学会賞受賞論文

(業績賞・技術)

殺ダニ剤ピフルブミドの開発

古谷 敬*, 町谷 幸三, 藤岡 伸祐, 中野 元文, 稲垣 勝裕

日本農薬株式会社研究本部総合研究所

(2017年6月8日受理)

Development of a novel acaricide, pyflubumide

Takashi FURUYA, Kozo MACHIYA, Shinsuke FUJIOKA, Motofumi NAKANO and Katsuhiko INAGAKI

Research Center, Research Division, Nihon Nohyaku Co., Ltd., 345 Oyamada-cho, Kawachi-nagano, Osaka 586-0094, Japan

Keywords: pyflubumide, carboxanilide, acaricide, mitochondrial complex II, IPM.

はじめに

ピフルブミド (pyflubumide, Fig. 1) は日本農薬(株)が開発した新規殺ダニ剤であり, カルボキサニリド骨格と, 従来の農薬に見られなかった特異な官能基であるメトキシヘキサフルオロイソプロピル基を化学構造的特徴とする化合物である. 本剤はカルボキサニリド骨格を有する唯一のハダニ剤であり, ミトコンドリア複合体IIの新規な阻害剤としてIRAC作用機構分類においてグループ25B (カルボキサニリド系)に単独で位置づけられている. 一方, ピフルブミドは有用昆虫・天敵に影響が少ないという優れた選択性から, IPM (総合的害虫管理)に適した防除資材と言える. ハダニ類の抵抗性発達は年々深刻化していることから, 既存剤抵抗性個体群に対しても高い効果を示すIPM適合型基幹防除剤として, ピフルブミドの今後のさらなる活用が期待される.

本稿では, ピフルブミド創出の経緯, 合成法, 合成展開, 生物活性, 安全性, 作用機構についてその概要を述べる.

1. 研究の経緯

1.1. リード化合物の創出

ピフルブミド創出は, ミトコンドリア複合体IIの阻害剤として知られるカルボキサミド系殺菌剤を端緒としている (Scheme 1). 1966年にカルボキシニが上市されて以降, 多くのカルボキサミド系殺菌剤が開発されてきたが, 特に2000年以降, アニリド2のような2'位に嵩高い置換基を有したボスカリドやベンチオピラドといったワイドスペクトル剤が相次いで上市されている¹⁾.

日本農薬(株)においても, 1990年代後半にカルボキサミド系殺菌剤の探索を行っていたが, 当時, 社内ではフルベンジアミド²⁾, ピリフルキナゾン³⁾といったパーフルオロイソプロピル基を有した新規殺虫剤が見出されており, パーフル

Fig. 1. Chemical structure of pyflubumide.

* 〒586-0094 大阪府河内長野市小山田町345

E-mail: furuya-takashi@nichino.co.jp

© 日本農薬学会

Scheme 1. Discovery of pyflubumide.

オロイソプロピル基の他骨格への導入が検討された時期でもあった。殺菌活性の向上を狙い、我々はこの特異なフルオロアルキル基をカルボキサミド骨格に導入した化合物**3**を合成したが、殺菌活性は低かった。この低活性の主要因をパーフルオロイソプロピル基導入に伴う脂溶性増大と考え、次に脂溶性低下を目的にベンジル位のフッ素を水素に変換した化合物**4**を合成した。その結果、殺菌活性は改善されなかったものの、同時に実施した殺虫活性スクリーニングにおいて弱い殺ダニ活性が認められた。

ハダニ類はライフサイクルが短く、増殖力が高いことから薬剤抵抗性の発達が速く、農業生産の現場からは常に新規な殺ダニ剤が求められている。当初の狙いとは異なったものの、カルボキサミド系骨格で殺ダニ活性の報告事例はこれまで無かったことから、**4**は新規殺ダニ剤の有望リード化合物と判断し、研究テーマを殺ダニ剤創出に切り替え周辺展開を開始することとした。

