

技術情報

ジフルベンズロンの毒性試験の概要

アグロ・カネシヨウ株式会社開発部

(平成4年2月20日受理)

薬剤の概要

ジフルベンズロンはオランダのフィリップス・デュッペー社により1970年に発見されたベンゾイルフェニル尿素系の殺虫剤である。本化合物は従来の神経系に作用する殺虫剤とは作用機構が異なり、おもに幼虫の脱皮期に作用する、いわゆる昆虫生育制御剤である。そのため遅効性であるが、高い殺虫力と長い残効性を有し、天敵に対する影響が少ないという特徴を持っている。

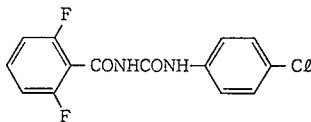
アグロ・カネシヨウ株式会社では1975年から日本植物防疫協会を通じて本化合物の公的委託試験を行ない、果樹、茶、野菜等の分野で鱗翅目、アザミウマ目等の主要害虫に対して卓効を示すことが確認され、1987年に兼商デミリン水和剤として農薬登録が認可された。

本化合物の化学構造およびおもな物理化学的性状は以下のとおりである。

一般名: Diflubenzuron (ISO)

化学名: 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl) urea (CAS No. 35367-38-5)

化学構造:

分子式: $C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$

分子量: 310.7

性状: 白色結晶性粉末

融点: 230~232°C

溶解度(g/l): 水 2×10^{-4} , アセトニトリル 2, 塩化メチレン 0.6, アセトン 6.5, ジオキサン 24, メタノール 1, DMF 104

分配係数(*n*-Octanol/水): $\log P_{ow}=3.70$

急性毒性試験

ラットおよびマウスを用いたジフルベンズロン原体および水和剤の急性毒性試験の結果を表1に示す。

表1 ジフルベンズロンの急性毒性試験結果

薬剤	投与経路	動物種	性	LD ₅₀ (mg/kg)	試験機関 (報告年)
原体	経口	ラット	♂♀	> 8100	日本環境衛生センター (1977)
		マウス	♂♀	> 8100	日本環境衛生センター (1977)
	経皮	ラット	♂♀	> 5400	日本環境衛生センター (1977)
		マウス	♂♀	> 6200	日本環境衛生センター (1977)
	皮下	ラット	♂♀	> 3400	日本環境衛生センター (1977)
		マウス	♂♀	> 4000	日本環境衛生センター (1977)
腹腔	ラット	♂♀	> 7500	関東医師製薬 (1978)	
	マウス	♂♀	> 7500	関東医師製薬 (1978)	
25% 水和剤	経口	ラット	♂♀	>13,500	日本環境衛生センター (1977)
		マウス	♂♀	>13,500	日本環境衛生センター (1977)
	経皮	ラット	♂♀	>10,100	日本環境衛生センター (1977)
		マウス	♂♀	>10,400	日本環境衛生センター (1977)
	皮下	ラット	♂♀	> 6700	日本環境衛生センター (1977)
		マウス	♂♀	> 6700	日本環境衛生センター (1977)
50% 水和剤	吸入 ^{a)}	ラット	♂♀	> 2.71 ^{b)}	Huntingdon Research Centre (1972)

a) 6時間全身暴露, b) mg/l.

刺激性および感作性試験

1. ウサギを用いた眼粘膜刺激性試験

雌雄各3例のヒマラヤウサギの左眼にジフルベンズロン25%水和剤100mgを点眼し、右眼を対照とし、Draizeの方法に従って角膜、結膜および虹彩の変化を

14日間観察した。

本水和剤点眼後2日までは軽度な角膜混濁、虹彩の充血および結膜発赤が認められたが、3日にはほとんど消失した。したがって、ジフルベンズロン25%水和剤は眼粘膜に対して軽度な刺激性を有するが、速やかに回復するものと考えられた。

(Coromandel Indag Research Centre, 1981年)

2. ウサギを用いた皮膚刺激性試験

雌雄各3例のヒマラヤウサギの背部を2か所(各5cm²)除毛し、一方には擦過傷をつけた上でジフルベンズロン25%水和剤500mgを24時間塗布した。塗布終了後3日間、塗布部位をDraizeの方法に従って観察した。

