までは特に作用は認められなかった．摘出心房に対しては $10^{-5}\text{g}/\text{ml}$ で

は強心作用を示し、 10^{-4} g/mlでは強心作用の後に抑制作用を示した。

3．自立神経及び平滑筋に対する作用

ホルクロルフェニユロンの0.3%CMC懸濁液の主として 10^{-6} ～ 10^{-4} g/mlの用量で自立神経及び平滑筋に対する作用を観察したが、摘出回腸及び輸精管の 10^{-4} g/mlで抑制作用がみられたほかは特に作用は認められなかった。

4．消化器に対する作用

ホルクロルフェニユロンの0.3%CMC懸濁液の主として5，50及び500mg/kgの用量で消化器に対する作用を観察した結果、500mg/kgで炭末輸送能、胃液分泌で抑制作用がみられたほか、摘出胃条片において 10^{-5} g/mlから抑制がみられた。胃腸粘膜に対する刺激性は認められなかった。

5．骨格筋に対する作用

ホルクロルフェニユロンの50%PEG-400溶液を供試し、*in vivo* 及び *in vitro* で骨格筋に対する作用を検討した。*in vivo* の実験では一過性の亢進がみられ、*in vitro* の実験では 10^{-4} g/mlで抑制作用が認められた。

6．血液に対する作用

血液に対しては、凝固、溶血作用とも認められなかった。

(環境保健生物研究センター，1985年)

要 約

ホルクロルフェニユロンの安全性を評価するため、各種毒性試験を実施した。急性毒性は原体、製剤とも低く普通物相当であった。眼一次刺激性試験の結果、原体に刺激性がみられたが、洗眼により刺激は消失した。一方、製剤では副成分中の有機溶媒によるものと考えられる強い刺激性が認められたが、これも洗眼することで大幅に刺激を軽減することができた。皮膚刺激については製剤で軽度の刺激がみられた程度で、皮膚感作性は原体、製剤とも陰性であった。亜急性毒性、慢性毒性及び発がん性試験においてマウスの10,000ppmの商用量群で、腎臓毒性の持続による尿細管上皮の再生性増殖性病変が増加した。ラット及びイヌに腎臓障害は認められなかった。ラットによる繁殖試験及びラット、ウサギの催奇形性試験では特に異常はみられなかった。変異原性試験において染色体異常試験の代謝活性化法で0.4mM以上の濃度に染色体異常誘発性が認められたが、復帰変異、DNA損傷試験及び小核試験ではすべて陰性で変異原性の誘起性はないものと推察された。薬理試験においてホルクロルフェニユロンの大量投与により、中枢神経系及び消化器等に対して抑制的な作用がみられたが、きわめて大量投与による非特異的作用と考えられ、通常の使用では水剤による中毒は発現しないと判断された。

ホルクロルフェニユロンについては、平成7年8月29日の残留農薬安全性評価委員会において、ADIが0.093mg/kg.と設定された。

問合せ

協和醗酵工業株式会社バイオケミカル事業本部バイオケミカル営業部農薬学術担当
〒100-8185 東京都千代田区大手町1-6-1