1.2. リード最適化と構造活性相関

合成展開においては酸部位、アニリノ部位、フルオロアルキル基、アミド部位の四部位に分けて検討を行った。各部の構造活性相関の概略についてはTable 1に示す。

1.2.1. 酸部位

化学構造的な類似性から、本剤の殺ダニ活性がカルボキサミド系殺菌剤と同様の作用機構に起因する可能性を考え、化合物**4**の酸部位を既存のカルボキサミド系殺菌剤の酸部位に変換したところ、フラメトピル誘導体に高い活性が認められた。その後、ピラゾール置換基の精査を行い、より高活性なトリメチルピラゾール体を見出した⁶⁾。

1.2.2. アニリノ部位

本部位についても置換基傾向はカルボキサミド系殺菌剤に類似しており、オルト位に嵩高い置換基を有する化合物で高い活性が認められた。ペンチオピラドやペンフルフェンで用いられている1,3-ジメチルブチル基が最も効果が高く、置換基の構造が1,3-ジメチルブチル基から離れるに従い活性が低下することが分かった。オルト位の結果から、メタ位についても、カルボキサミド系殺菌剤で用いられている置換基の検討をおこなうこととした。フルトラニルの置換基を導入した化合物では、活性レベルは高くないものの、期待通り殺ダニ活性が見られた。そこで次に、オルト置換体で高活性を示し

Table 1. Summary of structure-activity relationship of carboxamides against *Tetranychus urticae*

Substituents	Structure-activity relationship
X ₁	CH ₃ >n-Pr>H
X ₂	CH ₃ >Cl, H
X ₃	CH ₃ >Cl>H
Y	2-(1,3-Me ₂ -Bu), 3- <i>i</i> -Bu > 2-(3-Me-Bu), 2-(1,3-Me ₂ -Pentyl), 3-(2-Me-Bu) > 3-O- <i>i</i> -Pr, 3- <i>n</i> -Pr ≫ 2- <i>i</i> -Bu, H
Z	H, OCH ₃ > OEt > O- <i>n</i> -Pr ≫ F
R	Alkyl carbonyl > H

Scheme 2. Synthetic pathway of pyflubumide.

たアルキル基を検討したところ、フルトラニルと同じ分岐鎖を持つ3'-イソブチル体で2'-(1,3ジメチルブチル)体と同等の高い殺ダニ活性が見出された⁷⁾。

3'-イソブチル体はアニリン部位の原料である3'-イソブチルアニリンが比較的安価な原料から誘導調達できる上に、骨格内に不斉炭素を有していないことから、本剤類縁体が開発に有利と考え、以後は3'-イソブチル体の最適化を行うこととした。

1.2.3. フルオロアルキル基

本部分の最適化検討を行ったところ、前述したヘキサフルオロイソプロピル基に加え、メトキシヘキサフルオロイソプロピル基を置換した化合物で高い活性が認められた。これらの置換基がハダニ活性の発現にとって適度な脂溶性を有していることが要因と推測される。

1.2.4. アミド部の展開

アミド部の置換基について検討を行ったところ、低級アルキルカルボニル基を導入した化合物に高い活性が認められた。本結果については、これらのアシル誘導体はpro-pesticideであり、アシル基導入によりハダニ体内への透過性が向上したと考えると容易に説明できる。Pro-pesticideとして働く化合物は農薬においていくつか存在し、殺ダニ剤分野においても例がある⁸⁾。

その後、アシル誘導体について最終選抜を行い、各種高次試験において高活性を示したピフルブミドを開発化合物として選抜した。

2. 合 成 法

3-イソブチルアニリン5を出発原料とし、ラジカル反応によるパーフルオロイソプロピル化により6へと誘導後、ベンジル位のフッ素原子をメトキシ基で置換し、アニリン体7を合成する⁴⁾。次にこのアニリン体7を酸クロリド8と反応させピラゾールカルボキサミド体9へと誘導後、アミド部のイソブチル化を行うことにより、ピフルブミド(1)を合成することができる⁵⁾ (Scheme 2)。

3. 名称および性状

ピフルブミドの名称および物理的・化学的性質についてTable 2に示す。ピフルブミドは2007年よりNNI-0711のコード名で(一社)日本植物防疫協会の新農薬実用化試験に供試され、優れた薬効が確認された。安全性研究においても問題は見出されず、国内では2015年に登録され、フロアブルの剤型でハダニ防除に活用されている。

