

ミルディオマイシンの毒性試験の概要

武田薬品工業株式会社アクロ事業部
農薬開発部開発第三グループ
(平成6年5月2日受理)

薬剤の概要

ミルディオマイシンは武田薬品工業株式会社が開発した農業用抗生物質である。1973年ニューギニアの土壌から分離された放線菌 *Streptovorticillium rimofaciens* B-98891 の培養液がオオムギのうどん粉病防除に卓効を示したことから、培栽液中の有効成分が探索され、本品が単離された。本品は一般の真菌および細菌に対してほとんど抗菌性を示さないが、各種作物上でそのうどんこ病菌による病害に対して優れた防除効果を示す。

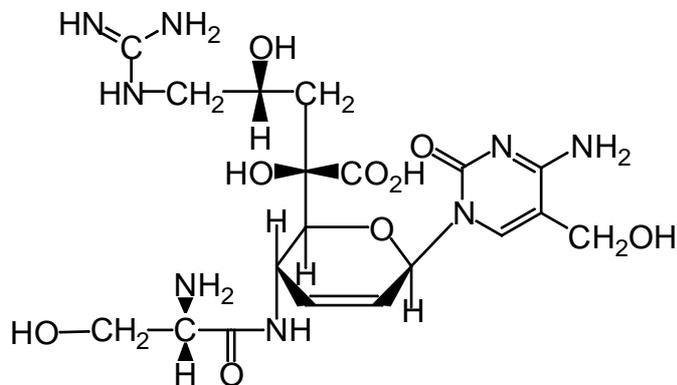
ミルディオマイシンはヒトあるいは動物の病原菌に対し交差耐性を示さず、また、安全性研究を通じヒトあるいは動物に対して安全性の高い農業用殺菌剤であることが確認された。本品の水溶剤は、バラ、マサキ、サルスベリ等の非食用作物のうどんこ病防除剤として用いられている。

ミルディオマイシンの化学構造および物理化学的性質を以下に示す。

一般名：ミルディオマイシン (mildiomycin)

化学名：(2*R*,4*R*)-2-[(2*R*,5*S*,6*S*)-2-(4-amino-1,2-dihydro-5-hydroxymethyl-2-oxopyrimidin-1-yl)-5,6-dihydro-5-*L*-serylamino-2*H*pyran-6-yl]-5-guanidino-2,4-dihydroxyvaleric acid

構造式：



分子式：C₁₉H₃₀N₈O₉

分子量：514.50

外 観：白色吸湿性粉末

溶解性：水に易溶，メタノール，エタノールにわずかに可溶，酢酸エチル，ジエチルエーテルに不溶

安定性：弱酸性～中性で比較的安定，強酸性および強アルカリ性では不安定。また，通常の散光下では安定。

急性毒性試験

ミルディオマイシンの原体および5.5%水溶剤のラットおよびマウスにおける経口，皮下，腹腔内，静脈内，経皮および吸入の各投与経路による急性毒性試験結果を表1に示した。

ミルディオマイシン原体では，ラット，マウスとも経口，皮下，腹腔内および静脈内投与により自発運動の低下，跨る状態，伏臥位姿勢等の中毒症状が認められ，またラットの経口投与を除く投与経路において血尿がみられたが，それ以外の中毒症状は認められなかった．経皮投与ではまったく異常はみられなかった．上記のいずれの投与でも死亡例および生存例にかかわらず剖検所見では各臓器とも異常は認められなかった．

