

薬物動態学的アプローチによるヒトにおける農薬・化学品の
安全性評価手法に関する研究

2017

安部 潤

目次	ページ
緒言	1
第1章 実験動物における動態および毒性メカニズム精緻評価の重要性	4
第1-1節 メトフルトリンのラットにおける代謝	5
第1-2節 プロフルトリンのラットにおける代謝	33
第1-3節 考察	46
第2章 毒性原因物質の動態および活性種差の精査に基づくヒト安全性評価	53
第2-1節 フルミオキサジンの妊娠ラットおよび妊娠ウサギにおける代謝	56
第2-2節 フルミオキサジン・代謝物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ 阻害活性の比較	66
第2-3節 フルミオキサジンの初代肝細胞を用いたプロトポルフィリノーゲン オキシダーゼ阻害能の評価	70
第2-4節 考察	74
第3章 ヒト肝キメラマウスを用いた動態の解明によるヒト安全性評価	77
第3-1節 ヒト肝・ラット肝キメラマウスによるプロシミドン動態の評価	80
第3-2節 考察	93
結論	95
引用論文	98
謝辞	110
学位論文の基礎となる学術雑誌公表論文のリスト	111

緒言

農業における殺虫剤、殺菌剤、除草剤等の農薬は、作物の安定した収穫に寄与する重要な要素の一つとして挙げられ、今後來たるべき世界的な人口増加およびそれに起因する食糧難の懸念に対抗する手段の一つとしてその必要性が認識されている。また、一般用途（非農業用途）の殺虫剤については、日本をはじめとする先進国では人間の生活環境に侵入する害虫を駆除し生活水準を維持することに用いられると共に、特に発展途上国においては、蚊等が媒介するマラリアやジカ熱等の感染およびその拡大を防除する目的で使用されており、人間の生命を脅威から守る手段の一つとして重要な位置を占めている^[1,2]。

これら農薬や家庭用殺虫剤等（以下、農化学品）については医薬品と同様、化合物を登録し販売する上で、ヒトに対する安全性を担保することが求められる。医薬品についてはヒトを対象に使用する目的で開発され、その安全性をヒトにおいて理解することが極めて重要であるため、ヒト臨床試験が必須となる。一方、農化学品についてもヒトでの安全性評価は重要であるが、病虫害の駆除等が目的で、ヒトに投与することを目的として開発されていないため、最終的にヒト臨床試験によりその体内動態や毒性の有無を確認することが認められていない点で大きく医薬品と異なる。従って農化学品のヒトにおける安全性は、齧歯類を用いた試験にて得られた無毒性用量を安全係数で除する事でのみ評価されてきた。即ち、動物種が異なることに対する係数として 10 倍、さらに個体差を考慮するための係数として 10 倍を設定し、これらを乗じて得られた 100 倍の安全係数で、ラット等の実験動物を用いた毒性試験にて得られた無毒性用量を割ることによりヒトにおける安全用量を求め、これを化合物のリスク評価に使用してきた。このうち動物種の差による 10 倍の係数には、化合物の動態・暴露（toxicokinetics、TK）および感受性・反応性（toxicodynamics、TD）の種差が含まれており、化合物によって一概ではなく、そのため現状のように一義的に 100 倍の安全係数でヒトでのリスクを評価することについてはその倍率が過大あるいは過小である可能性について問題視する意見がある^[3,4]。また農化学品のヒトへの暴露を考えた場合、医薬品が主に当人の意思で摂取されるのとは異なり、その摂取形態は大部分が作物や住環境から意図せず摂取する受動的なものであり、かつ長期間にわたり継続して摂取し続ける可能性があることから、ヒトにおける毒性発現の可能性をより正確に把握する必要性について関心が高まりつつある。特

に変異原性、発癌性、発生毒性（Carcinogenicity、Mutagenicity、Reproductive toxicity、略してCMR）等の毒性や内分泌攪乱物質（Endocrine Disruptor、略してED）について、齧歯類の毒性試験の結果よりヒトでのリスクを適切に評価する正確で定量的な手法がなかったため、登録に際し極めて厳しい足切り基準が一律に課されるに至っている^[5-7]。即ち農化学品に関して、齧歯類で認められた毒性よりヒトにおける安全性を科学的な側面から適切に評価する手法の開発が、以前に増して強く望まれる状況となっている。

一方、化合物の感受性の種差を評価し、またヒトにおける動態を予測することに関しては、以前より盛んに研究が進められてきている。化合物に対する感受性に関しては、実験動物およびヒト由来の試料を用いた *in vitro* 実験により比較することが古くから行われてきた。また化合物の暴露量に関しては近年、生理学的薬物速度論（physiologically based pharmacokinetic、PBPK）モデル技術による *in silico* 評価について、その精度が向上し用途が拡大しつつある。これらの技術は、医薬品開発においても積極的に活用されつつある。例えば *in vitro* 試験におけるヒト特有代謝物の検出やそれら代謝物の毒性ポテンシャル評価は前臨床段階にて開発候補化合物を選抜する上で重要な位置を占めている。また PBPK による化合物・代謝物の動態評価については、臨床試験実施の前後でデータの実取得が難しい一部の特殊な病態を持つ患者における動態や、酵素・トランスポーターの個人差・人種差等を考慮した動態の予測に用いられている^[8,9]。一方、農化学品の開発・登録において、同様にヒトでの動態や毒性ポテンシャルを考慮して安全性を評価しようとする試みは、以前よりメカニズム検討の一部として実施されていた。しかし、例えば PBPK に関して、種を超えたラットからヒト動態の予測は精度の面で信頼性が不十分であり、また最終的にヒトでデータを取得して評価結果を検証することが不可能であったため、それら手法により得たデータ・評価を十分な精度を持つものとして化合物の登録に際して実際に使用することは難しく、従って実験動物のデータに安全係数を乗じて評価する従来法のみを重視する状況から脱することが不可能であった。ただし近年になり、上記のような *in vitro* 技術および *in silico* 技術についてその精度は急速に高まり、あるいは得られる知見の重要性についても十分に認知されてきており、農化学品の規制当局および登録者（企業）側の双方において、ヒトでの動態や毒性ポテンシャルを考慮した安全性評価の重要性が認識されつつある。即ち、農化学品による毒性発現に関し、その活性本体を明らかにしその動態・毒性ポテンシャルの種差を評価することや、ヒト

での動態を定量的に評価することでヒトにおける毒性発現のリスクをより精緻に見積もり、臨床データを取得できない農化用品においてこれら技術を代替として評価に用いることの有用性に注目が集まりつつある。

そこで本研究では、ヒトで *in vivo* のデータが取得できない農化用品について、各種 *in vitro* 試験や PBPK 等をはじめとする様々な技術を駆使し、動態・代謝や毒性発現機構に基づいたヒト安全性評価手法を開発することを計画した。まず第 1 章では、世界的に汎用されるピレスロイド系殺虫剤について代謝および動態を詳細に検討し、実験動物を用いた代謝試験のヒト安全性を評価する上での位置付けおよび重要性について考察した。続いて第 2 章では、毒性に種差を持つ化合物について、標的組織にて毒性の原因となる物質を特定し、その動態および活性の種差を明らかにすることでヒトにおける安全性を評価する方法を確立した。具体的には、催奇形性に種差がある農業用除草剤フルミオキサジンのラット・ウサギにおける動態の種差の有無や標的組織中の代謝物濃度等を明らかにし、また *in vitro* 試験により化合物に対する感受性の種差を解明した上で、これらの情報を組み合わせてヒトにおける毒性リスクについて考察した。さらに第 3 章において、*in vitro* 試験等では解明困難である原因物質の排泄経路の種差によって原因物質の暴露量に差が生じ、最終的に毒性に種差が生じる化合物について、ヒト肝キメラマウスを用いてヒトでの動態を明らかにすることでヒト安全性を評価する方法を確立した。具体的には、農業用殺菌剤であるプロシミドンについて、ラット肝キメラマウスおよびヒト肝キメラマウスを用いた実験により、毒性発現の要因となる原因物質の動態の種差を解明しヒトにおけるリスクを評価した。最後に、以上の結果を踏まえ、臨床試験によるヒトデータの取得が不可能である農化用品について、動物実験における動態・毒性ポテンシャルのデータから、ヒトでの安全性を評価する手法について総括した。

第1章 実験動物における動態および毒性メカニズム精緻評価の重要性

従来、農化品の開発において、齧歯類を用いた代謝試験は哺乳動物における化合物の動態を広く代表するものとしての意味合いが強かった。今回、ヒトにおける農化品の安全性評価手法を研究するのに際し、世界的に汎用されるピレスロイド系殺虫剤を例として、ヒト安全性評価における齧歯類などの実験動物を用いた代謝試験の位置付けや重要性について改めて考察した。

ピレスロイド系殺虫剤は、殺虫活性を持つ天然成分である菊酸あるいはその誘導体（以下、酸側と略す）が持つカルボキシル基と、活性や物理化学的性質を変化させるための各種構造（以下、アルコール側と略す）が持つ水酸基をエステル結合させた構造を特徴とする合成殺虫剤である。これまでに、広く病害虫に対し効果を持つ類縁化合物が数多く合成・開発されており、現在でも農業用・家庭用の両用途にて殺虫剤として非常に幅広く用いられている^[10,11]。これらピレスロイド系殺虫剤についてはその幅広い用途のために実環境で人間に暴露が想定されるケースも多く、そのため哺乳動物における毒性や代謝・動態について、これまでに非常に多くの報告がなされている^[10-15]。

メトフルトリン (2,3,5,6-tetrafluoro-4-(methoxymethyl)benzyl 2,2-dimethyl-3-(1-propenyl)-cyclopropanecarboxylate) およびプロフルトリン (2,3,5,6-tetrafluoro-4-methylbenzyl 2,2-dimethyl-3-(1-propenyl)-cyclopropanecarboxylate) は、いずれも住友化学（株）により開発された殺虫剤で、これまでに数多く開発されているピレスロイド系化合物のなかでも新規かつ特有の構造を有する (**Figure 1-1**)。メトフルトリンはスミワン[®]あるいはエミネンス[®]の商標名で扱われ、室温で高い蒸散性を有し、かつ蚊に対する高い殺虫活性を有することから、スプレー式・ファン式・吊り下げ式等による蚊の防除剤に用いられている^[16]。一方、プロフルトリンはフェアリテール[®]の商標名で扱われ、室温での高い蒸散性に加えて優れた殺虫活性・防虫効果を有することから、衣服用の防虫剤として上市されている^[17]。

これら2つの化合物はいずれも共通する酸側の構造として2,2-dimethyl-3-(1-propenyl)-cyclopropanoic acid を有する。この構造は2つの不斉炭素と1つのE/Z配座を含み、従って計8種類の異性体を持つが、メトフルトリンについてはこのうちシクロプロパン環の1位および3位の炭素がいずれもR配置である1*R-trans*異性体のZ体およびE体

(Figure 1-1) が特に高い殺虫活性を持つことが明らかとなっており、そのためこれら 2 異性体がメトフルトリンを含む最終製品に主に含まれる。以下、これら 2 異性体を、1*R*/*trans*/*Z* 体および 1*R*/*trans*/*E* 体の頭文字を取って、それぞれメトフルトリンの RTZ 体および RTE 体と称す。一方プロフルトリンについてはその殺虫活性の差等により RTZ 体が最終製品における主要成分として使用されている。

メトフルトリンおよびプロフルトリンは、その優れた殺虫活性と物理化学的性質によりいずれも市場に流通しているが、一方でこれらの持つ構造は数あるピレスロイド系化合物のなかでも特有であり、従ってその動態・代謝は過去明らかにされていなかった。今回、齧歯類（ラット）を用いた代謝試験により、これら 2 化合物のラットにおける動態・代謝を精緻に検討した。また、過去にピレスロイド系殺虫剤全般に関して得られているヒト動態・安全性評価に関する知見を踏まえ、農化品のヒトにおける安全性を評価する上で実験動物を用いた代謝・動態あるいは毒性試験の位置付けについて改めて考察した。

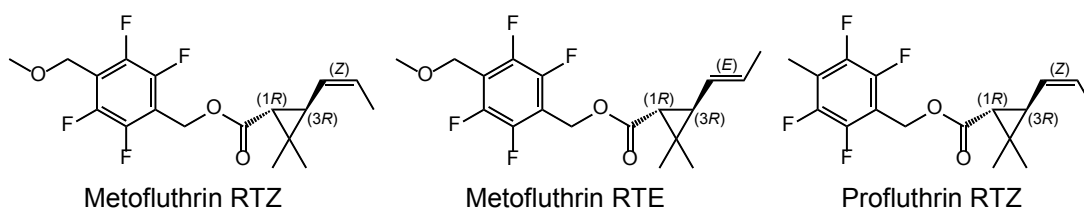


Figure 1-1 Structures of metofluthrin RTZ, metofluthrin RTE and profluthrin RTZ.

第 1-1 節 メトフルトリンのラットにおける代謝

1.1.1 実験方法

被験物質およびその他実験材料

以下、アルコール側代謝物、酸側代謝物およびエステル保持代謝物を、M (Metabolite) にそれぞれ Al (Alcohol)、Ac (Acid) および E (Esterified) を付与した MAI、MAc および ME を接頭辞とする略称で記載した。被験物質として使用した非標識体のメトフルトリン RTZ、メトフルトリン RTE、MAI および ¹⁴C 標識した [carbonyl-¹⁴C]メトフルトリン RTZ (以下、[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ、比放射能：6.50 MBq/mg)、[methoxymethylbenzyl-¹⁴C]メトフルトリン RTZ (以下、[alcohol-¹⁴C]メトフルトリン

RTZ、比放射能：6.19 MBq/mg)、[carbonyl-¹⁴C]メトフルトリン RTE (以下、[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTE、比放射能：6.50 MBq/mg)、[methoxymethylbenzyl- α -¹⁴C]MAI1 (以下、[¹⁴C]MAI1、比放射能 10.45 MBq/mg) はいずれも住友化学 (株) にて合成した^[18-20] (Figure 1-2)。また分析用の代謝物標品として、非標識体の ME1(Z)、ME17(Z)、ME17(E)、ME18(Z)、ME18(E)および ¹⁴C 標識した MAc1(Z)、MAc1(E)、MAc2(E)、MAc12(Z)、MAc12(E)、MAI1 を同様に住友化学 (株) にて合成した。その他の代謝物 (ME1(E)、ME2(Z)、ME3、ME4、ME5、ME6、ME7、ME8、ME9、ME10、ME11(Z)、ME12、ME13、MAc2(Z)、MAc3(Z)、MAc3(E)、MAc4、MAc5、MAc6、MAc7、MAc8、MAc9、MAc10、MAc11、MAc13(Z)、MAc14(Z)、MAc15、MAc16、MAc17、MAc18、MAI2、MAI3、MAI4、MAI5、MAI6、MAI7) については、メトフルトリンおよびその代謝物を投与したラットの糞および尿から単離・精製し構造同定したものを分析用の標品として使用した。これら代謝物の構造は 1.1.2 にて後述する。その他の試薬類は特級以上のグレードのものを使用した。

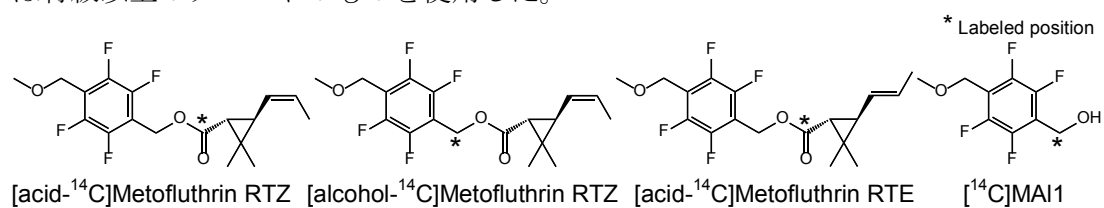


Figure 1-2 Structures of the labeled materials.