4. 生 物 活 性

4.1. 殺虫スペクトル

ピフルブミドの各種害虫に対する殺虫効果をTable 3に示す。ピフルブミドは作物生産において重要な害虫であるナミハダニ、カンザワハダニ、ミカンハダニを含む食植性ハダニ類に対し特異的に高い効果を示す。

Table 2. Nomenclature and physicochemical properties of pyflubumide

Common Name : ピフルブミド (Pyflubumide)
Development Code: NNI-0711
Trade Name : ダニコンク®, ダブルフェース®
CAS registry No.: 926914-55-8
Chemical name (IUPAC): 3'-isobutyl-N-isobutryl-1,3,5-trimethyl-4'-[2,2,2-trifluoro-1-methoxy-1-(trifluoromethyl)ethyl]pyrazole-4-carboxanilide
Molecular formula: C ₂₅ H ₃₁ F ₆ N ₃ O ₃
Molecular weight: 535.52
Appearance: White powder
Density: 1.3 g/cm ³ (20°C)
Melting point: 86°C
Vapor pressure: 1.9 × 10 ⁻⁶ Pa (20°C)
Solubility in water: 0.27 mg/L (20°C)
Partition coefficient: Log P _{o/w} = 5.34 (25°C)

4.2. 天敵・有効昆虫に対する影響

天敵・有用昆虫に対する影響を Table 4 に示す. ピフルブミドは, いずれの虫種に対しても 100–200 mg a.i./L の濃度で顕著な影響を示さず, IPM 体系の中で使用可能で, 花粉媒介昆虫との併用も可能なハダニ剤と考えられた⁹⁾.

5. 人畜毒性, 環境生物に及ぼす影響

哺乳動物に対するピフルブミド原体および製剤の急性毒性は低く, 毒物あるいは劇物に該当しない. 加えて原体および製剤 (20% フロアブル) のいずれにも, 眼及び皮膚に対する重篤な刺激性・感作性も認められなかったことから本剤の急

Table 3. Insecticidal and acaricidal spectrum of pyflubumide

Order	Common name	Test stages	LC ₅₀ (mg a.i./L)
Acarina	Two-spotted spider mite	Adult	1.2
	Kanzawa spider mite	Adult	1.9
	Citrus red mite	Adult	1.3
	European red mite	Adult	2.2
	Pink citrus rust mite	Adult, Larva	>100
	Tea rust mite	Adult, Larva	>100
	Broad mite	Adult, Larva	>100
Hemiptera	Green peach aphid	Adult, Larva	>500
	Cotton whitefly	Egg	>100
Thysanoptera	Western flower thrips	1st larva	>500
Diptera	Tomato leaf miner	Egg	>500
Coleoptera	Rice weevil	Adult	>500
Lepidoptera	Common cutworm	3rd larva	>500

Table 4. Effects of pyflubumide on beneficial arthropods and natural enemies

Common name	Scientific name	Test stage	LC ₃₀ (mg a.i./L)
Silkworm	<i>Bombyx mori</i>	4th larva	>100
Honey bee	<i>Apis mellifera</i>	Adult	>200
Hornfaced bee	<i>Osmia cornifrons</i>	Adult	>100
Predatory mite	<i>Phytoseiulus persimilis</i>	Egg	>200
	<i>Amblyseius californicus</i>	Adult	>100
	<i>Amblyseius swirskii</i>	Egg	>200
Lady beetle	<i>Harmonia axyridis</i>	Adult	>100
Predatory midge	<i>Aphidoletes aphidimyza</i>	Larva	>100
Parasite wasp	<i>Apanteles glomeratus</i>	Pupa	>200
	<i>Encarsia formosa</i>	Pupa	>200
Predatory bug	<i>Orius strigicollis</i>	Adult	>100
Wolf spider	<i>Pardosa pseudoannulata</i>	Larva	>200

性毒性, 刺激性, 感作性は GHS 区分外である. 発癌性, 変異原性, 催奇形性, 繁殖毒性等の各種試験においてもヒトの健康に悪影響を及ぼす恐れのないことを確認した.