ミルディオマイシン5.5%水溶剤では，ラットの経口および経皮投与により，中毒症状はまったく認められず，剖検所見でも何ら異常はみられなかった．

表1 急性毒性試験結果

動物種	投与経路	性	LD ₅₀	試験機関	報告書
ラット	経口	雄	4300	日本実験医学研究所	1979
		雌	4126		
	皮下	雄	463		
		雌	684		
	腹腔内	雄	679		
		雌	842		
	静注	雄	885		
		雌	700		
	経皮	雄	>5000		
		雌	>5000		
マウス	吸入	雄	0.88 mg/l ^{a)}	Safepharm Laboratories	1992
		雌	0.88 mg/l		
	経口	雄	5060		
		雌	5150		
	皮下	雄	1190		
		雌	1150		
	腹腔内	雄	1020	日本実験医学研究所	1979
		雌	1040		
	静注	雄	645		
		雌	599		
経皮	雄	>5000			
	雌	>5000			
ラット	経口	雄	>5000	Safepharm Laboratories	1989
		雌	>5000		
	経皮	雄	>2000		
		雌	>2000		
マウス	経口	雄	>5000	臨床医科学研究所	1992
		雌	>5000		

a) 急性吸入毒性 LC₅₀値 mg/l (4時間鼻部暴露) .

一次刺激性試験

1. 眼一次刺激性試験

ミルディオマイシン5.5%水溶剤0.1gを日本白色種ウサギの左眼に適用し、1、24、48および72時間後に角膜、虹彩および結膜の異常を観察した。

非洗眼群では、角膜の混濁、結膜の発赤および浮腫が認められ、結膜の浮腫は11日後に消失したが、角膜の混濁および結膜の発赤はその後も観察された。洗眼群でも角膜の混濁、結膜の発赤および浮腫がみられたが、その程度は非洗眼群に比して弱く、洗眼により症状が抑制された。（臨床医科学研究所、1992年）

2. 皮膚一次刺激性試験

ミルディオマイシン5.5%水溶剤0.5gを日本白色種ウサギ雄の左眼に4時間適用し、検体除去1、24、48および72時間後に皮膚の刺激性変化を観察した。

ミルディオマイシン5.5%水溶剤の適用により、紅斑、浮腫および痂皮の形成が認められた。これらの刺激性変化は11日後までにすべて消失する可逆的变化であった。

（臨床医科学研究所、1992年）

皮膚感作性試験

Dunkin-Hartley系モルモット雌20匹を用い、Buehler法により試験した。ミルディオマイシン5.5%水溶剤は蒸留水中75%（w/w）の濃度に懸濁して使用した。感作は剪毛したモルモット左腹側部の皮膚に検体0.5mlを塗布したリント布を6時間閉塞貼布した。初回の感作より7日および14日後に同じ方法で計3回暴露した。誘発は最終感作の14日後に剪毛した各動物の右腹側部に感作時と同様に検体を適用、6時間閉塞した。検体除去24および48時間後に皮膚の変化を観察した。陽性対照群は、DNCBの無水エタノール中0.5%（w/v）溶液0.5mlを適用して、ミルディオマイシン水溶剤と同様の手順で感作し、誘発はDNCBの0.2%（w/v）無水エタノール溶液をミルディオマイシン水溶剤の場合と同様に処理した。

ミルディオマイシン水溶剤処理群には24および48時間後のいずれも皮膚反応は認められず、感作性はないものと判断された。一方、DNCB処理群では、24時間後では動物の全例に、48時間後では66%に皮膚反応が陽性であった。（Safepharm Laboratories、1989年）

亜急性毒性試験

1. ラットを用いた3か月亜急性毒性試験

ミルディオマイシンの0、500、2500および5000ppm含有飼料を1群雌雄各12匹のF344/CRJ系ラットに3か月間自由摂取させた。

2500ppm以上の投与群では雌雄とも摂餌量の低下および体重増加の抑制がみられ、5000ppm投与群に飲水量の減少、外陰部周囲被毛および尾の汚染が認められたが、全観察期間を通し、死亡例はなかった。尿検査では2500ppm以上の投与群で淡黄～淡褐色尿が、5000ppm投与群の雌雄に尿比重の上昇が、同投与群の雌にpHの上昇が認められた。