クロマトグラフィー条件

代謝物等の分離、精製、および純度確認のため、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析および薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析を実施した。ラット糞および尿中からの代謝物の単離に際しては、報告済みの HPLC および TLC 条件^[21]より、複数の分析を順次行った。ラット糞、尿、胆汁および組織抽出液中の代謝物に関しては、シリカゲルをコートしたガラスプレート (20 x 20 cm、0.25 mm シリカゲル厚、Merck、Darmstadt、ドイツ) を用い、移動層としては (A) 酢酸エチル/水/ギ酸=35:2:2 (v/v/v) または (B) トルエン/酢酸エチル/ギ酸=50:50:1 (v/v/v) による 1 次元 TLC、あるいはこれらを組み合わせた 2 次元 TLC により定量および同定を行った。

代謝物のスペクトル分析

単離・精製した代謝物は、核磁気共鳴 (NMR) 分析および質量分析 (MS) により

構造を同定した。ME16、MAc8、MAc12 および MAc14(Z)を除く全ての代謝物で、Varian UNITY 400 plus 高分解能 FT-NMR スペクトロメーター (Varian, Inc., CA, アメリカ合衆国) を用いて ^1H スペクトルおよび HMBC スペクトルデータを取得した。上記4代謝物については同機器にて ^1H スペクトルのみ取得した。ESI-MS、APCI-MS、EI-MS および FD-MS スペクトルはそれぞれ LCQ DECA XP (Thermo Fisher Scientific, MA, アメリカ合衆国)、M-1000 型質量分析計 (日立製作所、東京、日本)、JMS-AX505W (日本電子、東京、日本) および JMS-SX102A (日本電子) を用いて取得した。

動物の飼育

以下、全ての動物実験は、実施施設の動物実験運営委員会等による許可を受けた手順により、該当する法律・ガイドライン等に準拠して実施した。Crj:CD(SD)ラットを日本チャールスリバー (神奈川、日本) より購入し、室温 21~26°C、相対湿度 40~70%、換気サイクル 10 回/時間以上、12 時間明期/12 時間暗期の照明サイクルの環境下で飼育した。飼育期間中、固形飼料および飲料水を自由摂取とした。実験施設への搬入後、6~8 日間の検疫期間を設け、1 日 1 回以上その健康状態を確認し、体重増加や一般症状に異常の認められなかった個体をランダムに付番して実験に使用した。

投与液の調製および投与

まず始めに、メトフルトリンを投与した際の糞および尿中代謝物の構造を決定するための検討を実施した。[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTZ (18.2 または 30.3 kBq/mg)、[alcohol- ^{14}C]メトフルトリン RTZ (26.3 kBq/mg)、[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTE (16.5 kBq/mg) および [^{14}C]MAI1 (22.5 kBq/mg) をそれぞれコーンオイルに溶解し投与液を調製した。

続いて、メトフルトリンを投与した際の吸収・排泄、血中濃度推移、組織分布等を確認するための検討を実施した。低用量; 1 mg/kg および高用量; 20 mg/kg を設定し、それぞれ約 5.55 MBq/kg となるように[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTZ、[alcohol- ^{14}C]メトフルトリン RTZ および[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTE を非標識体で希釈した後、5 mL/kg となるようコーンオイルに溶解し投与した。

代謝物の単離・精製および同定

6 週齢の雌雄ラットに[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ、[alcohol-¹⁴C]メトフルトリン RTZ および[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTE を各群 4~21 匹にて 30~50 mg/kg/日 (6~7 mg/mL コーンオイル) の用量で 5~14 日間連続投与した。また、[¹⁴C]MAII を 9 匹の雄ラットに 250 mg/kg/日 (50 mg/mL コーンオイル) の用量で 3 日間連続投与した。投与後のラットは代謝ケージ (Metabolica、スギヤマゲン、東京、日本) にて飼育し、投与期間中および投与終了 2 日後までの糞および尿を回収した。飼育期間中、適宜ケージ内を蒸留水で洗浄し、洗液は回収した尿に含めた。尿は凍結乾燥器 FD-81 (東京理化器械、東京、日本) にて凍結乾燥させた後、メタノールで抽出した。糞は 2 倍量のメタノールを加えて Polytron (Kinematica AG、Luzern、スイス) にてホモジナイズした。以降の HPLC・TLC による単離・精製および NMR・MS による同定は既報^[21]の通り実施した。

糞および尿中 ¹⁴C 排泄性試験

7 週齢の雌雄ラット (4 匹/群) に[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ、[alcohol-¹⁴C]メトフルトリン RTZ および[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTE を 1 mg/kg および 20 mg/kg にて単回経口投与した後、代謝ケージに収容し、糞、尿および呼気を回収した。尿は投与 6、24、48、72、120 および 168 時間後、糞は投与 24、48、72、120 および 168 時間後に回収した。呼気はメトキシエタノール/エタノールアミン溶液 (1:1、v/v) を含むアルカリトラップにより、投与 24、48 および 72 時間後に回収した。尿回収の度にケージ内を水で洗浄し含まれる放射能を尿への排泄に含めた。

胆汁中 ¹⁴C 排泄性試験

7 週齢の雌雄ラット (4 匹/群) に麻酔下で胆管カニューレーションを施し、麻酔から覚醒した約 30 分後に[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ および[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTE を 1 mg/kg にて単回経口投与した。ラットはボールマンケージ (KN-326 type 3 PAT、夏目製作所、東京、日本) に収容し、糞を投与 24、48 および 72 時間後、尿および胆汁を投与 6、24、48 および 72 時間後に回収した。最終サンプリング後に解剖し、消化管内容物およびその他の残屍体を別々に回収した。上記サンプルはそれぞれ全重を測定した後、その一部を放射能測定に供した。

血中 ^{14}C 濃度推移試験

7週齢の雌雄ラット（3匹/群）に[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTZ、[alcohol- ^{14}C]メトフルトリン RTZ および[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTE を 1 mg/kg および 20 mg/kg にて単回経口投与し、0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72、96、120、144 および 168 時間後に全血を尾静脈より約 0.1 mL ずつ 2 連で採取して放射能を測定した。最大血中濃度 (C_{\max} 、 μg メトフルトリン等量/g 血液) および最大血中濃度時間 (T_{\max} 、h) は実測値を採用した。投与無限時間後までの血中濃度曲線下面積 (AUC、 μg メトフルトリン等量 \cdot h/g 血液) は、実測値による台形法から求めた $\text{AUC}_{0-168\text{h}}$ に、外挿により求めた $\text{AUC}_{168\text{h}-\infty}$ を加算することにより算出した。なお、 $\text{AUC}_{168\text{h}-\infty}$ および消失半減期 ($T_{1/2}$ 、h) は消失相 (β 相) に一相性消失速度式 ($\ln 2/\alpha$) を近似外挿した際の傾き (α) から求めた。

^{14}C 組織分布試験

7週齢の雌雄ラット（3匹または4匹/群）に[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTZ、[alcohol- ^{14}C]メトフルトリン RTZ および[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTE を 1 mg/kg および 20 mg/kg にて単回経口投与した。投与 2、6、12、48 および 168 時間後に腹部大動脈より全採血し、全血約 0.2 mL を秤取した後、3,000 rpm、4°C にて 10 分間遠心分離 (CR5B2、日立工機、東京、日本) し、血漿および血球を得た。全採血後にラットを解剖し、大脳、小脳、眼球、顎下腺、甲状腺、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、膵臓、精巣、卵巣、子宮、脊髄、骨髄、骨、毛、皮膚、筋肉、白色脂肪、褐色脂肪、胃、小腸、盲腸、大腸および消化管内容物を採取した。全血、血漿、血球、脊髄、骨髄、骨、毛、皮膚、筋肉、白色脂肪および褐色脂肪については一部を秤取し、上記を除く組織についてはそれぞれ全重を測定後、全量もしくは一部を秤取して、放射能を測定した。残屍体は 3 M 水酸化カリウム水溶液に溶解した後に一部を採取して放射能を測定した。

放射能測定

尿、ケージ洗浄液、胆汁、呼気トラップ液、TLC 掻き取り後のシリカゲルおよびサンプル抽出液はシンチレーションカクテル (Emulsifier Scintillator Plus、Hionic Fluor または Ultima Gold、PerkinElmer、MA、アメリカ合衆国) に添加した後、液体シンチ

レーションカウンター (Tri-Carb[®] 2700TR または 2500TR、PerkinElmer) により放射能を測定した。残屍体溶解液は一部を秤取りし過酸化水素により脱色した後、同様に処理した。全血、血漿、血球、組織および各種サンプルの抽出残渣はサンプルオキシダイザー (308 型または 387 型、PerkinElmer) により燃焼し、¹⁴CO₂ を Carbosorb (PerkinElmer) および Permafluor E⁺ (PerkinElmer) にトラップ後、液体シンチレーションカウンターにより放射能を測定した。糞は 2 倍量の水を加えてホモジナイズ後、同様に処理した。なお、サンプルオキシダイザーでの処理に際しては、既知量の ¹⁴C を燃焼し、その回収率によって各サンプルの放射能を補正した。TLC 上の非標識体のスポットは、UV ライト照射下にて検出し、その位置をマークした。放射性スポットは、イメージングプレート (富士フィルム、東京、日本) に転写し、バイオイメージングアナライザーBAS シリーズ (富士フィルム) にて可視化した後に、ソフトウェア上で解析するか、あるいは TLC プレートのスポットに該当する部分のシリカゲルを掻き取って含まれる放射能を定量した。

代謝物分析

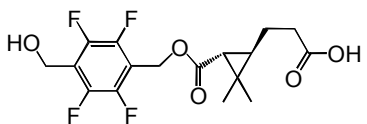
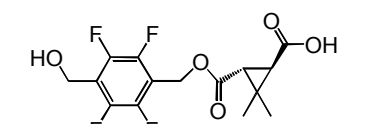
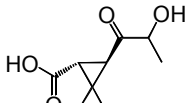
¹⁴C 排泄性試験においては、排泄された総放射能の 95%以上が排泄された投与 48 時間後までの糞、尿および胆汁を分析対象とした。¹⁴C 組織分布試験においては、最終時点 (投与 168 時間後) の血漿、肝臓および腎臓を分析対象とした。尿および胆汁は直接 TLC プレートに塗布し分析した。血漿は 3 倍量のメタノールで抽出し濃縮した後に TLC 分析に供した。肝臓および腎臓は、5 倍量の水を加えてホモジナイズ後、3 倍量のメタノールで 3 回、さらにメタノール/水 (1:1、v/v) で 3 回抽出したものを濃縮し分析した。抱合体である可能性が疑われた高極性代謝物については、単離したものを反応用緩衝液として 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) またはサルファターゼ活性を抑えるために 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、β-グルクロニダーゼ (ウシ肝臓由来、Type B-1、Sigma Aldrich、MO、アメリカ合衆国) を添加して 37°C にて約 16 時間反応させた。なお、一部サンプルには β-グルクロニダーゼ阻害剤として D-saccharic acid 1,4-lactone を添加した。これらサンプルを TLC 分析に供した。

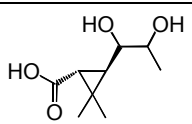
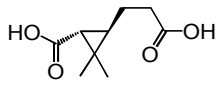
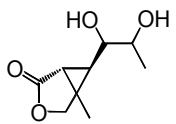
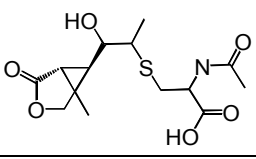
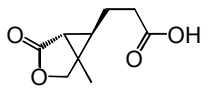
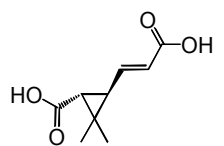
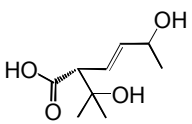
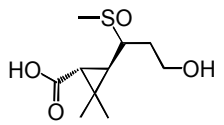
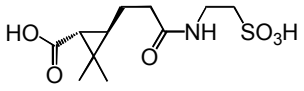
1.1.2 結果

代謝物の単離・精製および同定

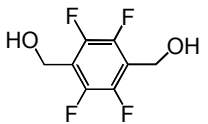
メトフルトリンを投与したラットの糞および尿から代謝物を単離・精製し、スペクトル分析 (NMR および MS) により構造を同定した^[21]。なお、表中の反応記号はそれぞれ以下の反応を表す。(1)エステル結合開裂、(2)酸側末端メチル基の酸化、(3)カルボキシル基のグルクロン酸またはタウリン抱合、(4) *E* 体カルボン酸への異性化、(5)二重結合のエポキシ化、(6)エポキシの水和によるジオール体形成、(7)グルタチオン抱合およびさらなる代謝によるメルカプツール酸抱合、(8)二重結合の還元、(9)二重結合へのグルタチオン付加を経由するメチルスルフィニル化合物形成、(10)酸化を経由する二重結合の開裂、(11)シクロプロパン環の開裂、(12)シクロプロパン環 2 位メチル基の酸化、(13)ラクトン環形成、(14)メトキシ基の脱メチル化、(15)アルコール側の水酸基の酸化、(16)アルコール側水酸基のグルクロン酸抱合体形成またはグルタチオン抱合を経由するメルカプツール酸抱合、(17)グルタチオン抱合体の更なる代謝によるメチルチオ化合物、メチルスルフィニル化合物およびメチルスルホニル化合物の形成。また、表中の推定主要生成経路の列には、該当する代謝物が生成すると推定される主要な経路を「前駆物質となる代謝物」+「経由する代謝反応」(複数の反応を経由する場合には併記) の形で記載した。

メトフルトリン RTZ およびメトフルトリン RTE に共通し、かつ両異性体の共通構造であるアルコール側由来の代謝物を除く 14 種類の代謝物を同定した。これらの略称、構造および推定主要生成経路を下表に示す。

化合物略称	構造	推定主要生成経路
ME3		ME1(Z/E)・ME14(E)+反応(2)・(8) ME16+反応(14) ME18(Z/E)+反応(8)・(14)
ME7		ME4・ME5+反応(10)
MAc4		MAc5・MAc6・MAc7+酸化

化合物略称	構造	推定主要生成経路
MAc5, MAc6, MAc7 (立体異性体)		MAc1(Z/E)+反応(5)・(6) ME4・ME5・ME8・ME9+反応(1)
MAc8		MAc2(Z/E)+反応(2)・(8) MAc12(Z/E)+反応(8) ME3+反応(1)
MAc9		MAc3(Z/E)+反応(5)・(6)・(13) ME6・ME10+反応(1)・(13) MAc5・MAc6・MAc7+反応(12)・(13)
MAc10		MAc1(Z/E)+反応(5)・(7)・(12)・(13)
MAc11		MAc8+反応(12)・(13) MAc19+反応(13)
MAc12(E)		MAc2(Z)+反応(2)・(4) MAc2(E)+反応(2) MA18(E)+反応(1)
MAc15		MAc1(Z/E)+反応(5)・(11)
MAc17		MAc2(Z/E)+反応(5)・(7)・(17) MAc16+酸化
MAc18		MAc8+反応(3)

[alcohol-¹⁴C]メトフルトリン RTZ 投与群より、両異性体の共通構造であるアルコール側由来の代謝物 6 種を同定した。これらの略称、構造および推定主要生成経路を下表に示す。

化合物略称	構造	推定主要生成経路
MA12		MA11+反応(14) ME1(Z)等のエステル保持代謝物+反応(1)

化合物略称	構造	推定主要生成経路
MA13		MA11 + 反応(15)
MA14		MA12 + 反応(15) MA13 + 反応(14) ME8・ME9・ME10 + 反応(1)
MA15		MA11 + 反応(16)
MA16		MA12 + 反応(16) MA15 + 反応(14)
MA17		MA16 + 反応(17)

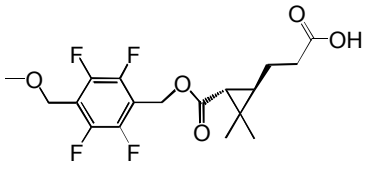
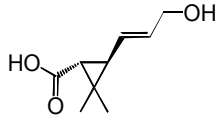
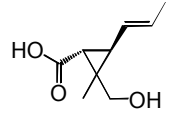
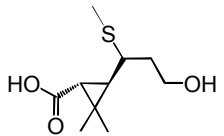
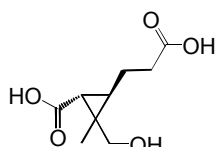
メトフルトリン RTZ 投与群で同定され、メトフルトリン RTE 投与群では検出されなかった 13 種類の代謝物を同定した。これらの略称、構造および推定主要生成経路を下表に示す。

化合物略称	構造	推定主要生成経路
ME2(Z)		ME1(Z)・ME11(Z) + 反応(12)
ME4, ME5 (立体異性体)		ME1(Z) + 反応(5)・(6)
ME6		ME4・ME5 + 反応(12)
ME8, ME9 (立体異性体)		ME4・ME5 + 反応(15)

化合物略称	構造	推定主要生成経路
ME10		ME6 + 反応(15) ME8・ME9 + 反応(12)
ME11(Z)		ME1(Z) + 反応(12)
ME12		ME4・ME5 + 反応(16)・(17)
MAc2(Z)		MAc1(Z) + 反応(2) ME17(Z) + 反応(1)
MAc3(Z)		MAc1(Z) + 反応(12) ME11(Z) + 反応(1)
MAc13(Z)		MAc1(Z) + 反応(3)
MAc14(Z)		MAc2(Z) + 反応(3) MAc13(Z) + 反応(2)

メトフルトリン RTE 投与群で同定され、メトフルトリン RTZ 投与群では検出されなかった 9 種類の代謝物を同定した。これらの略称、構造および推定主要生成経路を下表に示す。

化合物略称	構造	推定主要生成経路
ME1(E)		メトフルトリン RTE + 反応(14)
ME13, ME15 (立体異性体)		ME14(E) + 二重結合の水和 ME18(Z/E) + 反応(8)
ME14(E)		ME1(E) + 反応(2) ME17(E) + 反応(14)

化合物略称	構造	推定主要生成経路
ME16		ME18(E)+反応(8)
MAc2(E)		MAc1(E)+反応(2) ME14(E)・ME17(E)+反応(1)
MAc3(E)		MAc1(E)+反応(12)
MAc16		MAc2(E)+反応(5)・(7)・(17)
MAc19		MAc8+反応(12)

糞、尿および胆汁中への ^{14}C 排泄

[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTZ、[alcohol- ^{14}C]メトフルトリン RTZ および[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTE を 1 mg/kg および 20 mg/kg にてラットへ投与後 168 時間までの糞、尿および呼気中への ^{14}C の排泄割合を **Figure 1-3** に示す。いずれの投与群においても体外への ^{14}C の排泄は非常に速やかであった。呼気中への ^{14}C の排泄は投与 48 時間以内で最大 1.4% であり、72 時間後にかけて平衡に達したことから、以降分析は行わなかった。尿中への排泄率は、[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTZ 投与群でおよそ 40~60%、[alcohol- ^{14}C]メトフルトリン RTZ 投与群でおよそ 60~70%、[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTE 投与群でおよそ 30~50% であり、アルコール側標識体を投与した群で若干尿中排泄率が高い傾向がみられた。また、ほぼ全ての群において高用量より低用量で尿中排泄率が高い傾向がみられたが、その差はわずかであった。いずれの被験物質の投与群においても排泄割合の雌雄差は認められなかった。

[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTZ および[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTE を胆管カニュレーションラットへ 1 mg/kg にて投与後 72 時間までの糞、尿および胆汁中への ^{14}C の排

排泄割合を **Figure 1-4** に示す。胆汁への排泄割合はおよそ 30~60%程度であった。無処置ラットと比較して尿中への排泄率は低く、また糞中への排泄は同程度か若干低い傾向がみられた。尿および胆汁への排泄率は雄より雌で若干高かった。

