

ピラフルフェンエチルの毒性試験の概要

日本農薬株式会社 開発本部 登録薬事部

薬剤の概要

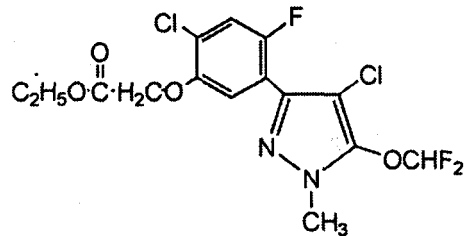
ピラフルフェンエチルは1988年に日本農薬株式会社が発明したトリ置換フェニルピラゾール系の新規除草剤である。1993年より本剤の2%フロアブル（エコパート®フロアブル）を麦類対象の除草剤として、また1995年からはグリホサートトリメシウム塩との混合剤（サンダーボルト®）を果樹園、水田畦畔および非農耕地対象の除草剤として（財）日本植物調節剤研究協会への委託試験に供試した。その結果、エコパート®フロアブルは麦類に対して実用上問題となる薬害を発生させることなく一年生広葉雑草に優れた除草効果を示すことが認められた。また、サンダーボルト®はグリホサートトリメシウム塩単剤に比べ速効的かつ殺草スペクトルが拡大し、タンポポ、コヒルガオ、スベリヒユ、ハマスゲ等の難防除雑草に対して卓効を示すことが判明した。両剤は1997年4月に農薬登録申請され、1999年4月に登録となった。1999年6月にはサンダーボルト®を、8月にはエコパート®フロアブルを上市した。また、0.4%乳剤（デシカン®）を2001年8月登録取得し、2001年10月上市した。

本剤の化学構造および物理的・化学的性状を以下に示す。

一般名：ピラフルフェンエチル pyraflufen-ethyl
(pyraflufen：ISO)

化学名：ethyl 2-chloro-5-(4-chloro-5-difluoro-methoxy-1-methylpyrazol-3-yl)-4-fluorophenoxyacetate (IUPAC)

構造式：



分子式：C₁₅H₁₃Cl₂F₃N₂O₄

分子量：413.18

性状：白色結晶性粉末

密度：1.565 (g/cm³)

融点：126.4~127.2℃

蒸気圧：1.6×10⁻⁸Pa

溶解度：水 0.082mg/l (20℃)、ヘキサン 0.3g/l (25℃)、キシレン 26g/l (25℃)、メタノール 7.39g/l (20℃)、アセトニトリル 72g/l (25℃)、酢酸エチル 155g/l (25℃)、アセトン 261g/l (25℃)、1,2-ジクロロエタン 100~111g/l (20℃)

n-オクタノール/水分配係数：log P_{ow}: 3.49 (HPLC法)

急性毒性試験

表1に示すように本剤の急性毒性は原体、製剤（2%フロアブル）共に低く、普通物に分類された。

表1 ピラフルフェンエチルの急性毒性試験結果概要

	動物種	投与方法	LD ₅₀ 値 (mg/kg)	試験機関 (報告年)
原体	ラット	経口	♂♀：>5000	日本農薬(株) (1995年)
	マウス	経口	♂♀：>5000	日本農薬(株) (1995年)
	ラット	経皮	♂♀：>2000	日本農薬(株) (1995年)
	ラット	吸入	♂♀：>5.03 (mg/L)	Pharmaco LSR LTD (1995年)
製剤 (2%フロアブル)	ラット	経口	♂♀：>5000	日本農薬(株) (1996年)
	マウス	経口	♂♀：>5000	日本農薬(株) (1996年)
	ラット	経皮	♂♀：>2000	日本農薬(株) (1996年)

刺激性・感作性試験

1. 眼一次刺激性試験

日本白色種雄ウサギを用いて常法に従い原体および製剤（2%フロアブル）の眼一次刺激性を検討した。非洗眼群では6匹を、洗眼群では3匹を使用した。用量は、原体については0.1g/眼とし、製剤については0.1ml/眼とした。

その結果、原体については虹彩の軽度の充血および結膜の発赤が投与1日後まで、分泌物が投与1時間後まで認められたが、これらの反応はその後消失した。また、洗眼効果も認められた。以上の結果から、原体のウサギの眼に対する一次刺激性は「軽度」と判定された。