無傷、擦過傷皮膚ともに、塗布終了後72時間までまったく塗布部位の刺激性変化が認められなかった。したがって、ジフルベンズロン25%水和剤の皮膚に対する刺激性はないものと考えられた。

(Coromandel Indag Research Centre, 1981年)

3. モルモットを用いた感作性試験

1群雌10例のHartley系モルモットを用いて、ジフルベンズロン25%水和剤の皮膚感作性を、Maximization法で検討した。すなわち、本水和剤の1%懸濁液、FCAおよび両者の乳化液各0.05mlを背部に皮内投与し、1週間後に本水和剤の50%懸濁液0.4mlを同部位に48時間塗布した。以上の感作処理が終了した2週間後に本水和剤の10%懸濁液0.1mlを腹部に24時間塗布し、この誘発処理後72時間まで誘発処理部位の皮膚反応を観察した。

誘発処理後24時間に1例にのみ、軽度な発赤が認められたが、その後はいずれの動物にも皮膚反応はみられなかった。したがって、ジフルベンズロン25%水和剤の皮膚感作性は陰性であると考えられた。

(Huntingdon Research Centre, 1978年)

亜急性毒性試験

1. ラットを用いた亜急性毒性試験

投与量は0, 10, 30, 100および300ppmとし、1群雌雄各10例のWistar系ラットに3か月間ジフルベンズロン原体を飼料に混入して投与した。

投与期間中はいずれの投与群にも死亡あるいは特筆すべき症状は認められず、体重推移、摂餌量および摂水量にも本化合物投与の影響がみられなかった。投与終了時に実施した血液検査では300ppm投与群において赤血球数、ヘマトクリットおよびヘモグロビン濃度の軽度な低下が認められたが、血液生化学的検査ではいずれの投与群にも本化合物投与による変化は認められなかった。

また、同時に実施した尿検査でも本化合物投与の影響はみられなかった。投与終了時の剖検では、いずれの投与群にも肉眼的に異常は認められず、300ppm投与群において脾臓重量の増加が認められたが、いずれの臓器にも病理組織学的に本化合物投与による変化は認められなかった。したがって、本試験におけるジフルベンズロンの最大無作用量は100ppm(雄8.1mg/kg/day, 雌7.9mg/kg/day)であると考えられた。

(松本歯科大学および東京歯科大学, 1979年)

2. イヌを用いた亜急性毒性試験

投与量は0, 10, 20, 40および160ppmとし、I群雌雄各3例のビーグル犬に3か月間ジフルベンズロン原体を含む飼料を1日400g摂取させた。

いずれの投与群にも投与期間中の死亡は認められず、本化合物投与による一般症状の変化もみられなかった。また、投与期間中の体重推移、摂餌量および摂水量にも本化合物投与の影響がみられなかった。投与開始前および投与期間中数回実施した血液検査では、各投与群において用量相関性に乏しい血漿中遊離ヘモグロビンの増加が認められ、160ppm投与群ではメトヘモグロビンの増加もみられた。また、40および160ppm投与群においてGPTおよびALP活性の増加が認められた。投与開始前、投与開始後6週および12週に実施した尿検査および眼科学的検査ではいずれの投与群にも本化合物投与による変化が認められなかった。投与終了時剖検において、肉眼的および病理組織学的に本化合物投与による影響は認められず、臓器重量にも変化が認められなかった。したがって、本試験におけるジフルベンズロンの最大無作用量は40ppm(雌雄とも1.6mg/kg/day)であると判断された。

(Huntingdon Research Centre, 1974年)

3. ラットを用いた亜急性吸入毒性試験

1群雌雄各5例のSD系ラットに、3週間にわたって毎週5日間、ジフルベンズロン25%水和剤を全身暴露した。暴露濃度は0, 500, 5000および50,000mg/m³に設定し、容積100lの暴露チャンバー内で、1日1時間粉霧化した本水和剤を吸入させた。

