

**Fig. 1** Prediction of toxicokinetics using PBPK model

## PBPKモデルを活用したエピリフェナシル肝otoxic性のヒト安全性評価

### 1. エピリフェナシルとその肝otoxic性

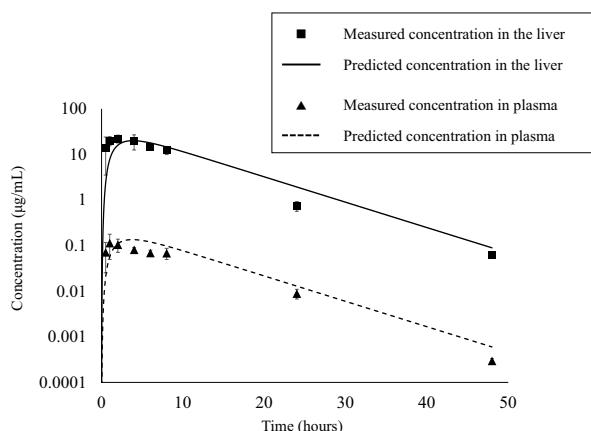
エピリフェナシル (Epyrifenacil, 開発コード: S-3100) は、植物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (Protoporphyrinogen Oxidase, PPO) 阻害を殺草機序とする。哺乳動物もPPOをヘム生合成酵素の一つとして体内に有しており、これが阻害された場合には主な毒性として肝臓等で細胞障害が生じることが報告されている<sup>9), 10)</sup>。マウスを用いた毒性試験では、エピリフェナシルは哺乳動物体内で、カルボン酸 (carboxylic acid) を有する代謝物S-3100-CAへと迅速に代謝され、これが毒性本体として肝臓に取り込まれた後に、毒性標的分子であるPPOを阻害し肝otoxic性を引き起こすことが確認されている<sup>11), 12)</sup>。

そこで当社では、エピリフェナシルの安全性評価における種差の不確実性を評価するため、TDおよびTKの両面について多くの知見を蓄積してきた。TDについては、ターゲットであるPPOに対する $in vitro$ 阻害試験を実施し、マウスPPOがヒトPPOよりもS-3100-CAによって14倍低濃度から阻害されることを確認した<sup>11)</sup>。またTKについては、初代肝細胞を用いた $in vitro$ 取り込み試験を実施し、マウス肝細胞におけるS-3100-CAの取り込み速度がヒト肝細胞よりも13倍大きいことを確認した<sup>11)</sup>。この結果は、 $in vivo$ においてもマウスの肝臓がヒトの肝臓よりもS-3100-CAに高濃度で曝露されるであろうことを示唆するものであるが、 $in vivo$ におけるTKをより正確に評価するには、吸収、分布、代謝および排泄等を考慮した全身レベルでの動態評価が必要である。そこで、ヒトがエピリフェナシルを経口

摂取した後に代謝物として体内に生じたS-3100-CAの肝臓中濃度推移をPBPKモデルで予測することによって、ヒト-マウス間のTKに関する種差についてより精緻に評価することを試みた<sup>7), 8)</sup>。

### 2. PBPKモデルの構築および実験動物におけるTK予測精度の検証

経口投与されたエピリフェナシルは、消化管から体内に吸収された後、血中および肝臓中で速やかにS-3100-CAへと代謝される。生じたS-3100-CAは、トランスポーターと呼ばれる輸送タンパク質を介して肝細胞内へ能動的に取り込まれ、主に肝代謝および胆汁中排泄により体内から消失する<sup>12)</sup>。エピリフェナシルの毒性本体が代謝物のS-3100-CAであることに加えて、トランスポーターによる肝臓への能動輸送および胆汁中排泄といった複雑な体内動態をS-3100-CAが示すことから、エピリフェナシルおよびS-3100-CAの両方の体内動態をモデルに反映するために、一般的な農薬のPBPKモデルよりも構造が特殊で規模の大きいモデルを構築する必要があった。また、構築したPBPKモデルを用いてマウスにおける体内動態をシミュレーションするために、種々のマウスのパラメータを取得する必要があったが、エピリフェナシルの体内動態において、トランスポーターによる肝臓へのS-3100-CAの取り込み速度およびS-3100-CAの胆汁中排泄速度の2点は特に重要なパラメータであったことから、これらのパラメータは静脈投与試験により実測した。取得したパラメータをモデルに入力し、エピリフェナシルをマウスに経口投与した際のS-3100-CAの肝臓および血漿中濃度推移について予測値と実測値を比較した



**Fig. 2** S-3100-CA concentration (measured and predicted) in plasma and the liver from mice orally dosed with epyrifenacil at 3 mg/kg

ところ、肝臓で予測値は実測値の0.9倍、血漿で予測値は実測値の1.2倍であり、構築したモデルの優れた予測精度を確認できた (Fig. 2) <sup>7)</sup>。