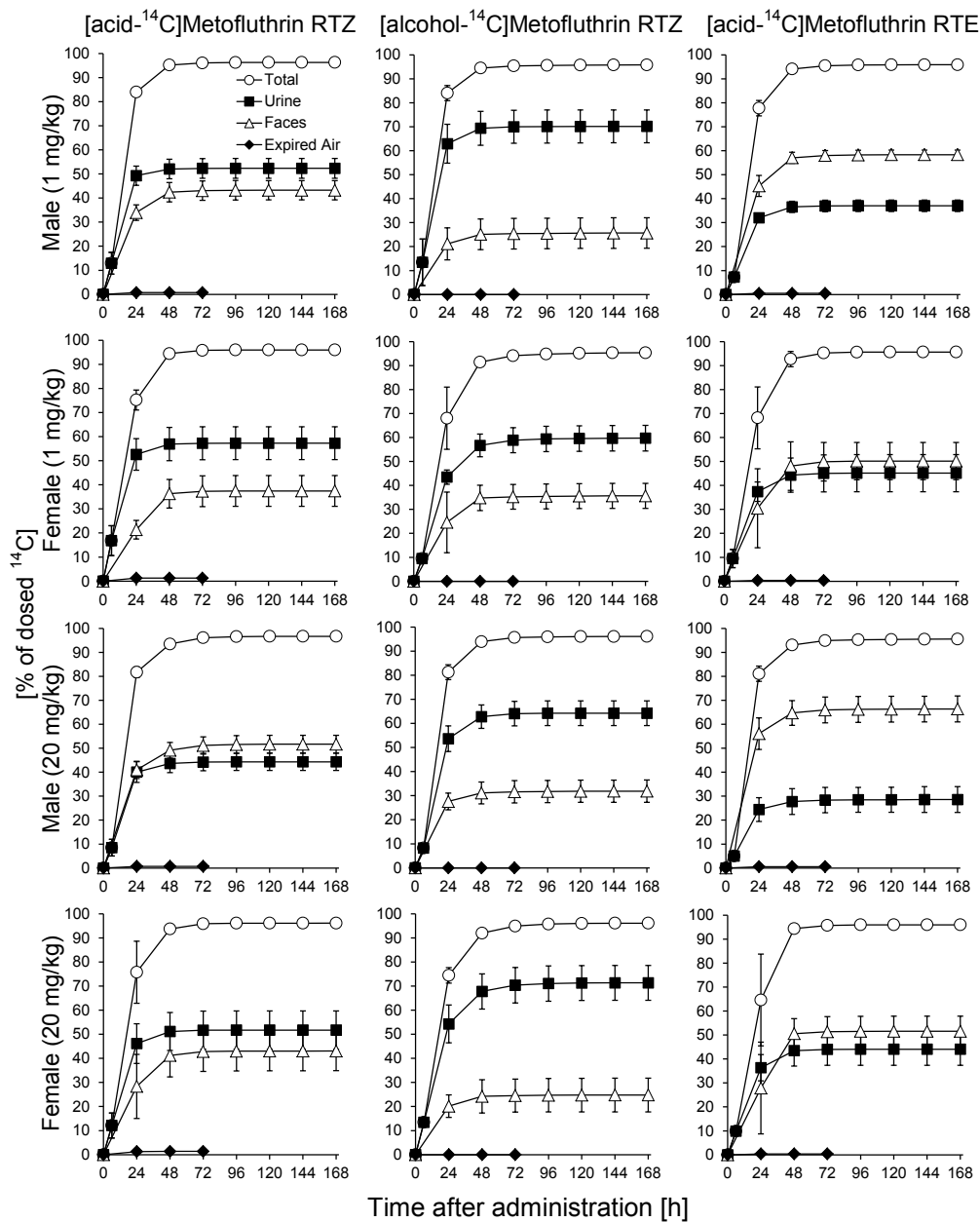


Figure 1-3 Cumulative ^{14}C -excretion after single oral administration of metofluthrin isomers to rats.

Points and bars are mean values and standard deviations for data from 4 rats.

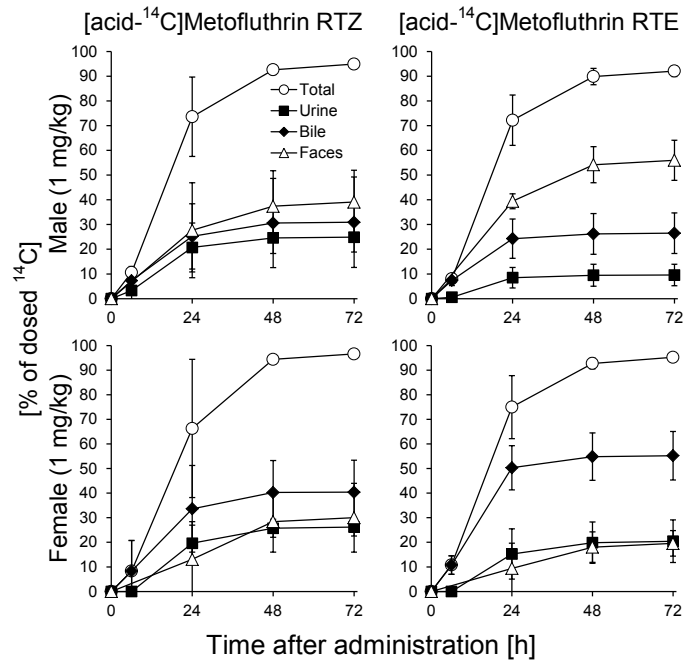


Figure 1-4 Cumulative ^{14}C -excretion after single oral administration of metofluthrin isomers at the dose of 1 mg/kg to bile duct-cannulated rats. Points and bars are mean values and standard deviations for data from 4 rats.

血中 ^{14}C 濃度推移

[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTZ、[alcohol- ^{14}C]メトフルトリン RTZ および [acid- ^{14}C]メトフルトリン RTE を 1 mg/kg および 20 mg/kg で投与した際の血中 ^{14}C 濃度推移を **Figure 1-5**、動態パラメータを **Table 1-1** に示す。投与した全ての群で血中 ^{14}C 濃度は投与後速やかに上昇し、投与 3~8 時間後に T_{\max} を迎えた後、半減期 2~7 日にてやや緩徐に消失した。高用量群の C_{\max} および AUC は低用量と比較してそれぞれ 13~21 倍および 17~26 倍であった。血中 ^{14}C 濃度推移に顕著な性差は認められなかった。

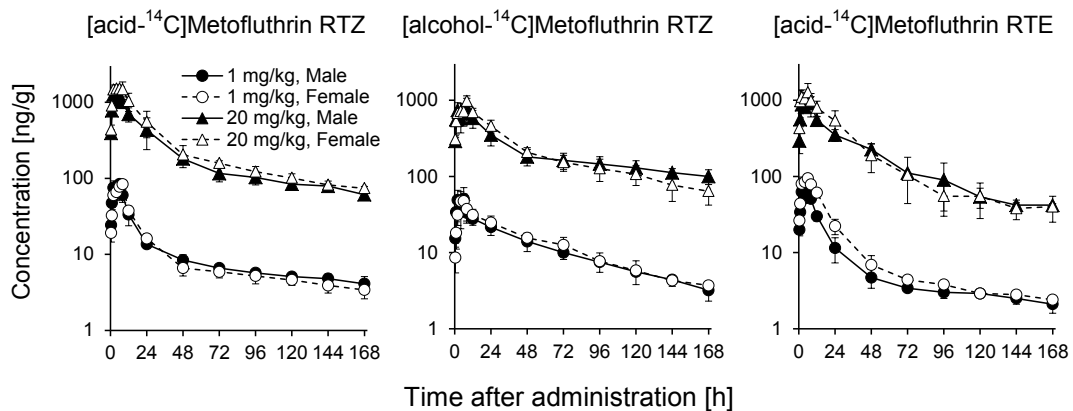


Figure 1-5 Time-concentration curves of ^{14}C in blood after single oral administration of metofluthrin isomers to rats at 1 and 20 mg/kg. Points and bars are mean values and standard deviations for data from 3 rats.

Table 1-1 Toxicokinetic parameters of ^{14}C in blood after single oral administration of metofluthrin isomers to male and female rats at 1 and 20 mg/kg.

Parameters	[acid- ^{14}C]Metofluthrin RTZ				[alcohol- ^{14}C]Metofluthrin RTZ				[acid- ^{14}C]Metofluthrin RTE			
	1 mg/kg		20 mg/kg		1 mg/kg		20 mg/kg		1 mg/kg		20 mg/kg	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
T_{\max} [h]	4.7	6.7	3.3	4.7	4.7	6.0	4.0	8.0	4.7	4.7	6.7	5.3
C_{\max} [ng eq./g blood]	87.2	84.6	1300	1750	51.7	49.0	789	976	63.6	95.3	1030	1290
			(15)	(21)			(15)	(20)			(16)	(13)
$T_{1/2}$ [h]	127	138	86.9	87.2	51.7	49.8	163	71.1	120	91.2	53.4	65.6
AUC [$\mu\text{g eq.} \cdot \text{h/g blood}$]	2.70	2.62	45.2	58	2.27	2.48	59.9	44.9	1.75	2.50	35.0	41.6
			(17)	(22)			(26)	(18)			(20)	(17)

Values represent the means of 3 rats. M: Male, F: Female.

Values in parentheses present the fold increase of the corresponding low dose values.

^{14}C 組織分布

[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTZ、[alcohol- ^{14}C]メトフルトリン RTZ および [acid- ^{14}C]メトフルトリン RTE を 1 mg/kg および 20 mg/kg で投与した際の組織中 ^{14}C 濃度のうち、血漿中よりも顕著に高い濃度を示した組織を抜粋し **Figure 1-6** に示す。血漿中からの ^{14}C の消失は投与後 2 日目以降に [acid- ^{14}C]メトフルトリン RTZ および [alcohol- ^{14}C]メトフルトリン RTZ 投与群で減速した一方、[acid- ^{14}C]メトフルトリン RTE 投与群では 48 時間以降で定量下限以下に達しており、メトフルトリン RTE で RTZ よりも消失が速やかであった。ほぼ全てのサンプリング時点で、肝臓、腎臓、毛および白色脂肪の ^{14}C は血漿より高い値を示したが、その消失速度は血漿と同程度であった。投与 168 時間後の時点で組織を含む残屍体に残った ^{14}C は投与量の 0.2% 以下であり、消失速度に標識位置の差、性差および用量差は認められなかった。

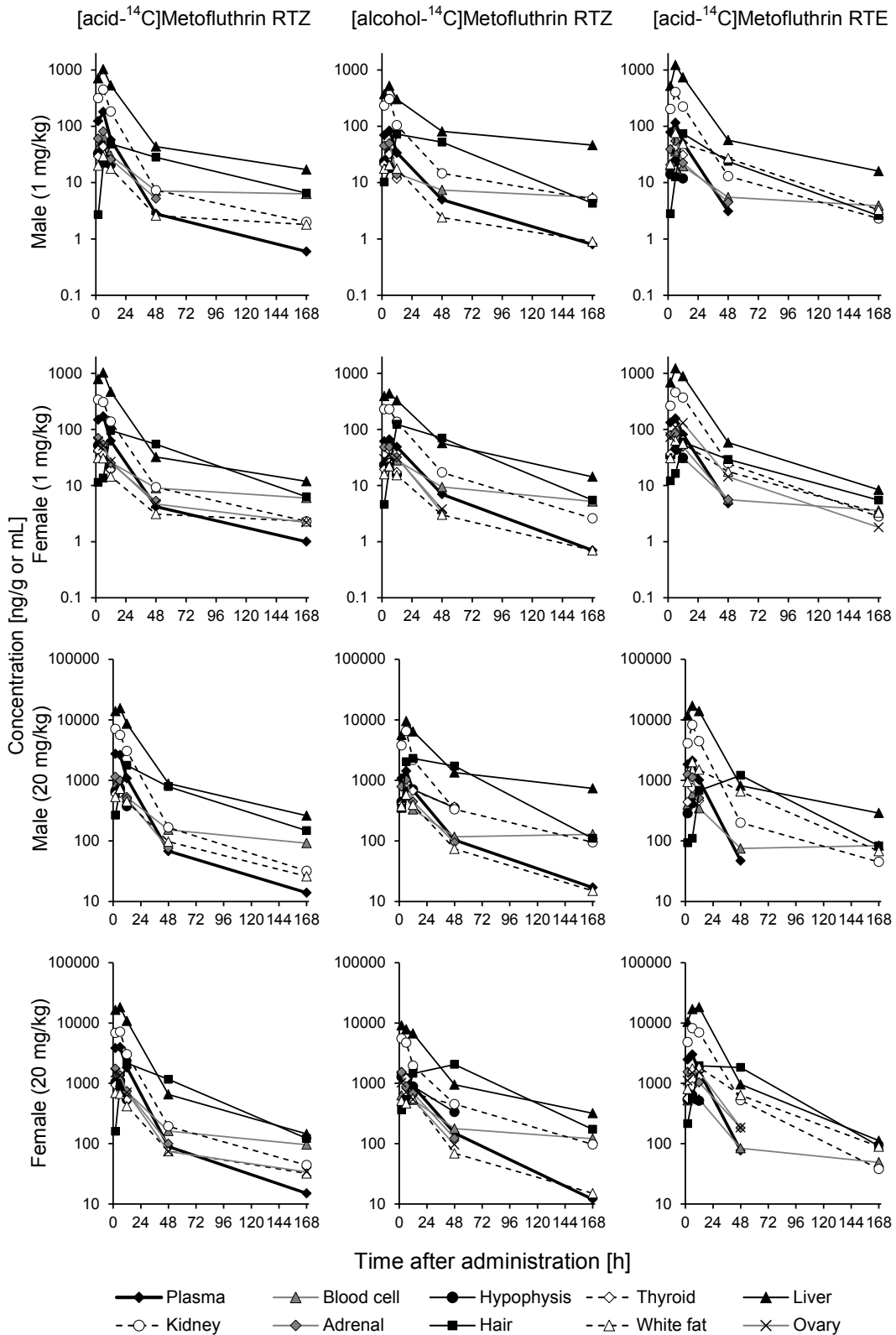


Figure 1-6 Time-concentration curves of ^{14}C in tissues and organs after single oral administration of metofluthrin isomers to rats.

Points are mean values for data from 3 or 4 rats.

糞、尿および胆汁中代謝物分析

[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ、[alcohol-¹⁴C]メトフルトリン RTZ および[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTE を 1 mg/kg および 20 mg/kg で無処置ラットに投与後 48 時間までの糞および尿中代謝物を **Table 1-2** に示す。また糞および尿を分析した代表的な TLC クロマトグラムを **Figure 1-7** に示す。1 mg/kg 投与群において、未変化体のメトフルトリンが糞中に 13~24%存在し、その量は 20 mg/kg 投与群にて若干増加する傾向がみられた。[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ 投与群において、ほぼ全ての代謝物がエステル開裂体であり、少なくとも 3 つの代謝物 (MAc5、MAc14(Z)および MAc18) が主要代謝物として投与量の 5%以上存在した。[alcohol-¹⁴C]メトフルトリン RTZ の投与群においても同様に、糞および尿中に 5%を超えるエステル結合を維持した代謝物はなく、主要な代謝物は MAI2 および MAI1 のグルクロン酸抱合体ならびに MAI4 であった。[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTE 投与群においては、MAc18、MAc17、MAc11 および MAc12(E)/MAc2(E)の両方または片方が主に検出された。(MAc12(E)および MAc2(E)の TLC 上での分離が不十分であったため、合計値で考察。以下、スラッシュで区切った代謝物については同様。) 一方で、メトフルトリン RTZ を投与した群で主に認められた MAc5 および MAc14(Z)の生成量は、メトフルトリン RTE を投与した群では僅かであった。

[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ および[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTE を 1 mg/kg で胆管カニューレションラットに投与後 72 時間までの糞、尿および胆汁中代謝物を **Table 1-3** に示す。メトフルトリン RTZ および RTE の両方の投与群において、糞中に排泄された ¹⁴C のほぼ全量が未変化体のメトフルトリンであり、無処置ラットの糞でみられた代謝物はほとんど検出されなかった。MAc9、MAc13(Z)、MAc14(Z)および MAc18 がメトフルトリン RTZ 投与群の尿および胆汁中に主に認められ、一方で MAc18 のみがメトフルトリン RTE 投与群にて主要な代謝物であった。

Table 1-2 Amounts of metabolites in urine and feces within 48 hours after single oral administration of metofluthrin isomers to rats.

(a) [acid- ¹⁴ C]Metofluthrin RTZ												
[% of the dosed ¹⁴ C]	1 mg/kg						20 mg/kg					
	Male			Female			Male			Female		
	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total
Metofluthrin RTZ	---	14.6	14.6	---	13.3	13.3	---	20.9	20.9	---	16.6	16.6
ME1(Z)	---	0.2	0.2	---	0.2	0.2	---	0.3	0.3	---	0.4	0.4
ME18(Z)	---	0.1	0.1	---	0.2	0.2	---	0.2	0.2	---	0.3	0.3
MAc1(Z)	0.1	---	0.1	0.2	---	0.2	0.2	---	0.2	0.3	---	0.3
ME2(Z),ME3,ME7,ME11(Z)	0.9	0.4	1.3	0.9	0.1	1.0	1.1	1.0	2.1	1.1	0.2	1.4
MAc2(Z),MAc12(Z),MAc12(E)	7.8	0.3	8.2	9.3	0.8	10.1	7.8	0.6	8.5	10.2	0.6	10.7
MAc3(Z),MAc4,MAc8,MAc11	2.2	3.3	5.5	1.4	1.9	3.3	1.7	2.8	4.5	1.5	1.5	3.0
ME4,ME5	1.1	1.2	2.3	1.3	0.7	2.0	1.0	2.5	3.6	0.8	0.9	1.7
ME6	1.3	0.2	1.5	0.6	0.2	0.8	0.9	0.5	1.4	0.5	0.2	0.7
ME8,ME9	3.6	0.6	4.1	0.4	0.2	0.6	2.3	0.8	3.1	0.3	0.2	0.5
MAc6,MAc7,MAc15,ME12	3.7	5.4	9.1	7.1	3.5	10.6	2.8	3.2	6.0	3.9	2.2	6.1
MAc5	5.6	3.8	9.4	6.7	3.3	10.0	4.2	2.2	6.4	6.3	1.7	8.1
ME10	0.7	---	0.7	0.3	---	0.3	0.5	---	0.5	0.2	---	0.2
MAc9	5.4	---	5.4	4.8	---	4.8	4.0	---	4.0	3.7	---	3.7
MAc13(Z)	1.6	1.1	2.7	3.6	0.5	4.1	2.0	1.0	3.0	3.8	0.6	4.4
MAc10	2.5	---	2.5	1.6	---	1.6	1.7	---	1.7	1.2	---	1.2
MAc17	---	1.6	1.6	---	1.1	1.1	---	1.3	1.3	---	1.1	1.1
MAc14(Z)	7.3	1.3	8.5	9.5	1.8	11.4	7.0	1.4	8.4	9.1	4.0	13.1
MAc18	4.6	3.0	7.6	3.7	3.0	6.7	3.8	4.9	8.7	3.4	4.8	8.1
Others ^a	3.7	2.5	6.3	5.5	2.1	7.6	2.6	2.6	5.2	4.8	2.7	7.5
Unextractable	---	3.0	3.0	---	3.4	3.4	---	2.8	2.8	---	3.4	3.4
Total	52.1	42.5	94.6	56.9	36.4	93.3	43.6	49.2	92.8	51.1	41.3	92.4