噴霧化した本水和剤のチャンバー内での粒径は95%以上が5μm以下であった。暴露中は5000mg/m³以上の投与群において軽度な呼吸障害が認められたが、暴露終了後速やかに回復した。投与期間中はいずれの投与群にも死亡動物が認められず、その間の体重、摂餌量および摂水量にも本水和剤暴露の影響が認められなかった。また、投与終了時に行なった血液検査、血液生化学検査および尿検査においても、本水和剤暴露による変化が

みられず、剖検時の肉眼的所見、臓器重量および病理組織学的所見にも特筆すべき変化が認められなかった。したがって、本試験におけるジフルベンズロン 25% 水和剤の最大無作用量は 500 mg/m³ (実濃度 61 mg/m³) であると考えられた。

(Huntingdon Research Centre, 1975 年)

慢性毒性/発癌性試験

1. イヌを用いた慢性毒性試験

投与量は 0, 2, 10, 50 および 250 mg/kg/day とし、1 群雌雄各 6 例のビーグル犬に 52 週間毎日ジフルベンズロン原体をゼラチンカプセルを用いて経口投与した。

いずれの投与群にも投与期間中に本化合物投与による一般症状の変化は認められなかったが、250 mg/kg 投与群の雌 1 例が肝不全のため、50 mg/kg 投与群の雌 1 例が気管支肺炎のため投与期間中に死亡した。これらの動物の死因は、詳細な病理組織学的検査の結果、本化合物投与とは直接的な関連のないものであると判断された。その他の投与群には、投与期間中の体重、摂餌量および摂水量に本化合物投与の影響が認められず、投与開始前、投与開始後 26 週および投与終了時に実施した眼科的検査においても、本化合物投与の影響がみられなかった。投与開始前を含めて 6 回にわたって行なった血液検査では、10 mg/kg 以上の投与群においてメトヘモグロビンおよびスルフヘモグロビンの増加が認められた。また、50 mg/kg 以上の投与群では軽度な貧血と網状赤血球率および血小板数の増加が認められ、赤血球中にハイנט小体も検出された。同時に実施した血液生化学検査では 50 mg/kg 以上の投与群において LDH 活性およびコレステロール濃度の軽度な増加が認められたが、尿検査では本化合物投与に伴う変化が認められなかった。投与終了時の剖検では肉眼的な変化はみられなかったが、50 mg/kg 以上の投与群において肝臓および脾臓重量の増加が認められた。これらの臓器の病理組織学的検査では色素沈着が認められたが、その他の臓器組織において、本化合物の投与量と相関した病理組織学的変化は認められなかった。したがって、本試験におけるジフルベンズロンの最大無作用量は 2 mg/kg/day であると考えられた。

(Inveresk Research International, 1985 年)

2. ラットを用いた発癌性試験

投与量は 0, 156, 625, 2500 および 10,000 ppm とし、1 群雌雄各 50 例 (対照群は雌雄各 100 例) の SD 系ラットに 104 週間ジフルベンズロン原体を飼料に混

入して投与した。

いずれの投与群にも投与期間中に本化合物投与にともなう一般症状の変化が認められず、死亡率にも変化がみられなかった。2500 および 10,000 ppm 投与群の雌において軽度な体重増加抑制が認められたが、同群の雄には同様な変化が認められず、また、いずれの投与群においても摂餌量の変化が認められなかった。投与開始後 52 週および投与終了時に実施した血液検査では、625 ppm 以上の投与群において軽度な貧血がみられ、また、本化合物投与各群においてメトヘモグロビンおよびスルフヘモグロビンの増加が認められた。投与終了時の剖検では、用量依存的な脾臓重量の増加が 2500 ppm 以上の投与群において観察された。病理組織学的には本化合物投与各群の肝臓および脾臓に色素沈着が観察され、625 ppm 以上の投与群では骨髓過形成も認められた。しかし、いずれの群においても腫瘍発現率に変化が認められず、また、本化合物投与による特異的腫瘍の発現もみられなかった。したがって、ジフルベンズロンには発癌性がないものと考えられた。

(Hazleton Laboratories America, 1984 年)