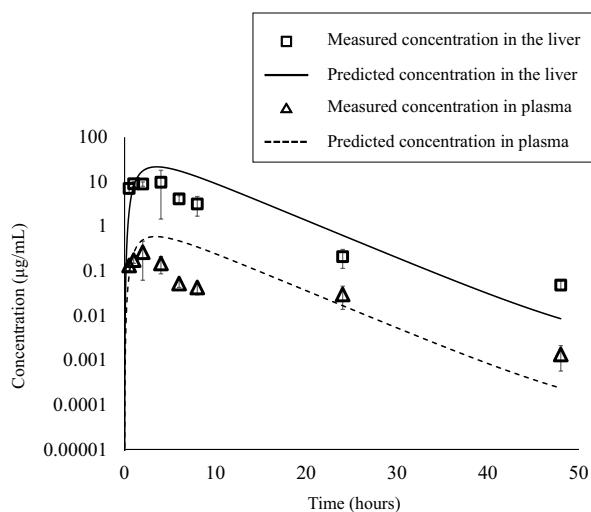
### 3. ヒト体内動態パラメータの取得

マウスのTK予測では、入力が必要なパラメータのうち、エピリフェナシルの動態に関して特に重要な2点のパラメータ、すなわち肝臓への取り込み速度および胆汁中排泄速度は動物実験を実施することで精緻な値を実測することが可能であった。一方で、ヒトのパラメータは *in vivo* 試験で実測することはできないため、代替となる *in vitro* 試験でこれらのパラメータを取得する必要がある。しかし、これら主要パラメータのうち肝臓への取り込み速度については、*in vitro* 試験における測定値と生体内における実際の値の間に数十～数百倍の大きな隔たりがあることが一般的に知られており、*in vitro* 試験で測定したパラメータ値をそのままモデルに入力することはできない<sup>13)</sup>。また胆汁中排泄速度については、*in vivo* 試験の代替となる試験系がいくつか研究されてはいるものの、実用性および堅牢性が十分に確認された *in vitro* 技術としてまだ確立されていない<sup>13), 14)</sup>。そこで、1点目のヒトにおける肝臓への取り込み速度については、ヒトの初代肝細胞を用いた取り込み試験で測定した *in vitro* 値を *in vitro* - *in vivo* extrapolation (IVIVE) 法により *in vivo* 値へ補正することで算出した。具体的には、まずマウスの初代肝細胞を用いた取り込み試験で測定した *in vitro* 値と静脈投与試験により実測した *in vivo* 値の間の乖離を定量的に評価し、次にこの評価結果に基づいてヒトの *in vitro* 値

を *in vivo* 値へと補正した<sup>7), 13)</sup>。また、2点目の胆汁中排泄速度についてはヒト肝キメラマウスを用いて取得した。ヒト肝キメラマウスとは、肝臓の大部分がヒト肝細胞へと置換されたマウスであり、化学物質のヒト肝臓における代謝・動態や毒性を予測するためのモデル動物として有用性が認められ、活用例が増えつつある<sup>15), 16)</sup>。このヒト肝キメラマウスにエピリフェナシルを投与し、得られたデータから胆汁中排泄速度を算出してモデルに入力した<sup>7)</sup>。

### 4. ヒト体内動態パラメータ取得法の検証

PBPKモデルに入力したヒト体内動態パラメータの取得法の妥当性は、医薬品であれば予測結果をヒトTKの実測値と比較し予測精度を確認することで検証できる。しかし、ヒトTKの実測データが存在しない農薬の場合には、この手順で予測精度を確認できない。パラメータ取得法の検証は、PBPKモデルによる予測結果の信頼性を保証する上で極めて重要である反面、上記の理由により、実際に効果的な検証を施した農薬のPBPK研究はこれまで報告がなかった。本研究では、エピリフェナシルのヒトTK予測に際し、肝細胞を用いたIVIVE法およびキメラ動物を用いた手法によりキーとなるパラメータを取得した。この手法の予測精度を評価するには、同様のアプローチを実験動物に適用し得た予測結果を実測値と比較し精度を確認することが有用であり、すなわち検証のためには予測対象とする動物種の肝細胞および対象動物の肝臓を有するキメラマウスが必要となる。検討の結果、肝細胞は多くの実験動物種にて入手可能であり、またモデル動物として肝臓の大部分がラット肝細胞へと置換されたマウス（ラット肝キメラマウス）が入手可能であった。そこで本研究では、ラットを対象動物として精度を検証した。具体的には、ラットにおける肝臓への取り込み速度についてはヒトと同様、ラットの初代肝細胞を用いた取り込み試験で測定した *in vitro* 値を IVIVE 法により *in vivo* 値へ補正する形で算出した。また、肝臓からの胆汁中排泄速度についても、ヒト肝キメラマウスを用いた手法と同様にラット肝キメラマウスを用いて実測し、この値をラット胆汁排泄速度としてモデルに入力した。結果、エピリフェナシルをラットに経口投与した際の S-3100-CA の肝臓および血漿中濃度推移を予測し、検証用に別途実測したラットTKと予測したラットTKを比較したところ、良好な予測精度（肝臓、血漿ともに、予測値は実測値の2.2倍）を確認した (Fig. 3)。このように、ラットを用いた動物試験でパラメータを取得することなくラットTKを予測でき