製剤については極弱い結膜の発赤が投与1時間後に認められたが1日後には消失し、「刺激性なし」と判定された。

（原体：日本農薬（株）総合研究所、1995年）

（製剤：日本農薬（株）総合研究所、1996年）

2. 皮膚一次刺激性試験

日本白色種雄ウサギ6匹を用い、常法に従い原体および製剤（2%フロアブル）の皮膚一次刺激性を検討した。その結果、原体については正常皮膚、擦過皮膚共に反応は全く認められず、ウサギの皮膚に対して「刺激性なし」と判定された。

製剤については擦過皮膚で投与2日後まで極弱い紅斑および痂皮が認められたが3日後には消失し、「刺激性なし」と判定された。

（原体：日本農薬（株）総合研究所、1995年）

（製剤：日本農薬（株）総合研究所、1996年）

3. 皮膚感作性試験

ピラフルフェンエチルの原体および製剤（2%フロアブル）についてHartley系モルモット1群雌雄各10匹を用い、Maximization法による皮膚感作性試験を実施した。陽性対照の2,4-ジニトロクロロベンゼンについては雌雄各5匹で実施した。

その結果、原体、製剤いずれの検体処理でも誘発後の皮膚反応は全く認められず、モルモット皮膚に対する感作性はないと判断された。

（原体：Huntingdon Life Science Ltd., 1995年）

（製剤：Huntingdon Life Science Ltd., 1996年）

亜急性毒性試験

1. ラットを用いた13週間反復経口投与毒性試験

ピラフルフェンエチルの原体を0、200、1000、5000および15,000ppmの濃度で飼料に混入し、1群雌雄各10匹のSprague-Dawley系ラットに13週間摂取させた。

13週間投与終了後の死亡率は15,000ppm投与群の雄で10%であり、その他の群ではいずれも0%であった。15,000ppm投与群の雌雄では投与1週後に体重の増加抑制が認められた。これらの所見は他の群では認められず、検体投与の影響と考えられた。

眼科学的検査結果においては、いずれの群でも検体投与の影響は認められなかった。血液学的検査において、15,000ppm投与群の雌雄で、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積および平均赤血球色素量の減少が認められた。

血液生化学的検査においては、15,000ppm投与群の雌雄で総タンパクおよびアルブミンの減少が認められ、同群雄でGOT、GPT、アルカリホスファターゼ、総コレステロールおよび β -グロブリンの増加ならびに α -1-グロブリンおよびグルコースの減少が認められた。5000および15,000ppm投与群雌でリンの増加が、また15,000ppm投与群の雌でカリウムの減少が認められた。尿検査では15,000ppm投与群の雌雄で尿量の増加および比重の低下が認められた。

臓器重量の変化については、15,000ppm投与群における雄の腎および脾体重比が、また同群雌の脾重量が増加した。

病理組織学的検査においては、15,000ppm投与群の雄で肝細胞の軽度肥大が認められた。電子顕微鏡検査においては、15,000ppm投与群の雌雄で肝細胞および星細胞のリソゾームに電子密度の高い綿状の物質が、また雄に滑面小胞体の増生およびミトコンドリアに電子密度の低い小胞が認められた。

以上の結果から、本試験でのピラフルフェンエチル原体の無毒性量は、雌雄とも5000ppm（雄455.5 mg/kg/日、雌499.0 mg/kg/日）と判断された。

（Pharmaco Life Science Research Ltd., 1994年）

2. イヌを用いた13週間反復経口投与毒性試験

ピラフルフェンエチルの原体をゼラチンカプセルに充填し、0、40、200および1000mg/kgの用量で1群雌雄各4匹のビーグル犬に13週間経口投与した。

一般状態、体重変化、摂餌量、獣医学的検査、眼科

学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量および病理組織学的検査において検体投与の影響は認められなかった。

従って、以上の結果から、本試験におけるピラフルフェンエチル原体の無毒性量は雌雄とも1000 mg/kg/日と判断された。

(Huntingdon Life Science Ltd., 1995年)