3. マウスを用いた慢性/発癌性併合試験

投与量は 0, 16, 80, 400, 2000 および 10,000 ppm とし、1 群雌雄各 88 例 (対照群は雌雄各 176 例) の CFLP 系マウスに 91 週間ジフルベンズロン原体を飼料に混入して投与した。

80 ppm 以上の投与群において、投与期間中に四肢の蒼白化がみられたが、その他に特筆すべき症状の変化は観察されず、投与終了時の死亡率にも、本化合物投与の影響が認められなかった。また、投与期間中の体重および摂餌量には、本化合物投与の影響がみられなかったが、2000 ppm 以上の投与群の雌において軽度な摂水量の増加がみられた。投与開始後 26, 52, 78 週および投与終了時に実施した血液検査では 80 ppm 以上の投与群におけるメトヘモグロビンおよびスルフヘモグロビンの増加、400 ppm 以上の投与群における血小板数の増加およびハイנט小体の出現、2000 ppm 以上の投与群における貧血および白血球数の増加が認められ、同時に実施した血液生化学検査では 2000 ppm 以上の投与群における ALP および GPT 活性の増加が認められた。また、血液検査の 1 週間前に実施した尿検査では 10,000 ppm 投与群において尿量の軽度な増加および尿比重の軽度な低下が認められた。投与終了時剖検では本化合物投与による臓器重量の変化は認められなかったが、投与開始後 26, 52 および 78 週の間剖検 (雌雄各 12 例、ただし対照群は雌雄各 24 例) では、2000

ppm以上の投与群において、肝臓および脾臓重量の増加とともに脾臓の暗赤色化が認められた。病理組織学的には400 ppm以上の投与群における肝細胞腫大、空胞変性、肝類洞拡張、髄外造血、脂肪変性などとともに色素沈着が認められ、80 ppm以上の投与群において脾臓の髄外造血ならびに色素沈着も認められた。しかし、いずれの群においても腫瘍発現率に変化が認められず、また、本化合物投与による特異的腫瘍の発現もみられなかった。したがって、本試験におけるジフルベンズロンの最大無作用量は16 ppm (雄 1.2 mg/kg/day, 雌 1.4 mg/kg/day) であり、10,000 ppm (雄 836 mg/kg/day, 雌 959 mg/kg/day) の用量においても発癌性がないものと考えられた。

(Huntingdon Research Centre, 1984年)

次世代に及ぼす影響

1. ラットを用いた繁殖試験

投与量は0, 10, 20, 40 および 160 ppm とし、1群雌雄各20例のSD系ラットにP世代の交配開始前60日からF3世代が成熟期に達するまでジフルベンズロン原体を含む飼料を摂取させた。

いずれの世代においても、一般症状や体重推移に本化合物投与の影響が認められず、交尾率、妊娠率、分娩仔数、分娩仔の生存率、分娩仔の発育等にも変化が認められなかった。

また、1群雌雄各20例のCFY系ラットに0, 1000 または 100,000 ppm のジフルベンズロン原体を含む飼料をP世代の交配開始前60日間および交配からF1が離乳するまでの合計約120日間にわたって摂取させた。

いずれの投与群においても、一般症状、体重、摂餌量には本化合物投与の影響が認められなかった。投与開始後6週および投与終了時の血液検査では貧血とともに、メトヘモグロビンおよびスルフヘモグロビンの増加が認められ、100,000 ppm 投与群ではGPT活性の増加も認められた。また、本化合物投与各群の病理組織学的検査において、肝細胞の腫大、クッパー細胞および脾臓における色素沈着が認められた。しかし、交尾率、妊娠率、妊娠期間、分娩仔数、分娩仔の生存率等に本化合物投与の影響が認められず、生後離乳までの哺育仔の死亡率および体重推移にも本化合物投与による変化が認められなかった。離乳時に剖検した仔動物の病理組織学的検査では、100,000 ppm 投与群において肝細胞の腫大が認められた。したがって、これらの試験ではきわめて高い用量群において血液学的および病理学的にジフルベンズロン投与による毒性徴候は認められたものの、本化合物は