(b) [alcohol- ¹⁴ C]Metofluthrin RTZ												
[% of the dosed ¹⁴ C]	1 mg/kg						20 mg/kg					
	Male			Female			Male			Female		
	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total
Metofluthrin RTZ	---	14.4	14.4	---	24.0	24.0	---	16.8	16.8	---	10.4	10.4
ME1(Z)	---	0.2	0.2	---	0.3	0.3	---	0.3	0.3	---	0.3	0.3
MA11	0.2	0.4	0.6	0.2	0.6	0.8	0.1	0.5	0.6	0.2	0.4	0.7
MA12	0.8	1.2	2.0	0.7	0.7	1.4	1.4	1.8	3.2	1.7	0.6	2.3
ME2(Z),ME3,ME7,ME11(Z)	0.9	---	0.9	0.6	---	0.6	0.7	---	0.7	0.2	---	0.2
MA17	0.3	---	0.3	0.3	---	0.3	0.3	---	0.3	0.3	---	0.3
MA3	0.6	0.2	0.9	0.1	0.2	0.3	0.7	0.4	1.0	0.4	0.2	0.6
MA4	10.5	0.5	11.0	6.4	0.2	6.6	8.9	1.2	10.1	10.6	0.2	10.7
ME4,ME5	0.2	0.3	0.5	0.1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.5	0.7	0.4	1.1
ME6	1.2	0.3	1.5	0.7	0.0	0.7	1.2	0.5	1.7	1.0	0.1	1.1
MA15,MA16	1.6	---	1.6	5.1	---	5.1	1.3	---	1.3	4.6	---	4.6
ME8,ME9	3.1	0.7	3.8	0.3	0.2	0.5	2.5	0.9	3.4	0.5	0.6	1.1
ME12	0.5	---	0.5	1.1	---	1.1	0.6	---	0.6	2.1	---	2.1
ME10	0.5	---	0.5	0.9	---	0.9	0.6	---	0.6	1.0	---	1.0
MA11-glucuronide	15.8	---	15.8	14.1	---	14.1	16.9	---	16.9	16.1	---	16.1
MA12-glucuronide	35.2	---	35.2	23.8	---	23.8	25.5	---	25.5	26.2	---	26.2
Others ^a	2.5	4.2	6.7	2.2	5.7	7.9	1.9	5.5	7.4	2.4	8.7	11.0
Unextractable	---	2.8	2.8	---	2.6	2.6	---	3.1	3.1	---	2.4	2.4
Total	73.9	25.2	99.1	56.7	34.8	91.5	62.8	31.1	93.9	67.8	24.3	92.1

(c) [acid- ¹⁴ C]Metofluthrin RTE												
[% of the dosed ¹⁴ C]	1 mg/kg						20 mg/kg					
	Male			Female			Male			Female		
	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total
Metofluthrin RTE	---	20.4	20.4	---	17.7	17.7	---	28.9	28.9	---	18.9	18.9
ME1(E)	---	0.4	0.4	---	0.5	0.5	---	0.6	0.6	---	0.6	0.6
MAc1(E)	0.0	0.2	0.2	0.0	0.2	0.2	0.0	0.2	0.2	0.0	0.3	0.3
ME18(E)	---	0.4	0.4	---	0.3	0.3	---	0.3	0.3	---	0.3	0.3
ME3,ME7	1.7	0.9	2.6	1.8	0.4	2.2	2.0	1.1	3.1	1.8	0.4	2.2
MAc12(E),MAc2(E)	6.1	2.2	8.2	6.9	0.9	7.8	4.0	1.3	5.3	6.5	0.8	7.3
MAc4,MAc8	0.7	1.0	1.6	0.5	0.8	1.4	0.5	0.8	1.3	0.5	0.8	1.3
MAc11	4.9	0.7	5.6	5.4	0.5	5.8	2.9	0.2	3.2	4.1	0.5	4.6
ME13	0.9	0.7	1.5	0.4	0.4	0.8	0.8	0.8	1.5	0.3	0.3	0.6
MAc3(E)	1.2	---	1.2	2.8	---	2.8	0.9	---	0.9	2.9	---	2.9
MAc6,MAc7,MAc15	0.7	0.4	1.1	0.5	0.1	0.5	0.7	0.3	1.0	0.5	0.1	0.7
MAc5	0.8	0.4	1.2	0.8	0.3	1.1	0.5	0.3	0.8	0.7	0.2	0.9
MAc9	1.4	---	1.4	2.4	---	2.4	1.1	---	1.1	2.3	---	2.3
MAc10	2.0	---	2.0	3.3	---	3.3	1.2	---	1.2	3.4	---	3.4
MAc17	3.7	4.2	7.9	3.1	3.5	6.6	2.6	3.4	6.0	3.3	4.0	7.4
MAc18	5.5	13.4	18.9	6.8	12.1	18.9	4.7	14.1	18.8	7.9	11.2	19.1
Others ^a	7.1	7.9	15.0	9.6	4.8	14.4	5.9	8.0	13.9	9.2	6.3	15.5
Unextractable	---	4.1	4.1	---	5.7	5.7	---	4.4	4.4	---	6.0	6.0
Total	36.7	57.1	93.8	44.3	48.1	92.4	27.8	64.7	92.5	43.5	50.6	94.1

Data represents the mean value of 4 rats.

---: Not determined. a: Sum of minor unknown metabolites. Shaded values: the sum amount in a eluted fraction was >5%.

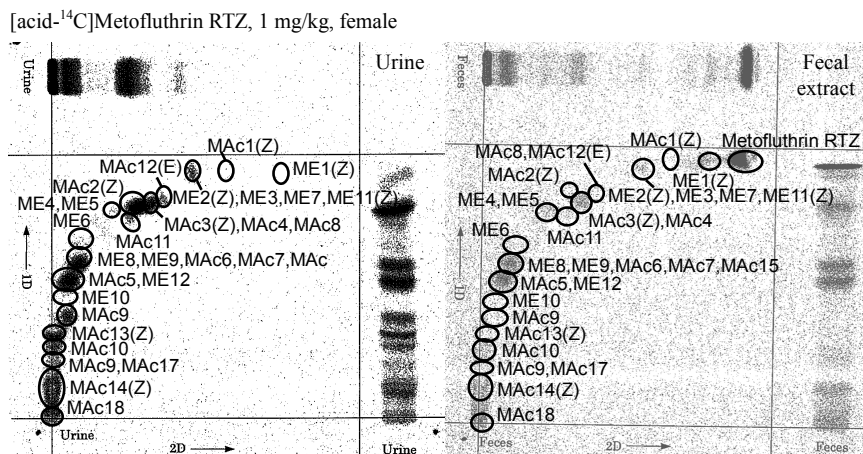


Figure 1-7 Representative TLC chromatogram of the metabolites analysis.

Solvent systems; 1D: ethyl acetate/water/formic acid (35/2/2, v/v/v), 2D: toluene/ethyl acetate/formic acid (50/50/1, v/v/v)

Table 1-3 Amounts of metabolites in urine, feces and bile within 2 days after single oral administration of metofluthrin isomers to rats.

[acid- ¹⁴ C]Metofluthrin RTZ	1 mg/kg (Bile duct cannulated)							
	Male				Female			
	Urine	Bile	Feces	Total	Urine	Bile	Feces	Total
Metofluthrin RTZ	---	---	36.0	36.0	---	---	24.0	24.0
ME1(Z)	---	---	0.4	0.4	---	---	0.4	0.4
ME18(Z)	---	---	0.3	0.3	---	---	0.7	0.7
MAc1(Z)	0.2	0.2	---	0.4	0.2	0.4	---	0.6
ME2(Z),ME3,ME7,ME11(Z)	0.4	0.4	---	0.8	0.4	0.3	---	0.7
MAc2(Z),MAc12(Z),MAc12(E)	1.6	---	---	2.0	1.9	---	---	2.5
MAc3(Z),MAc4,MAc8,MAc11	0.9	0.4	0.1	1.0	1.4	0.6	1.1	2.5
ME4,ME5	0.9	---	---	0.9	0.5	---	---	0.5
ME6	0.3	---	---	0.3	0.2	---	---	0.2
ME8,ME9	1.3	---	---	1.8	0.1	---	---	1.5
MAc6,MAc7,MAc15,ME12	1.4	0.4	0.1	1.4	2.3	0.8	0.6	2.3
MAc5	2.2	0.2	0.1	2.5	3.3	0.3	0.7	4.3
ME10	0.3	---	---	0.3	0.2	---	---	0.2
MAc9	3.5	5.9	---	9.4	2.9	7.8	---	10.7
MAc13(Z)	1.1	3.4	---	4.5	2.3	4.2	---	6.5
MAc10	1.2	---	---	1.2	0.9	---	---	0.9
MAc17	---	---	---	0.0	---	---	---	0.0
MAc14(Z)	4.2	4.8	---	9.0	5.7	6.3	---	12.0
MAc18	4.1	7.3	---	11.4	2.5	10.7	---	13.2
Others ^a	1.5	7.9	2.0	11.4	1.5	9.1	2.3	12.9
Unextractable	---	---	0.2	0.2	---	---	0.4	0.4
Total	24.9	30.9	39.1	94.9	26.2	40.4	30.0	96.6

[acid- ¹⁴ C]Metofluthrin RTE	1 mg/kg (Bile duct cannulated)							
	Male				Female			
	Urine	Bile	Feces	Total	Urine	Bile	Feces	Total
Metofluthrin RTE	---	---	51.8	51.8	---	---	16.1	16.1
ME1(E)	---	0.5	---	0.5	---	0.8	---	0.8
MAc1(E)	0.0	0.1	---	0.1	0.0	0.2	---	0.2
ME18(E)	---	0.5	---	0.5	---	0.7	---	0.7
ME3,ME7	0.2	0.1	---	0.3	0.8	0.2	---	1.0
MAc12(E),MAc2(E)	1.1	0.4	---	1.5	3.9	0.8	---	4.7
MAc4,MAc8	0.0	0.3	---	0.3	0.0	0.8	---	0.8
MAc11	1.0	0.3	---	1.3	2.3	0.5	---	2.8
ME13	0.1	---	---	0.1	0.2	---	---	0.2
MAc3(E)	0.1	---	---	0.1	0.4	---	---	0.4
MAc6,MAc7,MAc15	0.1	1.3	---	1.4	0.3	2.1	---	2.4
MAc5	0.1	---	---	0.1	0.3	---	---	0.3
MAc9	0.2	---	---	0.2	0.9	---	---	0.9
MAc10	0.8	---	---	0.8	1.8	---	---	1.8
MAc17	0.7	---	---	0.7	0.7	---	---	0.7
MAc18	4.1	12.5	---	16.6	6.3	26.7	---	33.0
Others ^a	1.0	10.6	4.0	15.6	2.6	22.6	2.9	28.1
Unextractable	---	---	0.3	0.3	---	---	0.5	0.5
Total	9.6	26.5	56.0	92.1	20.5	55.2	19.6	95.3

Data represents the mean of 4 rats. a: Sum of minor unknown metabolites.

---: Not determined. Shaded values: the sum amount in a eluted fraction was >5%.

血漿、肝臓および腎臓中代謝物

[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ、[alcohol-¹⁴C]メトフルトリン RTZ および[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTE を 1 mg/kg および 20 mg/kg でラットに投与後 168 時間の血漿、肝臓および腎臓中代謝物を **Table 1-4** に示す。検出された代謝物は概ね糞および尿中代謝物と同様であったが、それらの中間体に相当する代謝物も複数検出された。[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ 投与群では、肝臓中に主要代謝物として MAc1(Z)が認められ、またエステル保持代謝物として ME4/ME5 および ME2(Z)/ME3/ME7/ME11(Z) がそれぞれ血漿および肝臓中に検出された。一方、[alcohol-¹⁴C]メトフルトリン RTZ 投与群では、MAI2、MAI4 および MAI2 のグルクロン酸抱合体が主要代謝物として認められ、またエステル保持代謝物として ME2(Z)/ME3/ME7/ME11(Z)も検出された。[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTE 投与群では、主要代謝物として MAc1(E)が血漿、ME18(E)が血漿および肝臓、ME3/ME7 が腎臓にて検出された。

推定代謝経路

以上、尿、糞、胆汁および組織中代謝物の分析結果より推定されたメトフルトリン RTZ およびメトフルトリン RTE のラットにおける主要代謝経路をそれぞれ **Figure 1-8** および **Figure 1-9** に示す。これら代謝物にみられる個別の代謝反応については後述する。

Table 1-4 Amounts of metabolites in plasma, liver and kidney after single oral administration of metofluthrin isomers to rats.

(a) [¹⁴ C]Metofluthrin RTZ												
Concentration [ng eq./mL or g]	1 mg/kg, Male			1 mg/kg, Female			20 mg/kg, Male			20 mg/kg, Female		
	Plasma	Liver	Kidney	Plasma	Liver	Kidney	Plasma	Liver	Kidney	Plasma	Liver	Kidney
Metofluthrin RTZ	1.1	6.1	---	0.0	4.0	---	14	0	---	22	145	---
ME1(Z)	1.3	5.8	---	1.8	3.8	---	16	0	---	53	145	---
ME18(Z),ME18(E)	6.6	35.5	---	14.0	57.4	---	135	608	---	319	1,378	---
MAc1(Z)	18.5	114.4	2.6	25.4	167.7	2.6	408	2,443	0	815	3,666	105
ME2(Z),ME3,ME7,ME11(Z)	14.2	90.0	41.0	2.6	24.2	13.5	131	1,089	507	53	365	309
MAc2(Z),MAc12(Z),MAc12(E)	33.6	55.7	54.5	45.2	117.0	24.6	703	1,339	440	865	2,352	482
MAc3(Z),MAc4,MAc8	3.4	97.5	15.5	2.2	51.0	10.1	47	1,219	231	65	1,094	208
MAc11	---	73.5	---	---	33.1	---	---	1,119	---	---	448	---
ME4,ME5	16.2	69.8	31.0	15.3	30.2	11.2	216	851	225	711	512	217
MAc3(Z)	9.0	27.4	---	11.8	74.5	---	140	431	---	118	1,158	---
ME6	0.0	4.1	5.8	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0
ME8,ME9	5.2	21.1	23.6	0.0	11.5	0.0	27	143	149	0	220	0
MAc6,MAc7,MAc15,ME12	14.7	48.8	30.1	14.4	40.5	26.0	119	546	274	238	715	557
MAc5	14.1	58.3	33.6	14.3	53.0	30.9	111	623	283	156	749	573
MAc9	8.3	11.9	26.0	4.0	7.4	13.2	74	143	258	83	142	245
MAc13(Z)	---	5.6	4.8	---	6.3	8.4	---	110	140	---	0	257
MAc10	4.8	16.1	7.3	3.4	9.4	4.9	73	198	55	89	106	112
MAc14(Z)	---	39.0	22.2	---	65.0	25.3	---	631	452	---	1,024	797
MAc18	5.9	108.2	60.2	4.3	166.4	48.4	79	1,635	912	89	2,371	1,046
Others ^a	21.0	102.5	83.5	10.1	71.8	82.9	211	1,923	1,608	213	1,283	2,147
Unextractable	2.9	39.2	4.0	2.7	32.9	3.7	115	449	67	79	328	86
Total	180.7	1,030.4	446.0	171.4	1,026.9	305.6	2,621	15,499	5,601	3,968	18,199	7,140

(b) [alcohol- ¹⁴ C]Metofluthrin RTZ												
Concentration [ng eq./mL or g]	1 mg/kg, Male			1 mg/kg, Female			20 mg/kg, Male			20 mg/kg, Female		
	Plasma	Liver	Kidney	Plasma	Liver	Kidney	Plasma	Liver	Kidney	Plasma	Liver	Kidney
Metofluthrin RTZ	0.0	7.9	---	1.3	5.3	---	6	271	---	0	83	---
ME1(Z)	0.3	31.0	---	0.4	38.3	---	0	818	---	0	820	---
MA11	1.9	23.6	6.4	3.7	44.0	4.9	39	503	176	42	581	126
ME18(Z),ME18(E)	2.1	0.0	---	5.5	0.0	---	50	132	---	71	75	---
MA12	23.9	110.0	34.0	20.8	96.3	30.2	394	1,829	610	331	2,353	458
ME2(Z),ME3,ME7,ME11(Z)	6.7	46.4	23.0	1.4	22.9	10.7	94	450	432	25	0	155
MA17	---	16.6	0.0	---	10.3	0.0	---	336	0	---	100	0
MA3	---	16.2	6.3	---	0.0	3.6	---	257	89	---	0	42
MA14	7.4	73.4	40.7	3.8	32.8	37.2	123	1,013	786	73	481	732
ME4,ME5	---	---	7.3	---	5.4	---	---	119	---	---	83	---
ME6	---	6.1	---	---	0.0	---	---	107	---	---	0	---
MA15,MA16	0.4	5.2	---	1.5	8.8	---	9	88	---	22	115	---
ME8,ME9	3.5	12.5	18.0	0.5	8.1	2.1	33	148	199	10	148	0
ME12	---	---	0.0	---	0.0	---	---	0	---	---	0	---
MA11-glucuronide	7.7	8.5	42.5	3.8	4.7	23.1	225	276	1,569	169	146	978
MA12-glucuronide	20.7	24.6	104.1	12.2	11.4	21.2	311	505	2,172	294	221	356
Others ^a	2.0	72.2	17.5	2.3	108.0	84.0	25	1,479	278	43	2,007	1,716
Unextractable	6.9	66.1	5.5	9.2	44.9	5.7	120	1,271	85	143	731	80
Total	83.6	520.3	305.3	66.3	435.9	228.1	1,431	9,486	6,514	1,224	7,861	4,727

(c) [acid- ¹⁴ C]Metofluthrin RTE												
Concentration [ng eq./mL or g]	1 mg/kg, Male			1 mg/kg, Female			20 mg/kg, Male			20 mg/kg, Female		
	Plasma	Liver	Kidney	Plasma	Liver	Kidney	Plasma	Liver	Kidney	Plasma	Liver	Kidney
Metofluthrin RTE	2.1	7.6	---	3.8	8.2	---	59	181	---	58	77	---
ME1(E)	1.4	7.1	---	1.5	0.0	---	30	74	---	44	92	---
MAc1(E)	14.2	34.8	2.3	25.9	38.3	2.1	233	780	55	510	861	0
ME18(E)	17.4	108.7	---	35.3	189.8	---	299	2,090	---	388	1,938	---
ME3,ME7	8.3	68.5	54.5	16.3	70.1	27.3	199	1,331	924	202	863	630
MAc12(E),MAc2(E)	---	---	32.0	---	---	49.6	---	---	888	---	---	615
MAc4,MAc8	9.3	140.5	3.5	8.6	221.4	3.9	243	1,956	0	600	2,894	61
MAc11	9.4	311.8	73.5	12.3	228.7	99.3	168	3,697	1,262	139	3,158	1,201
ME13	---	---	6.1	---	---	2.9	---	---	83	---	---	0
MAc3(E)	7.7	---	4.4	11.6	---	6.5	105	---	91	161	---	101
MAc6,MAc7,MAc15	2.0	---	0.0	1.8	---	0.0	34	---	46	28	---	0
MAc5	7.1	---	2.7	7.5	---	3.3	103	---	62	86	---	0
MAc9	---	---	8.2	---	---	8.3	---	---	192	---	---	137
MAc17	---	---	17.9	---	---	16.8	---	---	395	---	---	282
MAc18	5.5	115.3	142.2	5.3	176.2	162.5	145	1,591	3,103	153	2,953	3,927
Others ^a	27.5	393.5	50.0	22.8	256.2	69.2	452	4,825	1,024	575	3,675	1,045
Unextractable	3.7	35.5	5.6	4.2	30.5	6.4	53	494	132	60	423	188
Total	115.5	1,223.1	402.9	157.0	1,219.4	458.2	2,123	17,020	8,257	3,004	16,935	8,188

Data represents the mean value of 3 or 4 rats. ---: Not determined. a: Sum of minor unknown metabolites.