慢性毒性試験

1. イヌを用いた1年間反復経口投与毒性試験

ピラフルフェンエチルの原体をゼラチンカプセルに充填し、0、40、200および1000mg/kg/日の用量で、1群雌雄各4匹のビーグル犬に52週間経口投与した。

前項のイヌを用いた13週間亜急性毒性試験と同様、検体投与の影響は認められず、本試験でのピラフルフェンエチルの無影響量は共に雌雄で1000 mg/kg/日と判断された。

(Huntingdon Life Science Ltd., 1996年)

2. ラットを用いた2年間経口毒性・発がん性試験

ピラフルフェンエチルの原体を0、80、400、2000および10,000ppmの濃度で飼料に混入し、1群雌雄各70匹のSD系ラットに104週間摂取させた。52週目に各群20匹を中間屠殺すると共に14、27、52、72および103週目に採血し、血液学および血液生化学的検査を実施した。

一般状態では10,000ppm投与群の雌において、生殖器周辺部の着染が認められた。死亡率に検体投与の影響は認められなかった。10,000ppm投与群の雄で、摂餌量および食餌効率の低下を伴う体重増加抑制が認められた。

血液学的検査においては、10,000ppm投与群の雄でヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球容積および平均赤血球色素量が全検査時期で減少した。同群雌では、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値および平均赤血球容積が投与開始初期に減少した。

血液生化学的検査においては、10,000ppm投与群の雄でGOT、GPTおよびOCTが、雌ではGOTおよびOCTが投与開始52週目まで増加した。更に雄では総タンパクおよび α -1-グロブリンが27週目まで減少し、14週にアルブミンの減少および β -グロブリンの増加が認められた。雌では β -グロブリンの増加が投与後27週まで、A/G比の減少が27および52週に認められた。グルコースが雄で14、52および79週に、雌では79

週に減少し、尿素が雄で79および102週に増加した。その他の群では検体投与の影響は認められなかった。

尿検査においては10,000ppm投与群の雌雄で尿量の増加と比重の減少がほぼすべての検査時期に認められた。同群の雄では尿タンパクが常に減少し、雌でも78および100週に同様の変化が認められた。

臓器重量は、10,000ppm投与群の雄で腎の対体重比、精巢の絶対重量および対体重比が増加した。2000ppm投与群の雄でも、腎の絶対重量および対体重比が増加した。

病理組織学的検査において、10,000ppm投与群の雌雄で肝では胆管過形成、腎では移行性細胞過形成、乳頭壊死・脱落および急性乳頭炎が増加し、同群雌で腎の皮質尿管の好塩基性化、集合管拡張・過形成および皮質尿管拡張の頻度が増加した。2000ppm投与群では、被験物質に関連した変化は認められなかった。腫瘍性病変はいずれの投与量においても認められなかった。

以上の結果から、ピラフルフェンエチルの本試験における無毒性量は400ppm（雄：17.2 mg/kg/日、雌：21.8mg/kg/日）と考えられた。

(Huntingdon Life Science Ltd., 1996年)

発がん性試験

1-1. マウスを用いた発がん性試験

ピラフルフェンエチルの原体を0、200、1000および5000ppmの濃度で飼料に混入し、1群雌雄各60匹のICR系マウスに78週間摂取させた。投与開始13週目に各群雌雄各10匹を中間屠殺した。

一般所見、死亡率、体重変化、摂餌量および摂餌効率にはいずれの群でも異常は認められなかった。

血液学的検査において、5000ppm投与群の雄で、赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値が減少した。また同群雌雄で血小板数の増加が、雄で白血球数の減少が認められた。

臓器重量では、5000ppm投与群の雄で78週に肝の絶対重量が、13および78週に肝の対体重比が増加し、雌では13および78週目に肝の絶対重量が、13週に肝の対体重比が増加した。1000ppm投与群の雄において78週に肝の絶対重量が増加した。