また, 水産動植物に対しては, 製剤の魚毒性は比較的低く, 魚体濃縮性も問題なく, 環境動態も易分解であり, 使用基準を遵守すれば環境に悪影響を及ぼすことなく使用できるものと考えられた.

6. 作用機構

ピフルブミドは, 探索研究の端緒となったカルボキサミド系殺菌剤と同様に, ミトコンドリア電子伝達系複合体 II 内の電子伝達阻害を作用機作とする¹⁰⁾. ピフルブミド自体は阻害活性をほとんど示さないが, NH 体が高い阻害活性を示す. また, ピフルブミドはハダニホモジネート中で速やかに脱アシル化され, 定量的に NH 体が生成することを確認

Table 5. Inhibitory activities of pyflubumide (1) and its NH-form (9) against mitochondrial complex II of a variety of species

Order	Common name	IC ₅₀ values (μM)	
		Compounds No.	
		1	9
Acarina	Two-spotted spider mite	>10	0.025
Hymenoptera	Honey bee	NT	>1
Lepidoptera	Common cutworm	NT	>10
Diptera	Northern blowfly	NT	>10
Salmoniformes	Rainbow trout	>10	>10
Rodentia	Norway rat	>1	>10

Fig. 2. The inhibition of complex II of spider mite mitochondria by the OH-form of cyenopyrafen in the presence of the NH-form of pyflubumide (A) or the OH-form of cyenopyrafen (B). (A) Titration by the OH-form of cyenopyrafen in the presence of 0 (●), 20 (■), or 35 nM (▲) of the NH-form of pyflubumide. (B) Titration by the OH-form of cyenopyrafen in the presence of 0 (●), 5 (■), or 6.5 nM (▲) of the OH-form of cyenopyrafen.

した。以上の結果から、ピフルブミドはpro-pesticideであり、ハダニ体内で活性化されてハダニ類のミトコンドリア電子伝達系複合体IIに作用し、殺ダニ活性を発現することが示唆された。また、NH体はナミハダニ由来のミトコンドリア複合体IIに対して高い阻害活性を示す一方、他の生物種由来のミトコンドリアではほとんど阻害が認められなかった (Table 5)。In vitroにおける高い選択性はハダニ類への選択的効果と水生生物、哺乳類および天敵・有用昆虫に対する低毒性を裏づけるものと言える。

また、本剤と骨格の異なる β -ケトニトリル誘導体もピフルブミドと同様にミトコンドリアの複合体IIの阻害剤であるとの報告があることから^{11,12)}、ピフルブミドNH体とシエノピラフェンOH体を用いたdouble inhibitors titration解析により、両剤の作用の違いを検討した。その結果、両者は加成的な阻害を示さず (Fig. 2A)、シエノピラフェンOH体同士を用いた場合は明らかに異なった (Fig. 2B)。この結果から、両化合物のナミハダニの複合体IIにおける結合様式が異なることが明らかとなった。したがって、これら β -ケトニトリル系殺ダニ剤とカルボキサニリドを基本骨格とするピフルブミドが作用点レベルで交差する可能性は低いと考えられ、IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) の作用機構分類でも異なるサブグループに分類された¹³⁾。

おわりに

本研究では、長年使用用途が病害防除分野に限られていたカルボキサミド骨格を有する化合物に、ヘキサフルオロイソプロピル基という特異なフルオロアルキル基を導入することにより、新たに殺ダニ活性を示す構造を見出すことに成功し、ピフルブミド創出につなげることができた。

現在、ピフルブミドは日本と韓国において農薬登録され、日本においては2015年より単剤のダニコング®フロアブル、およびフェンピロキシメート混剤のダブルフェース®を販売

している。海外においては本年よりNoblesse®の商標で販売を開始した韓国を皮切りに今後さらに各国で農薬登録を行い、普及地域を拡大する予定である。本剤が今後も国内外で広く利用され農業の発展に貢献することを期待している。