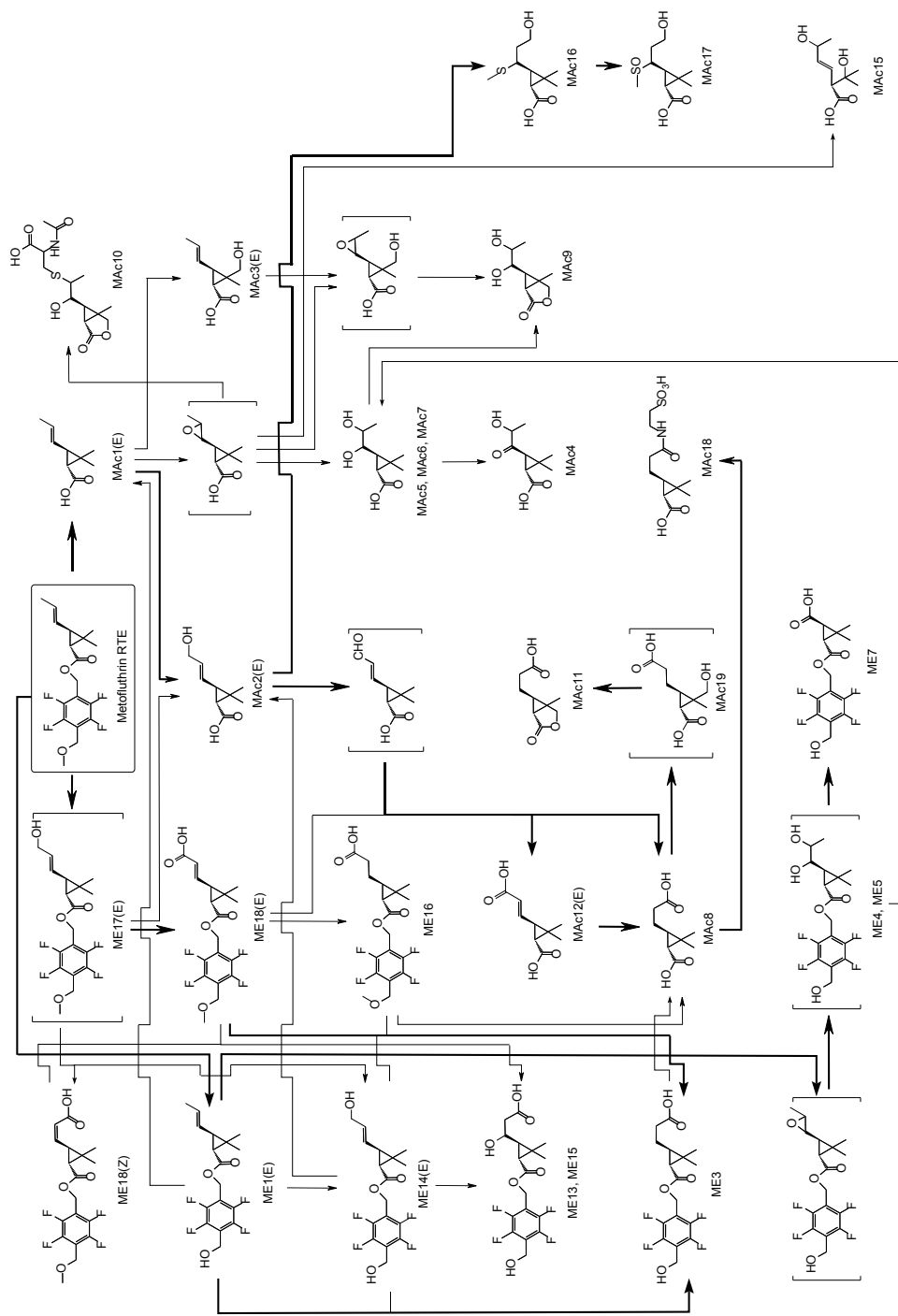


Figure 1-9 Proposed metabolic pathways of metofluthrin RTE.

1.1.3 小括

得られた以上の結果をもって、メトフルトリン RTZ およびメトフルトリン RTE の代謝および動態について、以下の通り考察した。

メトフルトリン RTZ および RTE の動態について

1.1.2 において、メトフルトリンを投与した無処置ラットの全ての群で、投与 48 時間後までに投与した ^{14}C は定量的かつ速やかに体外へ排泄された。胆管カニュレーションラットにおいては、糞中に排泄された放射能のほぼ全量が未変化体由来であり、胆汁中の主要代謝物は無処置ラットの糞および尿で認められた代謝物と同様あるいはその前駆体となるものであった。このことから、無処置ラットの糞中でみられた代謝物は消化管内で代謝されたものではなく、胆汁を介して糞中に排泄されたものであることが示唆された。通常、胆汁排泄性試験の結果から消化管吸収率を評価する場合、尿、胆汁および残屍体（消化管内容物を除く）に含まれる放射能の合計値を吸収率として扱う。今回の検討においては、胆管カニュレーションラットにて無処置ラットよりも多くの糞中未変化体が検出されており、胆管カニュレーション処置により吸収率が低下している可能性が考えられた。この点については、胆管カニュレーション処置により胆汁中の成分（タウロコール酸等）の消化管への流入が妨げられ、そのため消化管での化合物の吸収率が低下する旨の報告があり^[22-24]、メトフルトリンに関して同様の現象が生じたものと考えられた。そのため本検討では、無処置ラットにおいて回収された ^{14}C から糞中未変化体の ^{14}C を差し引いて吸収率を評価するのが適切と考えられ、その結果、メトフルトリンは 70~90% と高い吸収率を示すことが示唆された。なお、低用量と高用量による吸収率の違いを考察したところ、尿中排泄の割合はこれら両群で顕著な違いがなく、また動態パラメータを比較しても、 C_{\max} および AUC が高用量でそれぞれ 13~21 倍および 17~26 倍であり実際の投与量の差（20 倍）と同等であったことから、吸収の飽和等は生じていないものと考えられた。

上述した通り、投与後の血中 ^{14}C の上昇は速やかであり、投与 3~8 時間後に T_{\max} を迎えた後、比較的緩徐な二相性の消失を示した。組織からの ^{14}C の消失は血漿・全血からの消失速度と比較して同程度以上であり、また投与 168 時間後の時点で体内に残存する ^{14}C は投与量の 0.2% 以下であったことから、メトフルトリン RTZ および RTE

とも、未変化体および代謝物が特定の組織に顕著な蓄積を示さないことが明らかとなった。

雄および雌の結果を比較したが、吸収、分布、代謝、排泄のいずれについても、メトフルトリン RTZ および RTE とも、顕著な性差はなかった。

メトフルトリン RTZ および RTE の推定代謝経路

メトフルトリン RTZ およびメトフルトリン RTE を投与したラットの糞および尿より、エステル保持代謝物が 16 種類、酸側代謝物が 20 種類、アルコール側代謝物が 6 種類、合計 42 種類の代謝物を単離し構造を決定した。また、別途合成した代謝物標品より、上記以外に 7 種類の代謝物を同定した。これら代謝物より、メトフルトリンは非常に多様な代謝反応を受け、高極性化されて排泄されることが示された。即ちその代謝反応とは、(1)エステル結合の開裂、(2)酸側末端メチル基の酸化、(3)カルボキシ基のグルクロン酸またはタウリン抱合、(4) *E* 体カルボン酸への異性化、(5)二重結合のエポキシ化、(6)エポキシの水和によるジオール体形成、(7)グルタチオン抱合およびさらなる代謝によるメルカプツール酸抱合、(8)二重結合の還元、(9)二重結合へのグルタチオン付加を経由するメチルスルフィニル化合物形成、(10)酸化を経由する二重結合の開裂、(11)シクロプロパン環の開裂、(12)シクロプロパン環 2 位メチル基の酸化、(13)ラクトン環形成、(14)メトキシ基の脱メチル化、(15)アルコール側の水酸基の酸化、(16)アルコール側水酸基のグルクロン酸抱合体形成またはグルタチオン抱合を経由するメルカプツール酸抱合、(17)グルタチオン抱合体の更なる代謝によるメチルチオ化合物、メチルスルフィニル化合物およびメチルスルホニル化合物の形成等であり、これら反応によりほぼ全ての代謝経路が網羅された。なかでも主要な代謝反応は(1)エステル結合の開裂、(2)酸側の ω 酸化、(3)末端カルボン酸のタウリン抱合、(8)二重結合の還元、(12)シクロプロパン環 2 位メチル基の酸化、(13)ラクトン環の形成、(14)アルコール側メトキシ基脱メチル化および(16)水酸基のグルクロン酸抱合であった (**Figure 1-8** および **Figure 1-9**)。

メトフルトリン代謝物の生成機構

1.1.2 において、メトフルトリンは両異性体とも非常に多様な反応により代謝を受けたが、そのうちいくつかの代謝反応は過去にピレスロイド系化合物について報告例

がなく特筆すべきものであった。以下、それら特筆すべき代謝反応を始めとする、メトフルトリンのラット代謝において重要と考えられた代謝反応を個別に記載する。

Z体からE体への異性化 (MAc12(E)) : MAc12(E)は酸側二重結合にE体の立体配座を持つ代謝物であるが、メトフルリン RTZ 体を投与したラットにおいても検出された。異性化のメカニズムについて特定しなかったが、**Figure 1-10** に示す機構が考えられた。即ち、メトフルリン RTZ のエステル加水分解および酸化により生じた MAc2(Z)が酸化されてアルデヒド体となり、ケト-エノール平衡により二重結合に回転が生じた上で立体障害等によってE体が優位に生成し、その後 ω -酸化によりMAc12(E)へと代謝された可能性が考えられた。同様の異性化について、2-alken-1-ol に関して報告がある^[25]。上記以外にも、酸化を介する機構として、maleylacetoacetate isomerase^[26]による異性化も報告されており、これにより MAc12(E)が直接 MAc12(Z)から生成した可能性も考えられたが、本研究ではいずれの要因が異性化に起因するかは検証しなかった。

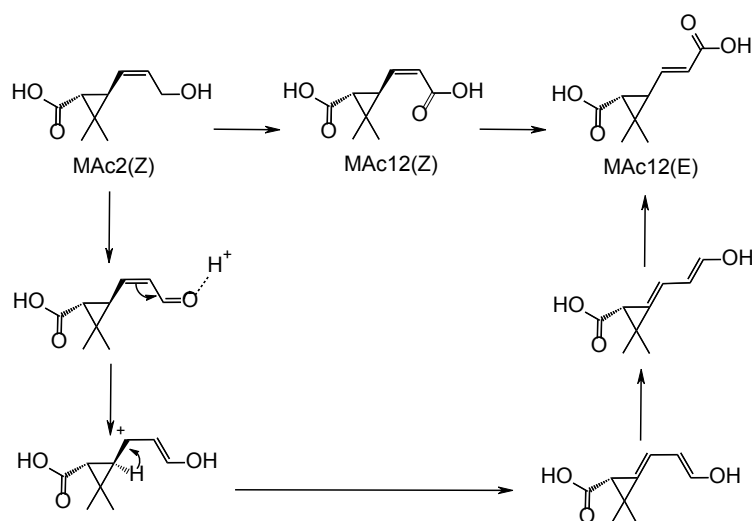


Figure 1-10 Proposed isomerization reaction from the MAc12(Z) to MAc12(E).

メルカプツール酸による水酸基の置換 (MAI5 および MAI6) : メルカプツール酸抱合に関しては、複数の化合物あるいはピレスロイド系化合物においても過去に報告があり^[27-30]、今回と類似するベンジル位の置換反応についても報告がある^[29,30]。推定生成機構を **Figure 1-11** に示す。水酸基がまず硫酸抱合を受け、さらにグルタチオンによる置換反応を受けた後、グルタミン酸およびグリシンの開裂やアセチル基の付加により、メルカプツール酸抱合体が生成するものと考えられた。

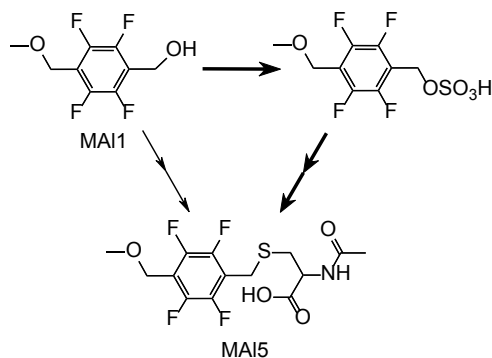


Figure 1-11 Proposed substitution reaction of the mercapturic acid for the hydroxyl group.

二重結合の還元 (ME3、ME16、MAc8、MAc11、MAc18 および MAc19) : 哺乳動物における二重結合の還元反応については、過去に複数の報告があり^[31-35]、例えば α,β -不飽和アルデヒドまたはケトンにおいて、この代謝反応が進行することが報告されている^[33-35]。メトフルトリンに関して、同様の酵素が関与しているか否かは本研究では明確にしていないが、その構造の類似性から、酸側の末端メチル基が酸化によりアルデヒドとなり、そこにアルケナル/アルケノンオキシドリダクターゼが作用して二重結合が酸化された後、末端がさらなる酸化を受けてカルボン酸代謝物が生成する可能性が考えられた。この機構は、同定された還元代謝物が全て末端カルボン酸を有しており、水酸化代謝物を含まないこととも一致しているものと考えられた。

二重結合の水和反応 (ME13 および ME15) : 二重結合への水付加に関しては、 α,β -不飽和カルボニル化合物に対する代謝反応として、 β -酸化に関わるエノイル-CoAヒドラターゼ^[36]やTCAサイクルに関わるフマル酸ヒドラターゼ^[37]が関与する経路が知られている。メトフルトリン RTE に関してもその構造類似性から、酸側末端のメチル基が酸化により α,β -不飽和カルボニルを生じ、そこから酵素反応により二重結合が水和した可能性が考えられた。

シクロプロパン環の開裂 (MAc15) : シクロプロパン環の開裂に関してはいくつかの論文報告があり^[38,39]、それを元にした推定代謝反応を **Figure 1-12** に記す。メトフルトリン RTE においては、酸側代謝物の二重結合のエポキシ化が起こり、生じたエポキシドがシクロプロパン環 2 位に付加した水分子からプロトンを受け取ることで水酸基となり、同時にシクロプロパンの単結合が隣接する単結合に転移することで二重結合が生じるものと考えられた。

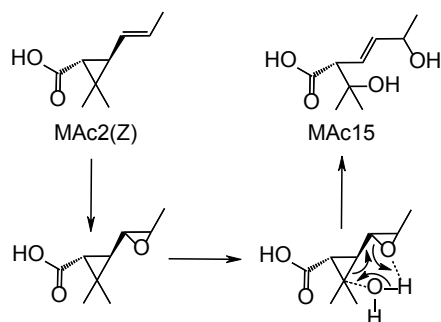


Figure 1-12 Proposed cleavage reaction of the cyclopropane ring.