肉眼的病理検査では、5000ppm投与群の雌雄で肝の退色、小葉明瞭化、表面粗造、斑ないし腫瘍の発生頻度が増加した。病理組織学的検査においては、5000

ppm投与群の雌雄で小葉中心性肝細胞肥大、肝細胞小増殖巣、肝細胞空胞化、星細胞褐色色素沈着増加および小肉芽腫の発生頻度が増加した。更に、雄では限局性肝細胞壊死および間質線維化の発生頻度が増加し、小葉中心性肝細胞脂肪化の発生頻度が減少した。雌では肝細胞単細胞壊死が増加し、アミロイド沈着が減少した。また、5000ppm群雄では副腎の皮髄境界部褐色色素沈着の頻度が増加した。1000ppm投与群では雌雄の肝で小葉中心性肝細胞肥大が増加した。更に雄では、肝細胞小増殖巣、星細胞褐色色素沈着増加および肝細胞空胞化が、雌では肝細胞単細胞壊死が増加した。腫瘍性病変については、5000ppm投与群の雌雄で肝細胞腺腫の発生頻度が有意に増加した。

以上の結果より、ピラフルフェンエチルの本試験における無毒性量は雌雄共に200ppm（雄：20.99 mg/kg/日、雌：19.58mg/kg/日）と判断された。

（財）残留農薬研究所，1996年）

1-2. マウスにおける肝障害性の検討

ピラフルフェンエチル原体を0、3000、5000及び10,000ppmの濃度で飼料に混入し、4週間にわたってICR系雄性マウス（1群20匹）に摂食させた。その後、2週間基礎飼料を摂食させる回復期間を全群に設けた。

10,000ppm投与群では投与5日後より死亡が見られ、切迫屠殺も含めて10日後には全例死亡した。肝重量(体重比)は3000ppm以上の投与群で1週間後から増加が見られ、回復期間後においても程度は軽くなるが有意な増加が認められた。5000ppm投与群ではGOT、GPTの増加が第2週より、3000ppm投与群ではGOTの増加が第4週、GPTの増加が第2週よりみられた。回復期間後にはGOT、GPTの変化は認められなかった。

病理組織学的には肝細胞において、壊死像、細胞分裂像、肥大（細胞質のスリガラス状変化を伴う）、細胞質の透明化、好酸性封入体、緑褐色色素沈着、赤血球貧食等が投与1週間後から認められた。回復期間後、緑褐色色素沈着の回復性は認められなかったが、その他の所見は消失するか軽減した。

以上の結果より、ピラフルフェンエチルはマウス肝に壊死を惹起し、それに対する代償としての再生（肝細胞分裂）を誘導していることが示唆された。

（日本農薬(株)総合研究所，1998年）

1-3. 肝におけるProliferating cell nuclear antigen(PCNA)免疫染色試験

マウスを用いた発がん性試験で得られた肝組織標本

について、PCNA染色を施し、肝細胞の増殖に及ぼす検体投与の影響を検索した。

5000ppm群雌雄の投与後13週及び78週、ならびに1000ppm群雌雄の13週及び同群雄の78週でPCNAの平均標識率が有意に、また、1000ppm群雌の78週で統計学的には有意ではないが増加した。13週から78週へと投与が長期化するにつれて標識率は増加傾向を示した。200ppm群雌雄では対照群と差はなかった。

（財）残留農薬研究所，1997年）

繁殖毒性および催奇形性試験

1. ラットを用いた繁殖毒性試験

ピラフルフェンエチルの原体を0、100、1000および10,000ppmの濃度で飼料に混入し、1群雌雄各24匹のSprague-Dawley系ラットにP世代からF1世代の2世代に渡り摂取させた。各世代で1回の交配を行い、新生児の一部を次世代の親動物として用い、繁殖に及ぼす影響を調べた。

その結果、10,000ppm投与群でいずれの世代においても親動物の体重の有意な減少、肝と腎の暗調化および重量増加が認められた。

病理組織学的な変化については、10,000ppm投与群の各世代雌雄親動物の肝で単細胞壊死、炎症性細胞浸潤および星細胞褐色色素沈着増加が、更にP雄親動物に胆管増生、F1雄親動物では胆管増生および小葉中心性肝細胞肥大の発現頻度が有意に高く、腎ではPおよびF1雌雄親動物に近位尿細管上皮褐色色素沈着増加が、PおよびF1雌親動物に近位尿細管好酸性小体消失も有意に高い頻度で認められた。

児動物では、10,000ppm投与群において体重減少が認められた。

繁殖能に対しては何ら影響は認められなかった。

従って、無影響量は親動物および児動物に対して1000 ppm（雄：70.8～82.3 mg/kg/日、雌：80.1～91.2 mg/kg/日）、繁殖については10,000ppm（雄：721～844 mg/kg/日、雌：813～901 mg/kg/日）と判断された。