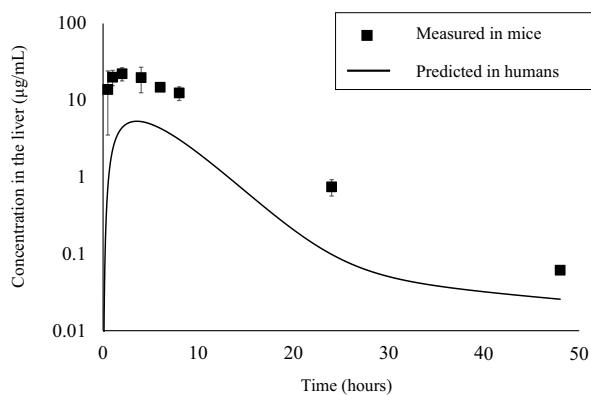


**Fig. 3** S-3100-CA concentration (measured and predicted) in plasma and the liver from rats orally dosed with epyrifenacil at 3 mg/kg

したことから、同様の手法を適用して確立した前述のヒトTK予測モデルの正確性が裏付けられた<sup>8)</sup>。

## 5. ヒトの肝臓におけるTK予測およびマウスの実測値との比較

エピリフェナシルの毒性本体はS-3100-CAであり、毒性の標的臓器が肝臓であることから、本剤をヒトが経口摂取後に体内で生じたS-3100-CAの肝臓中濃度推移を予測し、マウスにおける実測値と比較した。その結果、ヒトとマウスのTKに明確な量的種差（マウスはヒトの4倍）が存在することが確認できた（Fig. 4）<sup>7)</sup>。PBPKモデルによって予測されたTKの種差および先行実施したin vitro試験によって示されたTD、TKの種差<sup>11)</sup>



**Fig. 4** Measured S-3100-CA concentration in the liver from mice and predicted S-3100-CA concentration in the liver from humans orally dosed with epyrifenacil at 3 mg/kg

を含めた総合的な考察により、エピリフェナシルのヒトに対する安全性は安全係数の適用により十分保守的に担保されると結論付けた。

## おわりに

エピリフェナシルの毒性本体であるS-3100-CAについて、ヒトにおけるTKをPBPKモデルによって予測し、本剤のヒトでの安全性を評価した。本技術は、優れた予測精度と信頼性が保証された堅固なPBPKモデルによりヒトでの安全性評価するための新しい戦略を提示するものである。エピリフェナシルに限らず幅広い化学物質に適用可能な技術であることから、今後もさまざまな化学物質に対して本技術を活用し、科学的に妥当性の高いアプローチによりヒト安全性評価を実施したいと考える。

## 引用文献

- 1) A. R. Boobis *et al.*, Crit. Rev. Toxicol., 36(10), 781 (2006).
- 2) A. R. Boobis *et al.*, Crit. Rev. Toxicol., 38(2), 87 (2008).
- 3) O. V. Martin *et al.*, Environ. Health, 12, 53 (2013).
- 4) A. G. Renwick, Food Addit. Contam., 10(3), 275 (1993).
- 5) Y. Tan *et al.*, Regul. Toxicol. Pharmacol., 115, 104691 (2020).
- 6) Syngenta White Paper, EPA Scientific Advisory Panel., (2017).
- 7) K. Hirasawa *et al.*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 439, 115912 (2022).
- 8) K. Hirasawa *et al.*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 465, 116439 (2023).
- 9) European Food Safety Authority, EFSA J., 13 (2015).
- 10) United States Environmental Protection Agency, Memorandum from USEPA, July (2003).
- 11) K. Matsunaga *et al.*, J. Pestic. Sci., 46(4), 333 (2021).
- 12) K. Sakurai *et al.*, J. Agric Food Chem., 69(44), 13190 (2021).
- 13) T. Watanabe *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 328 (2), 652 (2009).
- 14) H. Fukuda *et al.*, Drug Metab. Dispos., 36(7), 1275 (2008).
- 15) S. Sanoh and S. Ohta, Biopharm. Drug Dispos., 35 (2), 71 (2014).
- 16) T. Yamada, J. Toxicol. Pathol., 34(4), 283 (2021).