メトフルトリン RTZ および RTE の代謝プロファイルの比較

[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ 投与群において、MAc5、MAc14(Z)、MAc18 および MAc2(Z)/MAc12(Z)/MAc12(E)が糞および尿中の主要代謝物として検出され、またこれらに加えて MAc1(Z)、ME4/ME5 および ME2(Z)/ME3/ME7/ME11(Z)が肝臓および血漿において検出された。以上より、[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ における主要な代謝経路は(1)エステル結合の開裂、(14)メトキシ基の脱メチル化、(2)酸側末端メチル基の酸化 (MAc2(Z)、MAc12(Z/E)、ME3、MAc14(Z))、(8)二重結合の還元および(3)末端カルボキシル基のタウリン抱合 (MAc18)、(5)二重結合のエポキシ化およびそれに続く(6)エポキシの水和によるジオール体形成 (ME4、ME5、MAc5) であることが明らかとなった。一方、[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTE 投与群において、MAc18、MAc17、MAc11 および MAc12(E)/MAc2(E)が糞および尿中の主要代謝物として検出され、またこれらに加えて ME18(E)、MAc1(E)および ME3/ME7 が肝臓、腎臓および血漿において検出された。以上より、[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ における主要な代謝経路は(1)エステル結合の開裂、(14)メトキシ基の脱メチル化、(2)酸側末端メチル基の酸化 (ME3、ME18(E)、MAc2(E)、MAc11、MAc12(E)、MAc18)、(8)二重結合の還元 (ME3、MAc11、MAc18) および(3)末端カルボキシル基のタウリン抱合 (MAc18)、(9)二重結合へのグルタチオン付加を經由するメチルスルフィニル化合物形成 (MAc17) であることが明らかとなった。

タウリン抱合体はメトフルトリン RTZ および RTE の両方にて主要に検出された。この代謝経路は多くの化合物について、酸:CoA リガーゼおよびアシル-CoA:アミノ酸 N-アセチル転移酵素により触媒されることが知られている^[40-42]。加えて、酸側の二重結合への代謝反応も両異性体で認められたが、その代謝パターンが異性体ごとに異なる

ることが明らかとなった。即ち、エポキシドを介した水和反応によるジオール体形成が RTZ 体で主要であったのに対し、グルタチオン付加を介するメチルスルフィニル化合物の形成が RTE 体では主要であった。エポキシ体については、Z 体 (*cis* 体) で優位に生成することが過去に報告されており^[43,44]、一方 E 体 (*trans* 体) にて優先的に二重結合へのグルタチオン付加が生じることが報告されている^[45]。これら反応の異性体差について、そのメカニズムの詳細は本研究では解明していないが、恐らくはエポキシ化あるいはグルタチオン抱合に関する酵素の二重結合への近接性が関係しているものと推測され、メトフルトリンについても同様に異性体ごとにこれら反応の優位性がみられたものと推察された。

[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ 投与群および[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTE 投与群でエステル保持代謝物の排泄量を合算したところ、RTZ 異性体投与群では雄が 10%以上および雌で 5%以上であったのに対し、RTE 異性体投与群では雄が 5%および雌が 4%であり、特に雄においてメトフルトリン RTZ にてエステル保持代謝物の割合が増加する傾向がみられた。その内訳を見ると、RTZ 体にて大部分を占めるのが ME8/ME9、ME4/ME5、ME6 および ME10 等のジオール体であることから、これら代謝物はエステル結合の開裂を受けにくいことが示唆された。即ち、前述した RTZ 体優位なエポキシ化・ジオール体生成により、エステル結合の開裂割合が減少していることが推察された。

Figure 1-5 に示した通り、¹⁴C の血漿からの消失はメトフルトリン RTE にて RTZ よりも速やかであった。さらに、**Figure 1-3** に示した通り、糞中への排泄は RTE 体投与群で若干多い傾向がみられた。これら動態の異性体差は、上述した代謝経路の差によるものと考えられた。即ち、エステル保持体を多く含むジオール代謝物が RTZ 体投与群にて多かったのに対して RTE 体投与群ではグルタチオン抱合体 (MAc17) およびタウリン抱合体 (MAc18) が糞中に顕著であり、これら代謝物が血液循環を介さずに直接胆汁を経由して排泄されることにより、RTE 体で血漿から ¹⁴C が消失し、また糞中排泄割合が増加したものと考えられた。

メトフルトリン RTZ の標識位置の差による動態の違いについて

[alcohol-¹⁴C]メトフルトリン RTZ 投与群において、MAI2 のグルクロン酸抱合体、

MA11 のグルクロン酸抱合体および MA14 が糞および尿中の主要代謝物として認められた。加えて、MA11 が血漿、肝臓および腎臓にて検出されており、これらの結果より、アルコール側の主要代謝経路は脱メチル化 (MA12)、ヒドロキシル基の酸化 (MA14) およびグルクロン酸抱合 (MA11-グルクロン酸抱合体、MA12-グルクロン酸抱合体) であることが明らかとなった。吸収・排泄や血中濃度推移の結果を[acid-¹⁴C]メトフルトリン RTZ 投与群と比較したところ、アルコール標識体投与群にて尿中への ¹⁴C の排泄率はやや高く、また血中からの ¹⁴C の消失は速やかであった。この差はエステル開裂後の代謝物の挙動によるものと考えられた。即ち、酸側標識体由来の代謝物が部分的に胆汁を経由して糞中に排泄されるのに対し、アルコール側標識体由来の代謝物は酸化あるいは抱合と、酸側標識体と比べて少ない代謝反応でより極性の高い代謝物へと変化されてほぼ全量が尿中に排泄されており、これが血中からのより速やかな ¹⁴C の消失に寄与しているものと考えられた。

第 1-2 節 プロフルトリンのラットにおける代謝

1.2.1 実験方法

被験物質およびその他実験材料

被験物質として使用した非標識体のプロフルトリン RTZ および ¹⁴C 標識した [benzyl-¹⁴C]プロフルトリン RTZ (以下、[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ、比放射能：6.51 MBq/mg) は住友化学 (株) にて合成した^[18-20] (Figure 1-13)。また分析用の代謝物標品として、非標識体の M1、M2、M4、M5、M6 および M8 も同様に住友化学 (株) にて合成した。その他の代謝物 (M3 および M7) については、プロフルトリンを投与したラットの糞および尿より単離・精製し構造同定したものを、分析用の標品として使用した。これら代謝物の構造は 1.2.2 にて後述する。その他の試薬類は特級以上のグレードのものを使用した。

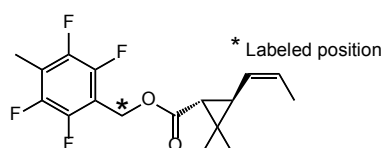


Figure 1-13 Structure of [alcohol-¹⁴C]profluthrin RTZ.

クロマトグラフィー条件

代謝物等の分離、精製、および純度確認のため、HPLC 分析および TLC 分析を実施した。ラット糞および尿中からの代謝物の単離に際しては、既報の HPLC および TLC 条件^[46]より、複数の分析を順次行った。HPLC 分析は L-2130 型 HPLC ポンプ（日立製作所）、L-2400 型 UV 検出器（日立製作所）、610TR 型オンライン RI 検出器（PerkinElmer）に ODS カラム（Atlantis dC18, 5 μ m, 4.6 mm I.D. x 150 mm、Waters、MA、アメリカ合衆国）を接続し、移動相 A ; 0.05%トリフルオロ酢酸、B ; アセトニトリルにて、代謝物分析は%B=5% (0分) - 5% (5分) - 25% (15分) - 15% (30分) - 100% (50分) - 100% (55分) のグラジエント条件、また被験物質の精製・純度確認は%B=10% (0分) - 60% (30分) のグラジエント条件により、いずれも 1 mL/分の流速で実施した。TLC による分析は、1.1.1 に記載の条件を用いた。

代謝物のスペクトル分析

単離・精製した代謝物は、NMR 分析および MS 分析により構造を同定した。1.1.1 に記載の方法により、NMR 分析に関しては ¹H スペクトルおよび H-H COSY スペクトルデータを取得し、また APCI-MS 分析に関しては LTQ XL (Thermo Fisher Scientific) を用いてデータを取得した。

動物の飼育

CrI:CD(SD)ラットを日本チャールスリバーより購入し、1.1.1 に記載の条件にて飼育した。7 日間の検疫期間を設け、1 日 1 回以上その健康状態を確認し、体重増加や一般症状に異常の認められなかった個体をランダムに付番して実験に使用した。胆管カニュレーション動物については実験施設への搬入直後に実験に使用した。

投与液の調製および投与

まず始めに、プロフルトリンを投与した際の糞および尿中の代謝物の構造を決定するための検討を実施した。[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ を非標識体にて希釈し 275 kBq/mg とした後、50 mg/kg/5 mL となるようコーンオイルに溶解し投与液を調製した。

続いて、プロフルトリンを投与した際の吸収・排泄、血中濃度推移、組織分布等を確認するための検討を実施した。低用量 (1 mg/kg) は希釈せず 6.51 MBq/kg のまま、

また高用量（60 mg/kg）は 108 kBq/mg となるように非標識体にて希釈した後、それぞれ 5 mL/kg となるようコーンオイルに溶解し投与した。

代謝物の単離・精製および同定

7 週齢の雌雄ラット各 3 匹に[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ を 50 mg/kg/日（5 mg/mL コーンオイル）の用量で約 1 週間連続投与し、1.1.1 に記載の手順にて糞および尿を回収した。尿は少量を HPLC にて分析し、M3 および M7 に該当するピークを分取して、これを粗標品とした。残った尿の全量に塩酸を添加して酸性とした後に酢酸エチルで抽出し、濃縮したものを TLC（条件 A）にて精製した。その後、HPLC によりさらに精製し、スペクトル分析により構造を同定した。

糞・尿中 ¹⁴C 排泄性試験

7 週齢の雌雄ラット（4 匹/群）に[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ を 1 mg/kg および 60 mg/kg にて単回経口投与した後、代謝ケージに収容し、糞、尿および呼気を回収した。尿は投与 6、12、24、48、72、120 および 168 時間後に、糞は投与 24、48、72、120 および 168 時間後に回収した。呼気は 10%水酸化ナトリウム水溶液（w/v）により、投与 24 時間後までトラップした。尿の回収の度にケージ内を水で洗浄し、含まれる放射能を尿への排泄に含めた。

胆汁中 ¹⁴C 排泄性試験

8 週齢の胆管カニューレション手術済みラット（雌雄各 4 匹）に[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ を 1 mg/kg で単回経口投与した。ラットはフリームービングシステムを使用し、代謝ケージで飼育した。糞を投与 24、48 および 72 時間後、尿および胆汁を投与 6、12、24、48 および 72 時間後に回収した。その他の手順は 1.1.1 に記載の手順に従った。

血漿中 ¹⁴C 濃度推移試験

7 週齢の雌雄ラット（3 匹/群）に[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ を 1 mg/kg および 60 mg/kg にて単回経口投与し、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72、120 および 168 時間後に尾静脈より約 0.2 mL を 2 連ずつ採血した。一部を採取して放射能を測定し、また残りを 3,000 x g で 10 分間遠心して得られた血漿を放射能測定に供した。

動態パラメータは 1.1.1 に記載の方法に従い算出した。

¹⁴C 組織分布試験

7 週齢の雌雄ラット（3 匹または 4 匹/群）に[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ を 1 mg/kg および 60 mg/kg にて単回経口投与し、後述する 4 時点にて腹部大動脈より全採血して安楽死させた。以降、解剖や組織の摘出は 1.1.1 に記載の手順に従った。

放射能測定

サンプル中の放射能の測定は 1.1.1 に記載の手順に従って行った。

代謝物分析

¹⁴C 排泄性試験においては、排泄された放射能のうち 95%以上の排泄が完了した投与 48 時間後までの糞、尿および胆汁を分析対象とした。また ¹⁴C 組織分布試験においては、投与 24 時間以内の時点の血漿、肝臓および腎臓を分析対象とした。尿および胆汁は直接 HPLC にて分析した。糞ホモジネート、血漿、肝臓および腎臓は、3 倍量のメタノールで抽出し濃縮した後に HPLC 分析に供した。抱合体である可能性が疑われた高極性代謝物については、1.1.1 に記載の方法で抱合体加水分解を行った後、条件 A および B による 2 次元 TLC 分析にて脱抱合体の構造を同定した。

1.2.2 結果

代謝物の単離・精製および同定

プロフルトリンを投与したラットの尿から 2 種類の代謝物（M3 および M7）を単離・精製し、スペクトル分析（NMR および MS）により構造を同定した^[46]。その結果、M3 は M2 のメルカプツール酸抱合体であり、また M7 はベンゼン環の 4 位のメチル基が酸化し、さらにシクロプロパン環 2 位のメチル基がカルボン酸になった代謝物であることが明らかとなった。

糞、尿および胆汁中への ¹⁴C 排泄

[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ を 1 mg/kg および 60 mg/kg にてラットへ投与後 168

時間までの糞、尿および呼気中への¹⁴Cの排泄割合を **Figure 1-14** に示す。¹⁴Cの排泄は非常に速やかであった。呼気中への¹⁴Cの排泄は低用量投与群において投与24時間までで1%未満であったため、低用量群24時間以降および高用量群での分析は行われなかった。¹⁴Cの排泄率は尿でおよそ60~70%、糞でおよそ20~40%であり、主要排泄経路は尿であった。雌雄とも、低用量群に比べて高用量群でおよそ10%程度、糞中排泄率が高い傾向がみられた。¹⁴Cの排泄率に雌雄差は認められなかった。

[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ を胆管カニューレーションラットへ1 mg/kgにて投与後72時間までの糞、尿および胆汁中への¹⁴Cの排泄割合を **Figure 1-15** に示す。胆汁への排泄割合は雄で37%、雌で24%であった。無処置ラットと比較して尿中への排泄率が大きく減少し、また糞中への排泄は10~20%程度増加した。

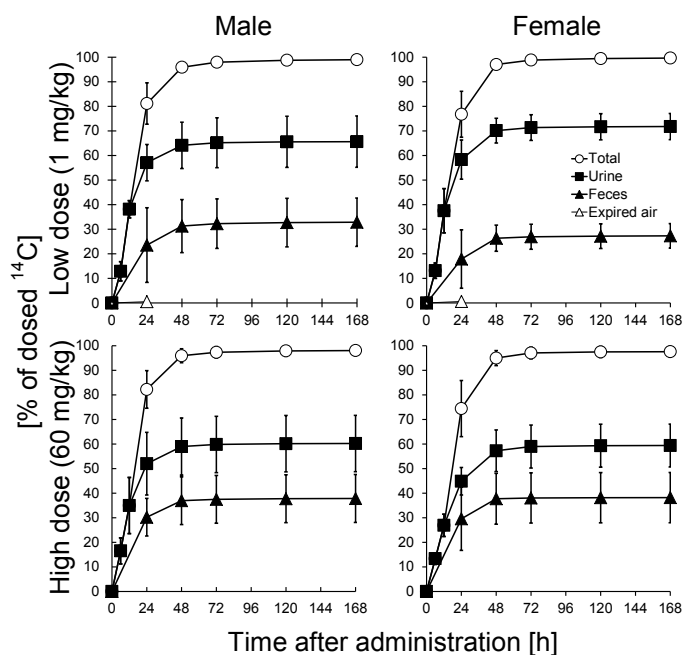


Figure 1-14 Cumulative ¹⁴C-excretion after single oral administration of profluthrin RTZ to rats.

Points and bars are mean values and standard deviations for data from 4 rats.

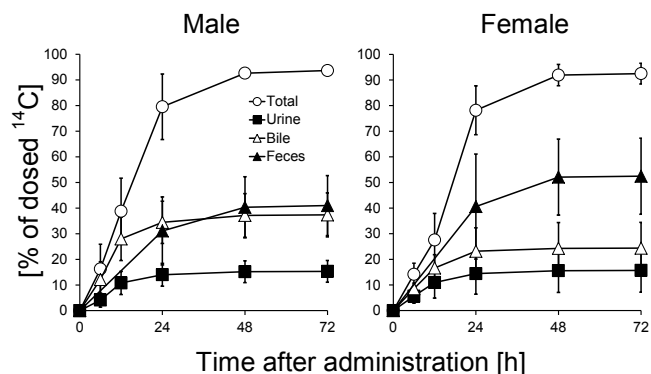


Figure 1-15 Cumulative ^{14}C -excretion after single oral administration of profluthrin RTZ at the dose of 1 mg/kg to bile duct-cannulated rats.

Points and bars are mean values and standard deviations for data from 4 rats.

血漿中 ^{14}C 濃度推移

[alcohol- ^{14}C]プロフルトリン RTZ を 1 mg/kg および 60 mg/kg で投与した際の血漿中 ^{14}C 濃度推移を **Figure 1-16**、動態パラメータを **Table 1-5** に示す。投与した全ての群で血漿中 ^{14}C 濃度は速やかに上昇し、投与 6~8 時間後に T_{\max} を迎えた後、半減期 2 日程度にてやや緩徐に消失した。高用量群の C_{\max} および AUC は低用量と比較してそれぞれ 24~43 倍および 32~53 倍であった。血漿中 ^{14}C 濃度推移を雌雄で比較した場合、低用量の C_{\max} および AUC が若干雄で高い傾向がみられたが、その差は顕著ではなかった。

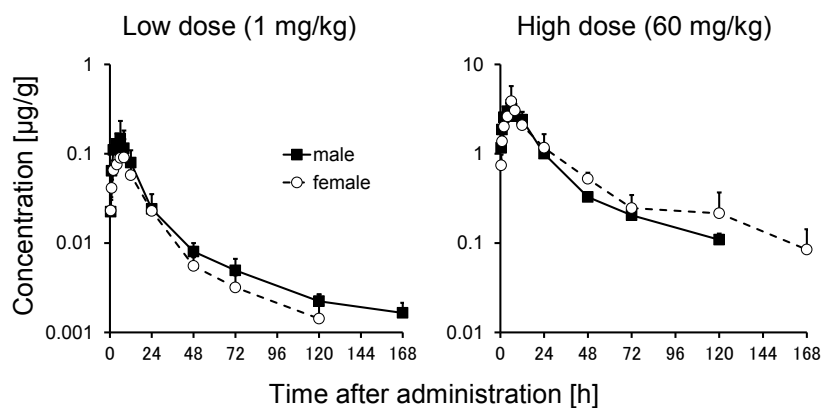


Figure 1-16 Plasma concentration after single oral administration of profluthrin RTZ to rats. Points and bars are mean values and standard deviations for data from 3 rats.

Table 1-5 Toxicokinetic parameters of ^{14}C in plasma after single oral administration of profluthrin RTZ to male and female rats at 1 and 60 mg/kg.

Parameters	1 mg/kg		60 mg/kg	
	Male	Female	Male	Female
T_{\max} [h]	6	8	6	6
C_{\max} [$\mu\text{g eq./g plasma}$]	0.148	0.091	3.54 (24)	3.87 (43)
$T_{1/2}$ [h]	52.2	37.3	46.2	51.8
AUC [$\mu\text{g eq.}\cdot\text{h/g plasma}$]	2.821	1.973	88.94 (32)	104.82 (53)

Parameters were obtained from the mean plasma concentrations of 3 rats.

Values in parentheses present the fold increase of the corresponding low dose values.

^{14}C 組織分布

[alcohol- ^{14}C]プロフルトリン RTZ を 1 mg/kg および 60 mg/kg で投与した際の組織中 ^{14}C 濃度をそれぞれ **Table 1-6** および **Table 1-7** に示す。組織中の ^{14}C も血漿と同様、投与 6~8 時間後に最大値を迎えた後、速やかに消失した。消化管およびその内容物を除くと、全ての投与群において肝臓および腎臓が高い濃度を示し、次いで脂肪、甲状腺、子宮、卵巣、毛・皮膚、血球および副腎にて高い値を示した。投与 168 時間後の時点で組織を含む残屍体に残った ^{14}C は投与量の 0.3%以下であり、消失速度に標識位置の差、性差および用量差はみられなかった。

Table 1-6 Concentrations of radioactivity in tissues after single oral administration of profluthrin RTZ to male and female rats at 1 mg/kg.