血液学的検査の結果、500ppm投与群の雌雄の白血球数の増加、赤血球数の減少、同群の雄にHbの低下が、2500ppm投与群の雌雄および5000ppm投与群の雄にHtの低下が、それぞれ認められたが、これらは検体の直接的影響ではなく、摂餌量の低下による低栄養状態を反映した結果によるものと考えられた。

血液生化学的検査では、2500ppm投与群の雌雄に総蛋白量の減少、GPT、総コレステロール、コリンエステラーゼの減少、Ca、Na、Clの増減が散見されたが、これらのうち、総蛋白量および総コレステロールの低下は摂餌量の減少にともなう低栄養状態等に起因するもりと考えられた。

臓器重量では雌雄とも2500ppm以上の投与群に肝、脾、腎、心、肺、胸腺、甲状腺、精巢および脳などで減少が認められた。

病理解剖学的には検体投与群に脂肪組織の発育不全が、病理組織学的には肝実質細胞およびリンパ組織の萎縮が観察された。

臨床的および病理学的観察により得られた所見の多くは、高濃度の検体添加によるラットの飼料嗜好性への影響とみられる摂餌量減少に伴う低栄養状態に起因する二次的な現象と考えられた。

これらを指標とする最大無作用量は500ppm（雄42mg/kg/day，雌41mg/kg/day）と考えられた。（日本生物科学研究所，1979年）

2．マウスを用いた3か月亜急性毒性試験

ミルディオマイシンの0、30、100、1000および3000ppm含有飼料を1群雌雄各20匹のICR-CRJ系マウスに3か月間自由摂取させた。

3000ppm投与群では雄8例および雌2例が容態悪化のためそれぞれ死亡あるいは切迫殺された。雌雄とも体重の著しい増加抑制、摂餌量の減少、食餌効率の低下、血小板および脾重量の増加等が認められた。臨床的には投与初期より肛門周辺の腫脹を発現する動物が高頻度に観察された。病理組織学的には、雌雄とも肛門および直腸の粘膜壊死、前腎の腺胃移行部粘膜肥厚、腎尿細管萎縮、慢性膀胱炎、脾の髄外造血亢進像が観察された。

1000ppm投与群では雌雄とも体重の増加抑制および食餌効率の低下が認められ、組織学的には肛門粘膜の肥厚が観察された。

300ppm投与群では雄に軽度の体重増加抑制および食餌効率の低下がみられ、組織学的には肛門粘膜の角化亢進像が高頻度に観察されたが、雌ではとくに異常は認められなかった。

100ppm投与群では雄に軽度の体重増加抑制および食餌効率の低下が認められたが、雌ではとくに異常はなかった。

30ppm投与群では雌雄とも本薬物投与に関連づけられる変化は認められなかった。

以上より、ミルディオマイシンのマウスにおける最大無作用量は、雄で30ppm（3.24mg/kg/day）、雌で300ppm（40.6mg/kg/day）と判定された。

（残留農薬研究所，1981年）

催奇形性試験

1．ラットを用いた催奇形性試験

ミルディオマイシンの水懸濁液を0、70、125および250mg/kgの用量で1群各25匹のCrl:CD®BR系雌ラットに妊娠6日から15日まで1日1回経口投与した。妊娠20日に全動物を帝王切開のため屠殺し、胎仔の体重、性別、外表、骨格および軟組織の奇形と発育変異について検査した。

125および250mg/kg投与群では肛門周囲または泌尿生殖器周囲に褐色あるいは黄色の付

着物，ラ音，眼および鼻周囲の褐色物質，排便減少および軟便等の毒性症状が散見された．投与全期間では体重増加抑制および飼料摂取量の減少が認められたが，投与期間終了後ではこれらが増加した．

