

農薬の安全性評価における 生理学的速度論（PBPK）モデルの活用

住友化学株式会社

生物環境科学研究所

平澤 康太*
安部 潤



はじめに

農薬は、登録および販売に先立ってヒトに対する安全性を担保する必要があるが、医薬品と異なり臨床試験による安全性評価が認められていない。そのため農薬では、実験動物を用いた試験にて取得された無毒性用量に対し、化学物質の種類によらず一義的に設定された安全係数を適用してヒトにおける安全用量を算出している。具体的には、実験動物で認められた毒性に関して、毒性の原因となる化学物質への曝露量（^{ばくろ}Toxicokinetics、TK）および感受性（Toxicodynamics、TD）の種差および個体差をカバーする100倍の安全係数を設定し、無毒性用量をこの安全係数で割ることで安全用量を算出している^{1), 2)}。一方で、この方法ではリスクを過大または過小評価する可能性が否めないとして問題視する意見もあり^{3), 4)}、科学的なアプローチによりこの係数の妥当性を担保することが望まれている。上記安全係数のうちTKの種差に関しては、ヒトの方が実験動物より高曝露となる可能性を考慮して3倍程度の係数が設定されているが、その妥当性を担保し、TKの種差を科学的に考察する手法として、近年、生理学的速度論（Physiologically-Based Pharmacokinetics、PBPK）モデルによって農薬のヒトにおける体内動態をシミュレーションして評価する試みが注目されている⁵⁾。しかし、農薬の安全性評価にPBPKモデルを活用することには依然技術的な課題がある。一般に、化学物質のヒトにおけるTKをPBPKモデルで予測するためには、体内動態に関する膨大な数のパラメータを取得しモデルに入力しなければならない。医薬品ではヒトに投与して得た臨床データからこれらのパラメータを取得可能であるのに対し、農薬ではこれができないため、ヒト*in vivo*試験の代替として、ヒト由来の試料を用いた*in vitro*試験法を開発・実施し、TK予測に必要な全てのパラメータを精緻に取得することが求められる。さらに、モデル

から最終的に出力されたヒトTKデータの精度等を臨床データとの比較で確認することができないため、予測結果の信頼性について十分に検証することが困難という問題もある^{5), 6)}。本稿では、PBPKモデルによるTK予測技術の概要について紹介するとともに、安全性評価で実用に耐え得るヒトPBPKモデルの新しい開発・検証戦略を提示する。そして、一般的な農薬よりも複雑な体内動態を示すためモデリングの難易度が高い新規除草剤ラピディシル（一般名：エピリフェナシル。以下、本稿では一般名を使用する。）を例に、本剤のTKに関する種差の不確実性に対してPBPKモデルにより安全係数の妥当性を検証した事例について報告する^{7), 8)}。

PBPKモデルによるTK予測技術

PBPKモデルとは、化学物質の生体内での動きを定量的かつ動的に表した数学モデルである。より具体的には、コンパートメントと呼ばれる区画を各臓器および血液に対して定義し、臓器重量および血流速度等の生理学的パラメータや、吸収、分布、代謝および排泄等の生体内で起こるさまざまな反応の速度に関するパラメータ（以下、体内動態パラメータ）等を入力することによって、コンピューター上に生物個体の仮想モデルを再構築したものである。本技術を用いることで、化学物質投与後の各臓器または血液における濃度推移、すなわち体内動態のシミュレーションが可能となる（Fig. 1）。

本技術を活用したTKの種差評価は、以下の3ステップで実施することが一般的である。初めに、（1）実験動物のデータを基に、予測対象の化学物質が示す体内動態を適切に反映したPBPKモデルを構築し、TKの予測精度を実験動物で確認する。次に、（2）ヒト体内動態をシミュレーションするために入力が必要なパラメータを取得し、実験動物のパラメータをヒトのパラメータに置き換える形でモデルに入力する。そして、（3）ヒトにおけるTKを予測し、実験動物におけるTKの実測値と比較することで、ヒト-実験動物間のTKに関する種差を評価する^{7), 8)}。