Tissue	Concentration [$\mu\text{g eq./g}$]							
	Male				Female			
	6 h	12 h	48 h	168 h	8 h	12 h	48 h	168 h
Adrenal	0.0572	0.0347	0.0079	0.0024	0.0595	0.0298	0.0079	0.0018
Blood	0.0781	0.0347	0.0056	0.0016	0.0656	0.0312	0.0066	0.0017
Blood cell	0.0409	0.0190	0.0046	0.0025	0.0350	0.0183	0.0048	0.0025
Plasma	0.1154	0.0495	0.0064	0.0010	0.0953	0.0462	0.0079	0.0009
Bone	0.0163	0.0081	0.0015	0.0007	0.0186	0.0185	0.0017	0.0007
Bone marrow	0.0351	0.0192	0.0039	0.0007	0.0365	0.0468	0.0053	<0.0007
Brain	0.0147	0.0053	0.0012	<0.0004	0.0167	0.0087	0.0018	<0.0004
Eye	0.0212	0.0139	0.0022	<0.0008	0.0210	0.0125	0.0022	0.0013
Fat	0.0344	0.0267	0.0067	0.0026	0.0367	0.0428	0.0080	0.0019
Hair & Skin	0.0950	0.0466	0.0083	0.0017	0.0623	0.0751	0.0127	0.0011
Heart	0.0372	0.0165	0.0025	0.0008	0.0320	0.0167	0.0031	0.0006
Kidney	0.3805	0.1602	0.0179	0.0036	0.3219	0.1301	0.0180	0.0030
Liver	0.6859	0.4922	0.1551	0.0369	0.5017	0.2778	0.0646	0.0194
Lung	0.0525	0.0261	0.0056	0.0018	0.0485	0.0256	0.0065	0.0013
Mandibular gland	0.0472	0.0244	0.0030	0.0008	0.0352	0.0198	0.0040	0.0007
Muscle	0.0234	0.0124	0.0028	0.0006	0.0286	0.0147	0.0030	<0.0004
Ovary					0.0680	0.0471	0.0135	0.0014
Pancreas	0.0574	0.0336	0.0046	0.0008	0.0676	0.0283	0.0079	0.0006
Pituitary gland	0.0605	0.0142	0.0116	<0.0076	0.0373	0.0385	<0.0098	<0.0070
Sciatic nerve	0.0350	0.0319	0.0058	<0.0032	0.0173	0.0755	0.0026	<0.0048
Spleen	0.0367	0.0183	0.0040	0.0011	0.0409	0.0204	0.0052	0.0010
Spinal cord	0.0180	0.0150	0.0016	0.0005	0.0201	0.0125	0.0015	<0.0010
Testis	0.0271	0.0107	0.0029	0.0005				
Thymus	0.0282	0.0158	0.0039	0.0006	0.0284	0.0132	0.0040	0.0005
Thyroid	0.1291	0.4201	0.0402	<0.0060	0.0786	0.0613	0.0115	<0.0077
Uterus					0.0663	0.0632	0.0075	0.0009
Caecum	0.2705	0.5500	0.1240	0.0017	1.5141	0.7702	0.1349	0.0016
Large intestine	0.2478	0.2859	0.0902	0.0013	0.2823	0.1995	0.0986	0.0010
Small intestine	2.0079	0.8732	0.0775	0.0018	2.5398	0.4284	0.2045	0.0019
Stomach	1.1815	0.3321	0.0125	0.0008	0.8219	0.1828	0.0547	0.0008
Caecum contents	2.3964	10.0116	0.3123	0.0031	7.8826	8.5451	0.3419	0.0019
Large intestine contents	0.3343	7.2079	0.2735	0.0042	2.9782	7.6202	0.2475	0.0018
Small intestine contents	13.4974	6.7422	0.3369	0.0029	12.2024	5.7568	0.9793	0.0031
Stomach contents	3.4072	1.6964	0.0042	<0.0004	6.4794	0.6035	0.0152	<0.0004

Data represents the mean value of 3 rats (6,8,12 and 48 h) or 4 rats (168 h).

Table 1-7 Concentrations of radioactivity in tissues after single oral administration of profluthrin RTZ to male and female rats at 60 mg/kg.

Tissue	Concentration [$\mu\text{g eq./g}$]							
	Male				Female			
	6 h	24 h	48 h	168 h	6 h	12 h	72 h	168 h
Adrenal	3.03	1.04	0.45	<0.16	4.14	1.98	0.37	0.14
Blood	2.44	0.67	0.35	0.09	2.52	1.28	0.16	0.06
Blood cell	1.56	0.37	0.31	0.14	1.52	0.81	0.18	0.11
Plasma	3.39	0.88	0.37	0.04	3.56	1.74	0.16	0.03
Bone	0.78	0.23	0.19	0.05	0.89	0.64	0.09	0.04
Bone marrow	1.76	0.56	0.41	0.06	1.90	1.18	0.17	<0.06
Brain	0.76	0.17	0.06	<0.02	0.97	0.45	0.05	<0.02
Eye	0.74	0.23	0.09	<0.06	0.97	0.50	0.08	<0.04
Fat	2.75	1.68	0.74	0.19	2.97	2.47	0.60	0.15
Hair & Skin	2.27	2.50	0.70	0.08	2.32	1.51	0.33	0.07
Heart	1.59	0.42	0.16	0.03	1.61	0.81	0.10	0.03
Kidney	14.97	3.47	1.02	0.13	11.72	5.73	0.37	0.10
Liver	15.13	7.18	3.74	1.02	10.13	6.37	1.14	0.33
Lung	1.92	0.64	0.35	0.09	2.05	1.21	0.23	0.07
Mandibular gland	1.77	0.46	0.21	0.04	1.89	0.99	0.11	0.04
Muscle	1.07	0.30	0.10	0.03	1.46	0.59	0.07	<0.02
Ovary					3.52	2.62	0.39	0.08
Pancreas	2.31	0.67	0.31	0.03	3.80	1.58	0.16	0.04
Pituitary gland	1.62	1.47	<0.59	<0.57	3.22	1.21	<0.55	<0.54
Sciatic nerve	1.45	0.48	0.25	<0.28	1.13	0.99	<0.28	<0.25
Spleen	1.56	0.47	0.25	0.05	2.09	0.95	0.16	0.06
Spinal cord	0.89	0.26	0.09	<0.05	0.88	0.54	0.07	<0.03
Testis	1.08	0.31	0.12	0.03				
Thymus	1.38	0.60	0.19	<0.03	1.37	0.78	0.13	0.04
Thyroid	11.58	5.94	0.71	<0.43	7.64	3.63	0.47	<0.41
Uterus					3.05	3.46	0.40	0.07
Caecum	9.12	17.43	4.52	0.10	6.07	34.44	1.47	0.11
Large intestine	8.17	10.27	2.61	0.06	7.92	15.27	0.97	0.06
Small intestine	75.18	31.37	5.95	0.08	60.33	25.94	1.24	0.10
Stomach	50.08	4.73	1.12	0.03	46.09	13.33	0.43	0.05
Caecum contents	333.98	72.13	11.69	0.12	162.19	530.95	4.45	0.32
Large intestine contents	134.94	91.96	8.45	0.17	21.44	580.36	2.28	0.36
Small intestine contents	588.64	117.18	24.92	0.13	664.07	544.85	8.19	0.20
Stomach contents	150.83	3.95	0.15	<0.03	283.33	120.43	0.29	0.15

Data represents the mean of 3 rats (6, 12, 24, 48 and 72 h) or 4 rats (168 h).

糞、尿および胆汁中代謝物分析

[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ を 1 mg/kg および 60 mg/kg で無処置ラットに投与した後 48 時間までの糞および尿中代謝物を **Table 1-8** に示す。糞中 ¹⁴C の大部分は未変化体のプロフルトリン RTZ であり、その傾向は高用量群にて顕著であった。未変化体以外に代謝物として M7 が糞中に認められたが、2.1%以下と微量であった。尿中には 3 種類のグルクロン酸抱合体（以下、glu と記載）を含む 8 種類の代謝物が検出された。主要代謝物は M5-glu および M2-glu であり、その合計はおよそ 40~50%であった。M5 の酸化体である M4 や、M2 の酸化体およびメルカプツール酸抱合体である M1 および M3 も尿中に検出されたが、いずれも投与量の 2~5%と微量であった。エステル保持代謝物として M7 が検出されたが、糞および尿中の総量は 1~12%とわずかであり、プロフルトリン RTZ のエステル結合は容易に開裂するものと考えられた。

[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ を 1 mg/kg で胆管カニューレションラットに投与後 48 時間までの糞、尿および胆汁中代謝物を同様に **Table 1-8** に示す。糞中 ¹⁴C は全量が未変化体のプロフルトリン RTZ であった。尿および胆汁中には 4 種類のグルクロン酸抱合体を含む 10 種類の代謝物が検出された。尿中の代謝物は、無処置ラットと胆管カニューレションラットで顕著な差が認められなかった。胆汁中には M5-glu が最も多く、他に M2-glu、M6-glu、M8、M7 および M7-glu が認められた。尿中に認められなかった代謝物として M6-glu および M8 が検出されたが、その割合は投与量の 3%以下と微量であった。未変化体のプロフルトリン RTZ は尿および胆汁中に検出されず、代謝物の主な組成は尿と胆汁で同様であった。また、胆汁中にみられた代謝物は無処置ラットの糞中からほとんど検出されなかったことから、胆汁から消化管内に排泄された代謝物は大部分が再吸収を受け、最終的に尿より排泄されるものと考えられた。

Table 1-8 Amounts of metabolites in urine, feces, and bile within 48 h after single oral administration of profluthrin RTZ to male and female rats.

Metabolite	[% of the dosed ¹⁴ C]					
	1 mg/kg		60 mg/kg		1 mg/kg (Bile duct-cannulated)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Urine						
M1	2.95	3.30	1.90	2.25	0.46	0.34
M2-glu	16.77	14.90	10.83	11.50	2.77	1.84
M2	0.18	0.38	0.20	0.11	0.13	0.19
M3	2.53	3.46	1.14	2.48	0.04	0.15
M5-glu	32.11	29.49	40.44	33.80	10.94	10.72
M4	3.59	5.42	3.50	5.30	0.49	0.33
M7-glu	1.25	5.25	N.D.	0.42	0.18	1.12
M7	2.30	6.01	0.05	0.73	0.03	0.68
Others	2.51	1.89	0.84	0.72	0.17	0.13
Total of urine	64.20	70.10	58.90	57.30	15.20	15.50
Feces						
M7	2.11	0.40	0.66	N.D.	N.D.	N.D.
Profluthrin RTZ	23.13	22.49	34.53	35.98	39.92	51.65
Others	2.56	0.75	0.31	0.30	N.D.	N.D.
Unextractable	3.41	2.76	1.40	1.52	0.38	0.45
Total of feces	31.20	26.40	36.90	37.80	40.30	52.10
Bile						
M2-glu					3.33	1.96
M2					0.85	N.D.
M6-glu					3.05	1.57
M5-glu					14.32	13.82
M7-glu					4.06	1.19
M7					2.25	1.10
M8					0.54	0.24
Others					8.72	4.42
Total of bile					37.10	24.30

Data represents the mean value of 4 rats. N.D.: Not Detected.

血漿、肝臓および腎臓中代謝物

[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ を 1 mg/kg および 60 mg/kg でラットに投与し 6 および 8 時間後の血漿、肝臓および腎臓中代謝物を **Table 1-9** に示す。肝臓および腎臓中の代謝物は定性的に尿中代謝物と類似しており、M5-glu、M7、M7-glu、M2、M2-glu および M3 等が検出された。尿中で未検出のエステル保持代謝物として M8 が低用量群の肝臓および血漿中に認められた。さらに血漿中で、M5-glu、M7、M2 および M2-glu が検出された。

Table 1-9 Concentrations of metabolites in liver, kidney, and plasma after single oral administration of profluthrin RTZ at 1 and 60 mg/kg to male and female rats.

Metabolite	Concentration [$\mu\text{g eq./g}$]							
	1 mg/kg				60 mg/kg			
	Male		Female		Male		Female	
	6 h	12 h	8 h	12 h	6 h	24 h	6 h	12 h
Liver								
M2	0.065	0.017	0.084	0.045	3.7	1.4	3.0	1.5
M3	0.035	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M5-glu	0.030	0.018	N.D.	0.023	N.D.	N.D.	N.D.	1.4
M7-glu	0.115	0.035	0.090	0.035	N.D.	2.0	3.8	1.2
M7	0.189	0.169	0.145	0.093	4.1	N.D.	1.1	0.7
M8	0.119	0.030	0.103	0.016	2.2	N.D.	1.1	0.6
Others	N.D.	0.029	N.D.	0.011	2.8	N.D.	N.D.	N.D.
Unextractable	0.133	0.195	0.080	0.054	2.4	3.8	1.1	1.1
Total of liver	0.686	0.492	0.502	0.278	15.1	7.2	10.1	6.4
Kidney								
M2-glu	0.020	0.015	0.052	0.013	2.8	N.D.	2.2	1.4
M2	0.039	0.016	0.026	0.021	2.1	N.D.	1.3	0.8
M3	N.D.	N.D.	0.021	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
M5-glu	0.166	0.046	0.129	0.051	9.8	2.6	5.1	3.2
M7-glu	0.058	0.043	0.056	0.016	N.D.	0.5	N.D.	N.D.
M7	0.047	0.032	0.029	0.024	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Others	0.041	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.8	N.D.
Unextractable	0.010	0.008	0.008	0.005	0.4	0.4	0.2	0.2
Total of kidney	0.381	0.160	0.322	0.130	15.0	3.5	11.7	5.7
Plasma								
M2-glu	N.D.	N.D.	N.D.	0.005	N.D.	N.D.	0.8	N.D.
M2	0.022	0.009	0.021	0.007	1.1	N.D.	1.1	0.7
M5-glu	0.022	0.005	0.010	0.007	2.0	0.4	1.3	0.8
M7	N.D.	0.009	0.015	0.006	N.D.	0.3	N.D.	N.D.
M8	0.039	0.006	0.018	0.006	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Others	0.024	0.012	0.022	0.008	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Unextractable	0.008	0.008	0.009	0.007	0.3	0.3	0.3	0.3
Total of plasma	0.115	0.050	0.095	0.046	3.4	0.9	3.6	1.7

Data represents the mean value of 3 rats. N.D.: Not Detected.

推定代謝経路

プロフルトリン RTZ のラットにおける推定主要代謝経路を **Figure 1-17** に示す。主要代謝経路はエステル結合の開裂、ベンゼン環 4 位メチル基の水酸化および更なる酸化、グルクロン酸抱合またはメルカプツール酸抱合であった。また、シクロプロパン環 2 位メチル基の酸化代謝物や、プロペニル基のエポキシ化に続くジオール体代謝物も検出された。

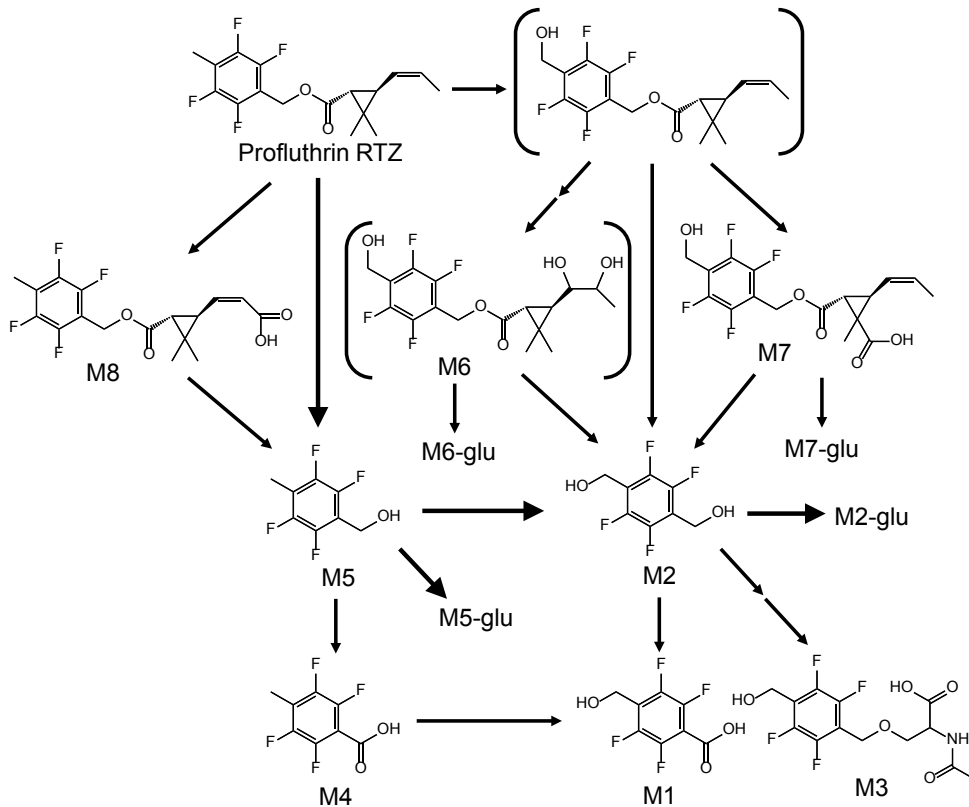


Figure 1-17 Proposed metabolic pathways of profluthrin RTZ in rats.