70mg/kg投与群では投与開始 3 日間にわずかな体重増加および飼料摂取量の抑制がみられたが，その後の投与期間でわずかな増加が認められた．

いずれの投与群にも子宮内発育および生存率に影響はなく，胎仔の奇形は対照群に下顎欠如と水頭症が各 1 例，125mg/kg投与群に曲肋骨が 1 腹中の 3 例に認められた．

胎仔の発育変異は250mg/kg投与群に 2 例みられたが，投与との関連性は対照群にみられる各種の胎仔の発育変異の発現幅が広いため明らかではなかった．

以上の結果から，ミルディオマイシンの催奇形性は認められず，親動物に対する毒性の最小作用量は70mg/kg/day，発育毒性に関する無有害影響量（NOAEL）は125mg/kg/dayと考えられた．
（WIL Research Laboratories，1989年）

2．ウサギを用いた催奇形性試験

ミルディオマイシンの水溶液を0，1，3および6mg/kgの用量で 1 群各16匹の日本白色種雌ウサギに妊娠 6 日から18日まで 1 日 1 回経口投与した．

1 および 3 mg/kg投与群でそれぞれ妊娠20日目および27日目に各 1 例の流産がみられたが，6 mg/kg投与群では認められず，検体投与による影響とは考えられなかった．対照群および全投与群の一般状態に変化はなかった．

3 および 6 mg/kg投与群で投与開始後にわずかな体重増加抑制がみられたが，有意差はなかった．3 mg/kg投与群では妊娠 8 日目に，6 mg/kg投与群では妊娠 7 ~ 14日の間に飼料摂取量の有意な減少が認められた．剖検では 3 mg/kg投与群の臓器に変化が認められたが，1 および 6 mg/kg投与群では認められず，検体投与による影響とは考えられなかった．6 mg/kg投与群の下垂体の体重比重量に有意な増加がみられたが，背景データの範囲内であった．

胎仔では着床率，胎仔死亡率，生存胎行数，性比，体重および胎盤重量に異常は認められなかった．検体投与群に認められた内臓異常，骨格異常については用量依存性が認められず，背景データの範囲内にあることから自然発生的なものであり，検体投与による影響とは考えられなかった．以上の結果から，ミルディオマイシンの母動物に対する一般毒性的な無影響量は 1 mg/kg/dayであり，母動物の妊娠維持に対する無影響量は 6 mg/kg/dayであった．また，胎仔に対しては胚・仔致死作用，催奇形性作用および発育抑制はなく，無影響量は 6 mg/kg/dayであった．
（イナ リサーチ，1992年）

変異原性試験

1．細菌を用いた復帰変異試験（Ames' test）

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌（*Salmonella typhimurium*）TA100，TA1535，TA98，TA1537およびTA1538株およびトリプトファン要求性大腸菌（*Escherichia coli* WP2hcr）を用い，ラットの肝から調製した薬物代謝系酵素（S-9 Mix）の存在下および非存在下で Amesらの方法によりDNA復帰変異誘発性を検討した．ミルディオマイシンの用量は5000 μg/plateを最高濃度に，1000，500，100，50，10および5 μg/plateとした．

ミルディオマイシンは代謝活性化の有無にかかわらず，いずれの場合も復帰コロニー数

の増加は認められなかった。一方、陽性対照として用いたAF2， γ -propiolactone，9-AAおよび2-NFはS-9 Mixの存在下または非存在下で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、ミルディオマイシンの復帰変異誘発性は陰性であると判断された。

(残留農薬研究所，1980年)

2．細菌を用いたDNA修復試験 (Rec-assay)

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組換え修復機構保持株 (H-17) と欠損株 (M-45) を用い、賀田らのrec-assay法でDNA損傷の誘発性を検討した。ミルディオマイシンの用量は2000 μ g/diskを最高濃度に1000，500，200，100および20 μ g/diskとした。

ミルディオマイシンは代謝活性化の有無にかかわらず両株にほとんど生育阻止を認めなかった。一方、陽性対照として用いたmitomycin Cでは両株間に明らかな生育阻止帯の差がみられ、陰性対照のkanamycinでは両様に同程度の生育阻止帯が認められた。