ラットの繁殖性に対して影響を及ぼさないものと考えられた。

(Huntingdon Research Centre, 1975, 1978年)

2. ラットを用いた催奇形性試験

投与量は0, 1, 2 および 4 mg/kg とし、1群20例のSD系妊娠雌ラットにジフルベンズロン原体を妊娠6日から15日までの10日間毎日1回経口投与した。妊娠20日に帝王切開して妊娠状況を調べるとともに、胎仔の詳細な外表、内臓および骨格検査を行なった。

母動物の一般症状および体重推移には本化合物投与による変化が認められず、帝王切開時の黄体数、着床数、生存胎仔数、死亡吸収胚数、胎仔体重、胎仔の性比等にも本化合物投与による変化が認められなかった。また、胎仔の外表、内臓および骨格検査においても、本化合物投与による奇形胎仔の発現率の変化が認められず、本化合物による特異的奇形の発現もみられなかった。したがって、ジフルベンズロンはラットに対して催奇形性がなく、妊娠維持および胎仔の発育にも影響を及ぼさないものと考えられた。

(Huntingdon Research Centre, 1975年)

3. ウサギを用いた催奇形性試験

投与量は0, 1, 2 および 4 mg/kg とし、1群13例のニュージーランドホワイト妊娠雌ウサギにジフルベンズロン原体を妊娠6日から18日までの13日間毎日1回経口投与した。妊娠28日に帝王切開して妊娠状況を調べるとともに、詳細な胎仔の外表、内臓および骨格検査を行なった。

4 mg/kg 投与群において2例の流産が認められ、対照群を含むその他の群において各1~2例の死亡が認められたが、いずれも本化合物投与とは関連のない偶発的变化であると考えられた。その他の母動物において、一般症状および体重推移に本化合物投与と関連する変化が認められず、帝王切開時の黄体数、着床数、生存胎仔数、死亡吸収胚数、胎仔体重、性比等にも変化が認められなかった。また、胎仔の外表、内臓および骨格検査においても、本化合物投与による奇形胎仔発現率に変化が認められず、特異的奇形の発現もみられなかった。したがって、ジフルベンズロンはウサギに対して催奇形性がなく、妊娠維持および胎仔の発育にも影響を及ぼさないものと考えられた。

(Huntingdon Research Centre, 1975年)

変異原性試験

1. 細菌を用いた復帰変異性試験

薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下に

おけるジフルベンズロン原体の復帰変異性を、5株のヒスチジン要求性サルモネラ菌 (TA98, TA100, TA1535, TA1537 および TA1538) およびトリプトファン要求性大腸菌 (WP2hcr) を用いて Ames の方法に従って検討した。本化合物の処理濃度は 10~5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ とし、2-aminoanthracene, AF-2 など合計 8 化合物を陽性対照物質として使用した。

S9 mix の有無にかかわらず、いずれの処理濃度においても本化合物による菌株の生育阻害が認められず、復帰変異コロニー数の増加も認められなかった。一方、陽性対照物質には明らかな復帰変異コロニー数の増加が認められた。したがって、ジフルベンズロンの復帰変異性は陰性であると考えられた。

(残留農薬研究所, 1978 年; Western Regional Research Center, 1979 年)

2. L5178Y 細胞を用いた遺伝子突然変異性試験

薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下で L5178Y (TK⁺) 細胞をジフルベンズロン原体とともに培養し、Trifluorothymidine (TFT) の存在下における細胞増殖性を検討した。本化合物の処理濃度は 1.17~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、陽性対照には Ethyl-methanesulfonate および dimethylnitrosoamine を使用した。

本化合物処理細胞では、S9 mix の有無にかかわらず、いずれの処理濃度においても、TFT 存在下における増殖コロニー数の増加が認められなかった。一方、陽性対照物質処理細胞では、TFT 存在下において著しい増殖コロニーの増加が認められた。したがって、ジフルベンズロンの L5178Y 細胞に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性であると考えられた。

(Western Regional Research Center, 1979 年)