（財）残留農薬研究所，1996年）

2. ラットを用いた催奇形性試験

ピラフルフェンエチルの原体を0、100、300および1000mg/kg/日の用量で、1群各22匹の妊娠Sprague-Dawley系ラットに、妊娠6日目から15日までの10日間、1日1回強制経口投与した。

親動物においては、いずれの用量においても検体投与に関連した所見は認められなかった。

胎児においても検体投与の影響は認められなかった。

以上の結果より、本剤を妊娠ラットに投与した時の親動物および胎児における無毒性量は1000 mg/kg/日であり、催奇形性はないと判断された。

(Huntingdon Life Science Ltd., 1995年)

3. ウサギを用いた催奇形性試験

ピラフルフェンエチルの原体を0、20、60および150 mg/kg/日の用量で1群15匹の妊娠ニュージールランド白色種ウサギに妊娠6日目から19日までの14日間、1日1回強制経口投与した。

親動物においては150mg/kg/日投与群で投与に関連した死亡が5匹認められ、3匹が流産した。死亡動物では摂餌量および排糞量の減少、ならびに消化管に肉眼的異常が認められた。生存動物ではわずかに体重増加抑制が認められたが、有意ではなかった。妊娠子宮重量は同腹児数が少ないことを反映して低値であった。着床所見では黄体数等が有意ではないが、低い傾向であった。60mg/kg/日投与群でも投与に関連した死亡が3匹認められ、死亡動物では150mg/kg/日と同様の所見が認められた。20mg/kg/日投与群では、投与に関連した影響は認められなかった。

胎児においては150mg/kg/日投与群において切歯無萌出の頻度が明らかに増加したが、この群の動物数が少なかったことが理由と考えられた。その他、検体投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

以上の結果より、本剤を妊娠ウサギに投与した時の無毒性量は、親動物で20 mg/kg/日、胎児動物では150 mg/kg/日であり、催奇形性はないと判断された。

(Huntingdon Life Science Ltd., 1996年)

変異原性試験

1. 復帰変異原性試験 (Ames test)

ヒスチジン要求性のサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538) およびトリプトファン要求性の大腸菌 (*Escherichia coli* WP2 uvrA) を用い、ラット肝から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下でAmesらの方法を用いて変異原性を検定した。ピラフルフェンエチルの濃度は156.3~5000 μ g/プレート の範囲とし、DMSOに溶解して添加した。

ピラフルフェンエチルはS9 mix存在の有無にかか

わらず、いずれの菌株のいずれの濃度においても復帰変異コロニー数を増加させず、復帰変異原性はないと判断された。

(Pharmaco Life Science Research Ltd., 1994年)

2. 培養細胞を用いた突然変異試験

L5178Y TK+/-マウスリンパ腫細胞を用いて、ラット肝から調製した薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在および非存在下で変異原性を検定した。ピラフルフェンエチルの濃度は、10~20 μ g/mlの範囲とし、DMSOに溶解して添加した。

ピラフルフェンエチルはS9 mix非存在下では、最高濃度においても突然変異細胞数を増加させなかった。S9 mix存在下では、1回目の試験においては突然変異細胞数を増加させなかったが、2回目の試験においては濃度に依存して増加させた。

(Pharmaco Life Science Research Ltd., 1994年)

本試験結果については、同様の試験条件で再検討したところ、S9 mixの有無にかかわらず突然変異細胞数を増加させなかった。

((財)食品薬品安全センター, 1998年)

3. 細菌を用いたDNA修復試験 (Rec-assay)

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の組替え修復機能保持株 (H-17) および欠損株 (M-45) を用いて、ラット肝から調製したS9 mixの存在下および非存在下でDNA損害誘発性の有無を検討した。ピラフルフェンエチルの濃度は343.8~5500 μ g/ディスクとした。

ピラフルフェンエチルはS9 mix存在の有無にかかわらず、最高濃度においても両菌株に生育阻止帯を示さず、DNA損傷誘発性を示さなかった。

(日本農薬(株)総合研究所, 1994年)