*現所属：バイオサイエンス研究所

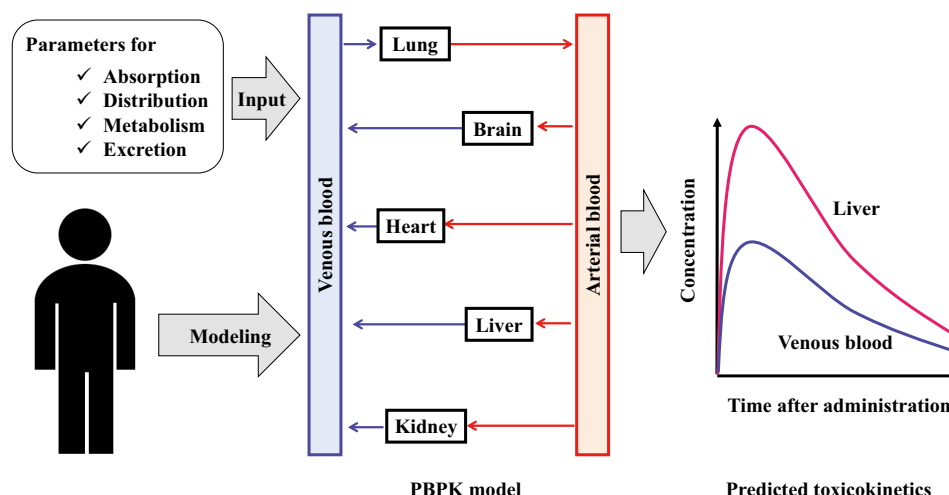


Fig. 1 Prediction of toxicokinetics using PBPK model

PBPKモデルを活用したエピリフェナシル肝毒性のヒト安全性評価

1. エピリフェナシルとその肝毒性

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^{9), 10)}。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を阻害し肝毒性を引き起こすことが確認されている^{11), 12)}。

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¹¹⁾。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¹¹⁾。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^{7), 8)}。

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¹²⁾。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る。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るが、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

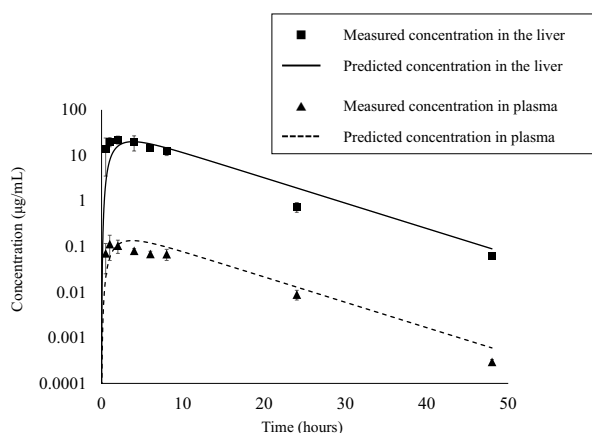


Fig. 2 S-3100-CA concentration (measured and predicted) in plasma and the liver from mice orally dosed with epyrifenacil at 3 mg/kg

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) ⁷⁾。

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¹³⁾。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* 技術としていまだ確立されていない^{13), 14)}。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^{7), 13)}。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^{15), 16)}。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⁷⁾。

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

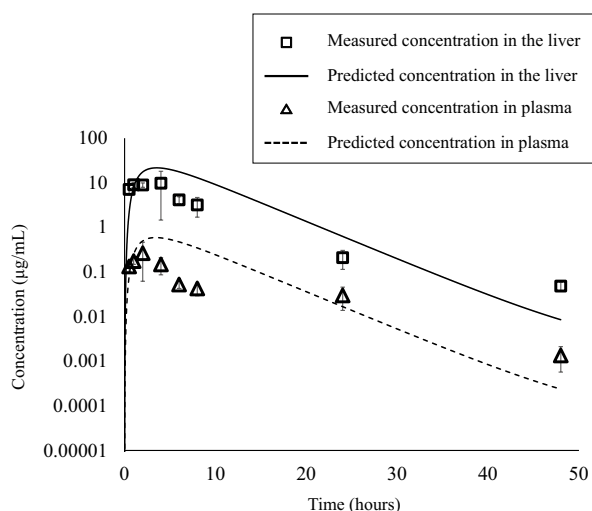


Fig. 3 S-3100-CA concentration (measured and predicted) in plasma and the liver from rats orally dosed with epyrifenacil at 3 mg/kg

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⁸⁾。

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）⁷⁾。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¹¹⁾

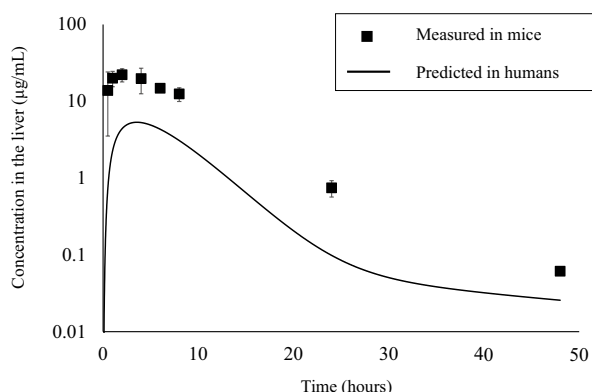


Fig. 4 Measured S-3100-CA concentration in the liver from mice and predicted S-3100-CA concentration in the liver from humans orally dosed with epyrifenacil at 3 mg/kg

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).