最後に、ピフルブミドの開発・上市にあたり、多大なご指導、ご助言を頂きました京都大学の三芳秀人教授および関係試験機関の先生方に厚く御礼申し上げます。また、本剤の研究開発にご尽力頂いた日本農薬(株)の関係者にも御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 柳瀬勇次, 勝田裕之, 富谷完治, 榎本 幹, 坂本 修: *J. Pestic. Sci.* **38**, 120-129 (2013).
- 2) M. Tohnishi, H. Nakao, T. Furuya, T. Shimizu, A. Seo, K. Sakata, S. Fujioka, H. Kodama, T. Hirooka and T. Nishimatsu: *J. Pestic. Sci.* **30**, 354-360 (2005).
- 3) M. Uehara, M. Watanabe, M. Kimura, M. Morimoto and M. Yoshida (Nihon Nohyaku Co., Ltd.): *Jpn Tokkyo Koho JP 4099622B* (in Japanese).
- 4) T. Furuya, K. Machiya, A. Suwa and S. Fujioka (Nihon Nohyaku Co., Ltd.): *PCT Int. Appl.* WO2005/115994 (2005).
- 5) T. Furuya, H. Kanno, K. Machiya, A. Suwa, N. Yasokawa and S. Fujioka (Nihon Nohyaku Co., Ltd.): *PCT Int. Appl.* WO2007/020986 (2007).
- 6) T. Furuya, M. Yamaguchi, M. Tohnishi, A. Seo, M. Morimoto, T. Takemoto and S. Fujioka (Nihon Nohyaku Co., Ltd.): *Pct. Int. Appl.* WO2002/96882 (2002).
- 7) T. Furuya, A. Suwa, M. Nakano, S. Fujioka, N. Yasokawa and K. Machiya: *J. Pestic. Sci.* **40**, 38-43 (2015).
- 8) P. Jeschke: *Pest Manag. Sci.* **72**, 210-225 (2016).
- 9) T. Furuya, M. Nakano, A. Suwa, N. Yasokawa, S. Fujioka and K. Machiya: "Discovery and Synthesis of Crop Protection Products," Vol. 1204, ed. by P. Maiefisch and T. M. Stevenson, ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC, pp.

379-389, 2015.

- 10) M. Nakano, N. Yasokawa, A. Suwa, S. Fujioka, T. Furuya and K. Sakata: *J. Pestic. Sci.* **40**, 15-24 (2015).
- 11) K. Nakahira, S. Takii and H. Murakami: *Abstr. 11th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry*, II-1-i-23B (2006).
- 12) N. Hayashi, Y. Sasama, N. Takahashi and N. Ikemi: *Pest Manag. Sci.* **69**, 1080-1084 (2013).
- 13) <http://www.irac-online.org/documents/moa-structures-poster-english/?ext=pdf> (2017年3月26日閲覧)

略 歴

古谷 敬 (ふるや たかし)

生年月日: 1970年12月13日

最終学歴: 慶應義塾大学大学院理工学研究科前期博士課程修了

研究テーマまたは主な職歴: 農薬探索合成, 知財管理

趣味: 神社・仏閣, 博物館巡り

町谷幸三 (まちや こうぞう)

生年月日: 1958年1月17日

最終学歴: 大阪府立大学大学院農学研究科博士課程修了

研究テーマまたは主な職歴: 農薬探索合成, ライセンス業務

趣味: 写真撮影

藤岡伸祐 (ふじおか しんすけ)

生年月日: 1966年7月8日

最終学歴: 岡山大学大学院農学研究科修士課程修了

研究テーマまたは主な職歴: 殺虫剤の探索・開発研究, 殺虫剤の開発業務

趣味: 昆虫採集

中野元文 (なかの もとふみ)

生年月日: 1980年7月25日

最終学歴: 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻修士課程修了

研究テーマまたは主な職歴: 殺虫剤の探索・開発研究, 作用機構研究

趣味: 読書

稲垣勝裕 (いながき かつひろ)

生年月日: 1968年8月25日

最終学歴: 近畿大学大学院農学研究科農芸化学専攻前期課程修了

研究テーマまたは主な職歴: 農薬・医薬品の毒性評価

趣味: バスケットボール