4. *In vivo*不定期DNA合成試験

ピラフルフェンエチルを600あるいは2000mg/kgの用量でラットに単回強制経口投与し、投与後2あるいは14時間後にコラゲナーゼ環流法にて肝細胞を単離し、³H-チミジンを含む培養液で培養後不定期DNA合成を検討した。

ピラフルフェンエチルはいずれの投与量のいずれの時間においても、不定期DNA合成促進を示さなかった。

(Huntingdon Life Science Ltd., 1998年)

5. *In vitro*染色体異常試験

培養ヒトリンパ球を用いて、ラット肝から調製したS9 mixの存在下および非存在下でピラフルフェンエチルの染色体異常誘発性を検定した。ピラフルフェン

エチルの濃度は650~2600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲とし、DMSOを用いて溶解した。

ピラフルフェンエチルはS9 mix存在の有無にかかわらず、いずれの濃度においても染色体異常を有する細胞数を増加させなかった。

(Pharmaco Life Science Research Ltd., 1994年)

6. 小核試験

ピラフルフェンエチルをマウスに1250~5000mg/kgの用量で単回あるいは2500~5000mg/kgの用量で2回強制経口投与し、24、48あるいは72時間後に大腿骨の骨髓塗沫標本を作製し、多染性赤血球中の小核発現を観察した。

ピラフルフェンエチルは、いずれの用量のいずれの時間においても生物学的に有意な小核を有する多染性赤血球数の増加を誘発しなかった。

(Pharmaco Life Science Research Ltd., 1994年)

生体機能に及ぼす影響

ICRマウス（腹腔内投与）および日本白色種ウサギ（経口投与）を用い、生体機能に及ぼす影響を検討した結果、1250mg/kg以上の用量で中枢神経系に及ぼす影響（一般状態）および呼吸・循環器への影響が認められた。無影響量はマウス、ウサギとも313mg/kgと判断された。

((財)残留農薬研究所, 1996年)

要約

ピラフルフェンエチルの安全性を評価するため、各種毒性試験を実施した。本剤の急性毒性は、原体、製剤とも低く、普通物相当であった。

眼一次刺激性試験において、ウサギ眼に対して原体は軽度刺激性を示したが、回復は早かった。製剤では刺激性は認められなかった。皮膚一次刺激性試験において、原体、製剤ともウサギ皮膚に対し刺激性は示さなかった。モルモット皮膚感作性試験において、原体、製剤とも陰性であった。

亜急性毒性試験あるいは慢性毒性試験においては、イヌを用いた場合投与限度量の1000mg/kg/日でも何ら影響は認められなかった。ラットおよびマウスにおいて共通の標的臓器は肝であり、ラット慢性毒性試験では10,000ppmで胆管過形成が、マウス発がん性試験では1000ppmから肝細胞の壊死性病変および肝細胞小増殖巣が認められた。マウス発がん性試験において

は、良性に分類される肝細胞腺腫の発生頻度が5000ppmで増加し、肝細胞の壊死・再生の繰り返しによる細胞増殖亢進がそのメカニズムとして考えられた。ラットでは発がん性は認められなかった。

ラット繁殖毒性試験およびラットならびにウサギ催奇形性試験において、繁殖性および胎児毒性ならびに催奇形性は認められなかった。

変異原性試験においては、マウスリンパ腫細胞を用いた遺伝子突然変異試験においてS9 mix存在下でのみ弱い陽性反応を示す場合もあったが、再試験では陰性であったこと、*in vitro*のRec-assayは陰性であったこと、*in vivo*不定期DNA合成試験が陰性であったこと、*in vivo*における小核試験は陰性であったことから、本剤の変異原性は陰性と考えられる。

生体機能に及ぼす影響に関する試験においては、マウスおよびウサギにおいて1250mg/kg以上の用量で中枢神経系あるいは呼吸・循環器系への影響が認められたが、高用量であり、実際の使用場面では中毒発生の可能性は低いと考えられる。

ピラフルフェンエチルを含むエコパート®フロアブル、サンダーボルト®は1999年4月、アシカン®は2001年8月に農業登録された。定められた使用方法および注意事項を遵守することで、本剤の安全性は十分確保され有用な農業資材になるものと考えられる。

問合せ

日本農薬株式会社 開発本部 登録薬事部
〒103-8236 東京都中央区日本橋1-2-5