3. チャイニーズハムスター卵巣細胞を用いた染色体異常誘発性試験

薬物代謝酵素系 (S9 mix) の存在下および非存在下におけるジフルベンズロン原体の染色体異常誘発性をチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) を用いて *in vitro* で検討した。本化合物の処理濃度は 100~250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、陽性対照物質として、Mitomycin C および Cyclophosphamide を用いた。S9 mix の有無にかかわらず、いずれの処理濃度においても、本化合物による染色体異常発現率の変化は認められなかった。一方、陽性対照物質処理細胞では、著しい染色体異常細胞の増加が認められた。したがって、ジフルベンズロンの染色体異常誘発性は陰性であると考えられた。

(Hazleton Biotechnology, 1986 年)

4. マウスを用いた小核試験

1 群雄 5 例の Swiss-Webster 系マウスに 0, 15, 150 または 1500 mg/kg のジフルベンズロン原体を 24 時間間隔で 2 回経口投与し、2 回目の投与後 6 時間に各マウスの大腿骨から骨髓細胞を採取した。採取した骨髓細胞から塗抹標本を作成し、小核のみられる多染性赤血球の割合を計数するとともに、多染性赤血球と正染性赤血球の割合を求めた。陽性対照物質には Triethyl-enemelamine を用いた。

本化合物投与による小核赤血球出現率の増加は認められず、正染性赤血球/多染性赤血球比にも変動が認められなかった。陽性対照群では小核のみられる多染性赤血球の増加がみられ、多染性赤血球比率の低下も認められた。したがって、ジフルベンズロンは小核赤血球の発現を誘発せず、赤血球の成熟にも影響しないものと考えられた。

(Western Regional Research Center, 1979 年)

5. 細菌を用いた DNA 修復試験

DNA 組換え修復機構を保持した枯草菌株 (H-17) および欠損した枯草菌株 (M-45) を用いて、賀田の方法にしたがって、ジフルベンズロン原体の DNA 修復性に対する影響を検討した。本化合物の処理濃度は 20~2000 $\mu\text{g}/\text{disk}$ とし、陰性対照物質には Kanamycin を、陽性対照物質には Mitomycin C を用いた。

いずれの処理濃度においても、本化合物による生育阻止域がまったく認められなかったが、陰性および陽性対照物質では明らかな生育阻止域の差が認められた。したがって、ジフルベンズロンの DNA 障害性は陰性であると考えられた。

(残留農薬研究所, 1978 年)

生体機能に及ぼす影響

ジフルベンズロン原体の一般症状に対する作用、麻酔増強作用、抗痙攣作用、抗レセルピン作用、鎮痛作用、呼吸循環器系に対する作用、摘出腸管の自動運動に対する作用、腎機能に対する作用、胃液分泌に対する作用、角膜反射に対する作用、カラゲニン浮腫に対する抗炎症作用等について、マウス、ラット、イヌまたはモルモットを用いて検討した。

いずれの試験においても、本化合物投与による変化が認められず、検討した範囲では、ジフルベンズロンは生体機能に対して影響を及ぼさないものと考えられた。

(三共株式会社中央研究所, 1979 年)

要 約

ジフルベンズロン原体およびその水和剤の急性毒性は

きわめて弱く、眼粘膜に対して弱い刺激性が認められているが、皮膚刺激性および皮膚感作性は認められていない。亜急性毒性および慢性毒性では、本化合物投与によって、病理組織学的変化を伴う貧血および肝臓、脾臓等の臓器重量の増加が認められたが、いずれも軽微な変化であり、低用量群ではこれらの変化が認められなかった。ラットの繁殖に及ぼす影響もみられず、ラットおよびマウスにおける発癌性、ラットおよびウサギにおける催奇形性、多岐にわたって実施した変異原性も陰性であった。

ジフルベンズロンを有効成分とする兼商デミリン水和剤は1987年に農薬登録され、従来の神経系に作用する殺虫剤とは作用機構の異なる優れた昆虫生育制御剤であり、安全性が高く、有用な農業資材の一つとして広く実用に供せられている。

問合せ

アグロ・カネショウ株式会社開発部
〒100 東京都千代田区丸の内 3-1-1