以上の結果から、ミルディオマイシンのDNA損傷誘発性は陰性であると判断された。

(残留農薬研究所，1980年)

3．チャイニーズハムスター肺細胞を用いた*in vitro* 細胞染色体異常試験

チャイニーズハムスターの肺CHL細胞を用い、代謝活性化系 (S-9 Mix) の存在下および非存在下でミルディオマイシンの染色体異常誘発性を検討した。

ミルディオマイシンの用量は予備試験の増殖抑制試験結果から、直接法24時間処理では377，189および94.3 μ g/ml，48時間処理では47，2，23.6および11.88 μ g/ml，代謝活性化法では566，283および141 μ g/mlとした。

直接法では24時間処理の最高濃度 (377 μ g/ml) のみに陽性を示した。代謝活性化法では中間用量 (283 μ g/ml) で陽性，最高用量 (566 μ g/ml) で疑陽性を示した。しかし、倍数体の出現率の増加はいずれの場合も認められなかった。一方、陽性対照のmitomycin CはS-9 Mixの非存在下で、cyclophosphamideはS-9 Mixの存在下で顕著な陽性を示した。

(化学品検査協会，1989年)

薬理試験

1．一般症状観察

ミルディオマイシンを0，300，1000および3000mg/kgの用量で1群9匹のSlc:ICR系雄マウスに経口投与し、Irwinの多次元観察法に準じて一般症状を観察した。

3000mg/kg投与群では投与6時間後より下痢，体温の下降がみられ，24時間後に受動性の低下，グルーミング回数の減少が認められた後，全例が48時間後までに死亡した。

1000mg/kg投与群では投与24時間後に受動性の低下およびグルーミング回数の減少がみられ，48時間後には視認性および反応性の低下，弛緩した体姿勢，異常歩行，とんぼがえり試験における着地失敗，握力の低下，体温の下降が観察された後，9例中3例が死亡した。

300mg/kg投与群マウスには検体投与による影響は認められなかった。

2．中枢神経系に対する作用

ミルディオマイシンを0，300，1000および3000mg/kgの用量で1群12匹のSlc:ICR系雄マウスに経口投与し，Rota-rod法により運動協調性に及ぼす影響を検討した。

3000mg/kg投与群では投与24時間後に1分間以内の落下動物数が有意に増加した。

1000mg/kg以下の投与群では対照群との間に差がみとめられなかった。

陽性対照としてdiazepamを10mg/kg経口投与したマウスでは、投与30分後より300分後まで落下動物数の明らかな増加が認められた。

3．呼吸・循環器系に対する作用

生理食塩水に溶解したミルディオマイシンを0, 30, 100および200mg/kgの用量で1群4匹の日本白色種雄ウサギに30分間隔で低用量から順に動脈内に投与し、各用量投与前、投与後は適当な間隔で120分後まで、呼吸、心電図、血圧および心拍数への影響を調べた。

30mg/kg投与では投与5分後に心拍数は対照動物に比し有意な増加がみられたが、投与前の値と差はなかった。100mg/kg投与では投与直後より血圧が上昇し、5～10分後に心収縮期、拡張期血圧および平均血圧ともに上昇傾向がみられたが、30分後にはもとのレベルに回復した。

200mg/kg投与では投与直後に血圧の一時的な下降がみられたが、その後拡張期血圧、収縮期血圧および平均血圧が上昇し、10分後にピークを示した。しかし、60および120分後には対照群に比し有意に下降した。心拍数は投与5分後より120分後まで減少した。心電図も投与5～15分後に波形の変化がみられ、1例の死亡が認められた。上記以外に検体投与による影響は認められなかった。

4．自律神経に対する作用

Slc:Hartley系モルモットより1匹当たり回腸片の2または4標本を摘出し、タイロード液槽中に懸垂し、ミルディオマイシンを $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-3}$ g/mlの用量で加えた後、 $3 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-4}$ molのアセチルコリンまたはヒスタミンを累積的に作用させることにより惹起される回腸の収縮に対する検体の影響および検体のみの作用を検討した。

検体の $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ g/mlで摘出回腸への直接作用は認められなかったが、 1×10^{-3} g/mlでは回腸の持続的な収縮がみられた。

アセチルコリンによる収縮反応に対する影響はみられなかったが、ヒスチジンの $3 \times 10^{-8} \sim 3 \times 10^{-6}$ molによる収縮反応に対し、検体の 1×10^{-6} g/ml以上の濃度で収縮増大が認められた。

5．消化器系に対する作用

ミルディオマイシンを0, 300, 1000および3000mg/kgの用量で1群10匹のSlc:ICR系雄マウスに経口投与し、180分後に10%アラビアゴム液に懸濁させた50%硫酸バリウム液0.2mlを経口投与した。20分後にマウスを屠殺して腸管を摘出し、胃幽門部から硫酸バリウムの移動率を測定し、腸管輸送能に及ぼす影響を調べた。

1000および3000mg/kg投与群の回腸に充血がみられたが、検体投与群マウスの腸管輸送能に変化は認められなかった。

6．血液に対する作用

ミルディオマイシンを0, 300, 1000および3000mg/kgの用量で1群7匹のSlc:ICR系雄マウスに経口投与し、180分後にエーテル麻酔下で腹大動脈より採血し、血漿についてprothrombin時間および活性部分thromboplastin時間を測定し、血漿凝固に及ぼす影響を調べた。

いずれの検体投与群においても活性部分thromboplastin時間には溶媒対照群との差はみられなかった。1000および3000mg/kg投与群のprothmmbin時間に有意な延長が認められた。

(臨床医科学研究所, 1992年)

要 約

ミルディオマイシンの安全性評価のため各種の毒性試験を実施した。急性経口毒性（LD₅₀値）はラット雄で4300，雌で4120，マウス雄で5060，雌で5150mg/kgであった。眼一次刺激性および皮膚一次刺激性が認められたが，皮膚感作性は認められなかった。

ラットを用いた亜急性毒性試験では2500ppm以上の用量群に体重増加抑制，飼料摂取量の減少，淡黄～淡褐色尿，臓器重量の減少，脂肪組織の発育不全，肝実質細胞およびリンパ組織の萎縮が認められた。最大無作用量は雄で42mg/kg/day，雌で41mg/kg/dayと判断された。マウスを用いた亜急性毒性試験では雄の100ppm以上，雌の1000ppm以上の用量群に，体重増加抑制および食餌効率の低下が，高用量群（3000ppm）に血小板および脾重量の増加，肛門周辺の腫脹，肛門および直腸の粘膜壊死，前腎の腺胃移行部粘膜肥厚，腎尿細管萎縮，慢性膀胱炎，脾の髓外造血亢進像が認められた。最大無作用量は雄で3.24mg/kg/day，雌で40.6mg/kg/dayと判断された。ラットおよびウサギを用いた催奇形性試験から，ミルディオマイシンによる催奇形性は認められなかった。

細菌を用いたDNA修復試験および復帰変異試験においてミルディオマイシンは陰性であったが，チャイニーズハムスターの培養細胞を用いた試験では中用量において軽度な陽性を示した。

薬理試験では，ミルディオマイシンの大量投与により運動機能の低下，中枢神経系に対する抑制作用，呼吸・循環器系および血液凝固に対する影響が認められた。

ミルディオマイシンは昭和56年8月に非食用作物用の殺菌剤として登録された。

問合せ

武田薬品工業株式会社アグロ事業部農薬開発部開発第三グループ

〒103 東京都中央区日本橋 2-13-10