1.2.3 小括

プロフルトリン RTZ の動態・代謝プロファイルについて、顕著な性差や用量差は認められなかった。1.2.2 に記載の通り、投与された[alcohol-¹⁴C]プロフルトリン RTZ は投与後 48 時間以内に大部分が排泄され、その割合は尿でおよそ 60~70%、糞でおよそ 20~40%であった。胆管カニューレションラットにおいては、糞中に排泄された放射能の全量が未変化体由来であり、胆汁中の代謝物の大部分は無処置ラットの尿に存在した代謝物と同様であったことから、無処置ラットの糞中で認められた M7 は、胆汁を介して糞中に排泄されたものであることが示唆された。1.1.3 にてメトフルトリンに関して記載の通り、通常は尿、胆汁および消化管内容物を除く残屍体に含まれる放射能の合計値を吸収率として扱うが、今回の検討においては、胆管カニューレションラットにおいて無処置ラットよりも多くの糞中未変化体が検出されており、胆管カニューレション処置により吸収率が低下している可能性が考えられた。この点についても 1.1.3 に前述した通り、胆管カニューレション処置により胆汁中の成分が欠

如したために消化管での化合物の吸収率が低下した可能性が考えられ、従って今回の検討では、無処置ラットにおける総放射能から糞中未変化体を差し引いて吸収率を評価するのが適切と考えられた。即ち、プロフルトリンの消化管吸収率は、低用量で70%程度、高用量で60%程度と見積もられた。なお、低用量と高用量の動態パラメータを比較したところ、 C_{max} および AUC が高用量でそれぞれ 24~43 倍および 32~53 倍と、実際の投与量の差 (60 倍) を下回っていることから、高用量において若干の吸収の飽和が生じているものと考えられた。

低用量群と高用量群の代謝物を比較した場合、M1、M2-glu、M2、M3、M4、M5-glu、M7 および M7-glu 等、ベンゼン環 4 位の酸化代謝物の生成量が高用量群で減少した。詳細は検討していないが、高用量において酸化反応の飽和が生じた可能性が考えられた。一方、糞および尿中に唯一存在するエステル保持代謝物である M7 およびそのグルクロン酸抱合体の生成量を評価した場合、その割合は低用量群で高かった。その理由として、高用量にて 4 位酸化体の生成量が減少し、排泄に直結する極性化反応の優位性が低下したため、エステル開裂の割合が増加した可能性が考えられた。

今回、プロフルトリン RTZ の代謝においてもメトフルトリンと同様に、メルカプツール酸抱合体である M7 が検出された。前述の通り、ベンジル位の置換反応についても過去に報告があり^[29,30]、プロフルトリン RTZ においても同様の機構により代謝物が生成したものと推測された。

プロフルトリンに関しては、アルコール側を ^{14}C 標識した被験物質のみを用いて検討を行っており、酸側標識体を用いた検討は実施しなかった。プロフルトリンの酸側はメトフルトリンと同じ 2,2-dimethyl-3-(1-propenyl)-cyclopropanecarboxylic acid であり、エステル結合が開裂した後の代謝反応についてはメトフルトリンの代謝試験により既に検討済みであるものと判断した。

第 1-3 節 考察

上述の通り、メトフルトリンおよびプロフルトリンのラットにおける代謝および動態を明らかにした。メトフルトリン RTZ とプロフルトリン RTZ を比較した場合、構造的

な違いはベンゼン環 4 位のメトキシメチル基およびメチル基の差のみであり、物理化学的性質も類似している点が多い^[16,17]。これら 2 化合物の消化管からの吸収および排泄はいずれも速やかであり、投与から 48 時間以内に投与したほぼ全量が体外へ排泄された。全血中・血漿中濃度推移パラメータを同用量 (1 mg/kg) にて比較した場合にも、 T_{max} 、 $T_{1/2}$ および AUC はいずれも両化合物で概ね同様の値を示し、これら 2 化合物が類似した体内動態を示すことが明らかとなった。メトフルトリン RTZ において、主要な代謝経路はエステル結合の開裂およびそれに続くプロペニル基末端・シクロプロパン 2 位メチル基あるいはアルコール側水酸基の酸化や、アルコール側メトキシ基の脱メチル化、酸側二重結合の還元、その他抱合等であった。一方、プロフルトリン RTZ においても代謝パターンは概ね同様の傾向を示し、大部分はエステル結合の開裂を受けた後、酸化や抱合等の代謝を受けた。化合物特有なアルコール側代謝物として、メトフルトリン RTZ でエステル結合開裂後に脱メチル化されず抱合を受けた MA11-glu が投与量の 15% 前後、またプロフルトリン RTZ でエステル結合開裂後にメチル基が酸化されず抱合を受けた M5-glu が投与量の 30% 前後、それぞれ認められた (Figure 1-18)。これらを除けば、メトフルトリン RTZ ではエステル結合開裂後の脱メチル化、プロフルトリン RTZ ではエステル結合開裂後の酸化がいずれも主要代謝経路であり、さらにエステル結合開裂後の酸側代謝物は両化合物で共通である。このように、両化合物で特有な構造についても代謝経路が類似するため排泄は速やかであり、また共通する中間体までの代謝が両化合物とも速やかであったことが、これら 2 化合物の分布・排泄の同等性に大きく寄与しているものと考えられた。

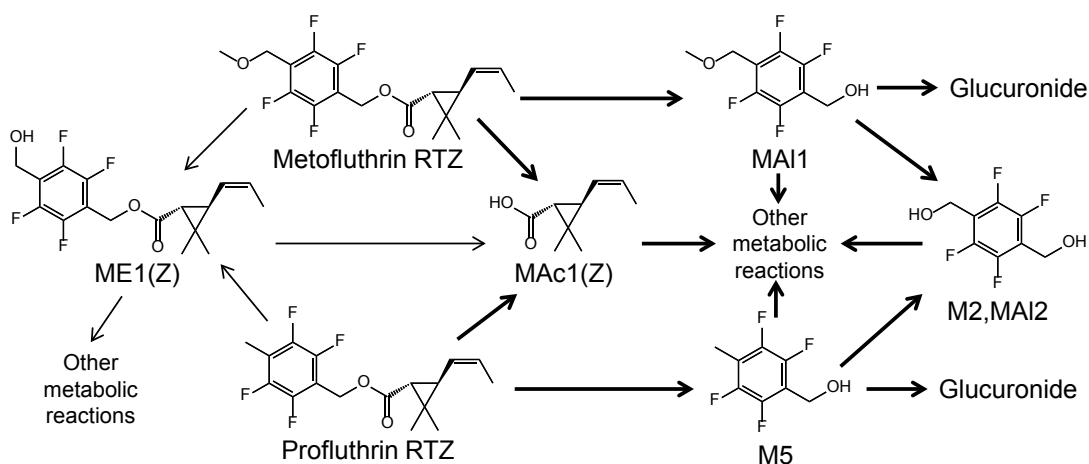


Figure 1-18 Compound specific and common metabolic pathways for metofluthrin RTZ and profluthrin RTZ.

合成ピレスロイド化合物については一般的に、エステル結合の開裂およびそれに続く酸化またはグルクロン酸抱合が主要な代謝経路とされている^[10,12,47]。メトフルトリン RTZ および RTE ならびにプロフルトリン RTZ においても同様に、糞および尿中に排泄された代謝物（未変化体を除く）の大部分がエステル開裂代謝物であり、エステル結合を保持した代謝物は多くても 10%程度と限定的であった。過去の報告により、アルコール側の α 位にシアノ基を有する II 型ピレスロイドは α 位にシアノ基を持たない I 型ピレスロイドと比較してエステル開裂が生じにくい傾向を持つことが明らかとなっている^[10,12,48]。上記の原因については未だ解明されていないが、恐らくはエステラーゼの近接性の差が寄与する部分の大きいものと推察される。加えて、シクロプロパン環の 1 位および 3 位の立体配置もエステラーゼ活性に影響を与えることが判明しており、一般的に *trans* 体化合物の方が対応する *cis* 体化合物と比較してエステル開裂を受けやすいとされる^[49,50]。メトフルトリンおよびプロフルトリンはいずれもアルコール側の α 位にシアノ基を持たず、またシクロプロパン環上の置換基が *trans* の配置を有するため、加水分解が比較して容易であると推測され、上記の結果はこれと一致するものと考えられた。

また本試験において、エステル結合開裂後の酸側の代謝についても従来のピレスロイド系化合物と比較した。本章の冒頭で述べた通り、これまでに数多くの種類のピレスロイド系化合物が開発されており、そのうち多くの化合物でラットにおける動態が明らかにされている。プラレスリン、フェノスリン、テトラメスリンおよびイミプロスリン等、多くのピレスロイド系化合物において、酸側には元々天然成分として発見された菊酸 (2,2-dimethyl-3-(2-methyl-1-propenyl)-cyclopropanecarboxylic acid) が共通構造として存在する (Figure 1-19)。菊酸の代謝経路は古くから研究が進められており、主要代謝経路は末端メチル基の酸化によるヒドロキシル体の生成およびそれに続くカルボン酸体またはグルクロン酸抱合体の生成であることが明らかになっている^[10,48-51] (Figure 1-20)。メトフルトリンの酸側構造 (2,2-dimethyl-3-(1-propenyl)-cyclopropanecarboxylic acid) は菊酸と極めて類似しており、その差はプロペニル基 2 位のメチル基の有無のみであるが、過去にその代謝について検討されていなかった。本研究の結果、菊酸で主要経路であった末端メチル基の酸化に加え、特有な代謝物として二重結合のエポキシ化や還元、あるいはシクロプロパン環 2 位のメチル基の酸化、さらにこれら反応に続く複数の代謝反応が検出され、*Z* 体・*E* 体とも菊酸と比較してより多様な代謝を受け得る構造であること

が明らかとなった。

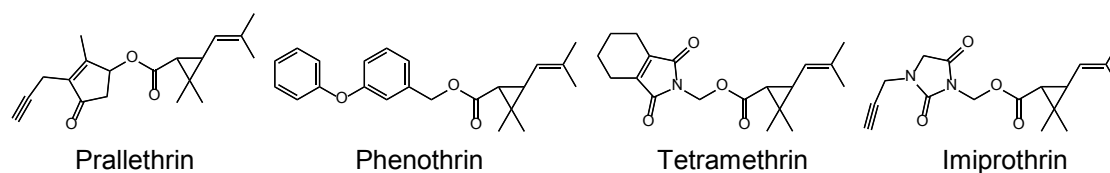


Figure 1-19 Structures of prallethrin, phenothrin, tetramethrin and imiprothrin.

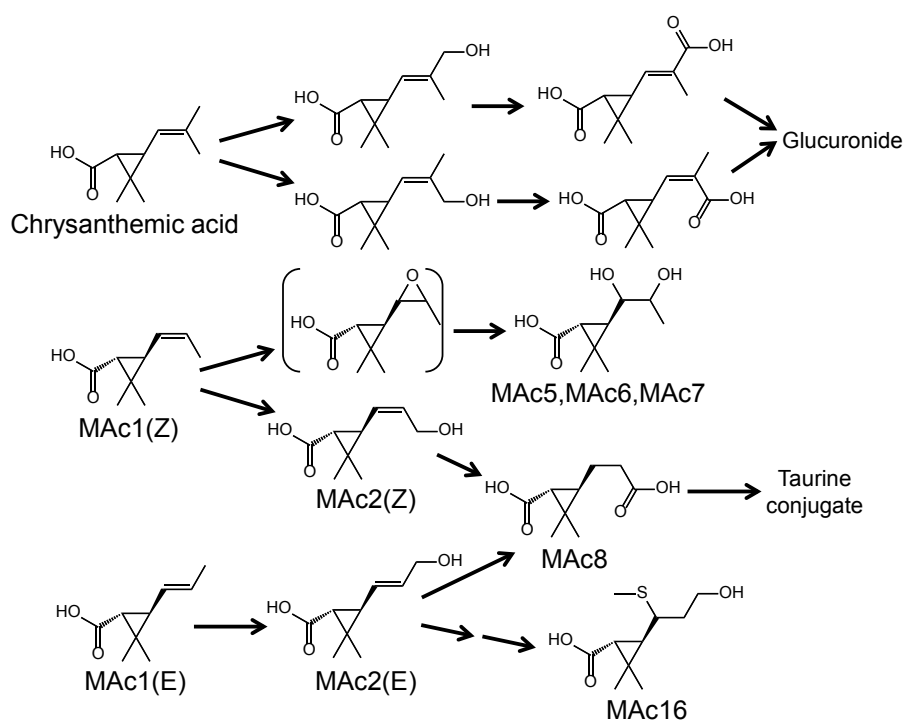


Figure 1-20 Typical metabolic pathways for chrysanthemic acid and the acid side metabolites of metofluthrin and profluthrin.

一般に、化合物の毒性について評価する場合には、化合物自体の毒性に対する活性と合わせて、体内での暴露量、即ち血漿中濃度推移や標的組織における濃度が重要とされる。メトフルトリン RTZ および RTE のラット代謝に関しては、吸収・分布・代謝および排泄のいずれについても顕著な性差は認められず、特に血中濃度推移において、 T_{max} や AUC 等暴露量の指標になるパラメータに性差や異性体差は認められなかった。メトフルトリンの毒性については過去に概要の報告があるが^[16]、急性毒性、亜急性毒性および慢性毒性に性差は認められておらず、今回得られた体内動態に関する結果と合致するものと考えられた。またプロフルトリンの動態に関しても同様に、本研究では C_{max} および AUC に顕著な性差は認められなかった。ラットにおけるプロフルトリンの毒性に関して^[17]、急性、亜急性および慢性毒性等の試験で顕著な雌雄差は認められておらず、

これは動態に雌雄差がないことと合致しているものと考えられた。

ピレスロイド系化合物の昆虫における作用機序は、神経軸索に存在するナトリウムイオンチャンネルを持続的に開いて脱分極を生じさせ、異常興奮を誘起することに起因する。これは哺乳動物における主な毒性機序と共通しているが、哺乳動物ではエステル開裂や酸化等の代謝が速やかなため、昆虫と比較して神経毒性は生じにくく、従って哺乳動物に対して低毒性で安全な殺虫剤として扱われてきた^[10]。実際、ピレスロイド系化合物によりヒトで神経症状がみられるケースは極めて稀であり、症状が生じた場合にもその原因の大部分が誤飲や誤った使用方法によるものとされる^[15]。一方で、ピレスロイド系化合物は農業用のみならず家庭用途での使用も多く、人間が日常生活を営む上で接する機会が多い化合物群であり、またその作用機序から主に神経症状等の短期毒性について評価が必要と考えられてきた。そのため、化合物ごとの毒性の評価に加え、神経毒性と構造の相関に関する研究や、実環境中でヒトが暴露あるいは摂取する量のシミュレーション、さらに暴露した場合の体内動態の予測に関する研究等が数多く存在する。例えば、毒性と構造の相関については、前述したピレスロイドの区分により神経毒性の傾向が異なることが明らかになっており、アルコール側の α 位にシアノ基を持たない Type I の化合物では振戦が主にみられるのに対し、シアノ基を有する Type II では振戦に加え硬直性痙攣や流涎等の症状が主に発現することが報告されている^[15,52-54]。また、異性体と毒性の関係についても研究され、例えば酸側が 1*R*, *cis* 配置である場合には他の異性体と比べて毒性が強く、またアルコール側に α -cyano-3-phenoxybenzyl alcohol を持つ化合物ではシアノ基が *S* 配置である場合に毒性が強いといった報告がある^[15]。実環境中での暴露量について農業用途で考えた場合、圃場にて使用されたピレスロイド系化合物が作物を介して一般消費者に取り込まれる量は、環境中での分解も速やかであるため極微量で、従って主に農薬として散布する作業員あるいは家庭用途で使用する場合の居住者の暴露量を主に考慮するのが妥当と考えられる。これについては化合物の安全性を適切に評価する上で重要度が高いため、暴露量を算定するモデルや実暴露量を見積もる模擬試験系が開発され、化合物を登録する際の評価に利用されている^[52]。さらに、ヒトが暴露を受けた際の体内動態の評価についても研究が進んでいる。緒論にて述べた PBPK 技術は、特に医薬品開発において、特殊な病態を持つ患者や酵素・トランスポーターの個人差・人種差等を考慮するための動態予測に用いられてきたが、近年ではこの技術が種を超え

た動態の予測に用いられつつある。例えば同じくピレスロイド系化合物の一つであるデルタメスリン (**Figure 1-21**) について、ラット *in vivo* にて代謝に主に関与する CYP およびエステラーゼの分子種を特定し、さらに *in vitro* 試験にてそれら酵素のヒトおよびラットにおける K_m や V_{max} を求めた上で、これらの値が PBPK モデル計算に利用され、結果としてヒトでの動態が正確に予測されている^[55-58]。こうして得られた化合物の予測体内濃度は、実験動物における毒性試験の結果と合わせてヒトで毒性が発現する可能性の評価に用いることが可能である。ここまで述べたような短期毒性に限らず、長期的な毒性においても代謝は関与し、ヒトでの安全性を評価する上での主要素となることがある。一部ピレスロイド系化合物については、急性毒性以外にも発癌性等の慢性毒性がラットにて報告されており、例えばメトフルトリンについて、高用量で長期間継続して投与された際にラットで肝臓癌の発症率を増加させるとの報告がある^[59]。投与により肝肥大がみられることから肝臓にて発現する酵素量を確認したところ、mRNA および酵素活性の両方にて、複数の CYP の誘導が確認されている。なかでも顕著な増加を示した CYP2B については constitutive androstane receptor (CAR) の活性化を介し誘導されることが明らかとなっており、これが原因となり DNA 複製の亢進および肝細胞増殖が生じ、肝細胞の発癌につながるということが解明されている^[59]。ただし、ラットでみられるこのメカニズムによる発癌はヒトでは生じないものと判断されている^[60]。同様にモンフルオロトリンに (**Figure 1-21**) ついても、ラット発癌性試験にてみられた肝発癌のメカニズムが CAR の活性化を介した CYP2B の誘導によるものであり、ヒト安全性を評価する上では発癌懸念のないものとして扱われている^[61,62]。

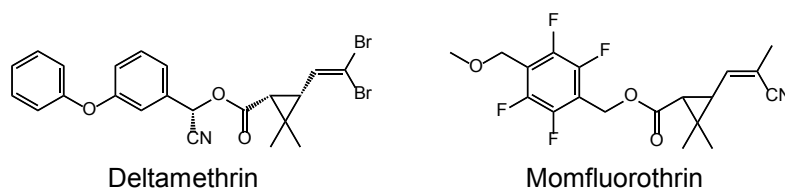


Figure 1-21 Structures of deltamethrin and momfluorothrin.

上記の通り、ピレスロイド系化合物等の急性毒性を主な毒性とする化合物についてヒトでの毒性を予測する上で、毒性に対する活性と合わせて投与後の短期的な暴露量を正確に把握することは特に重要であると考えられた。ヒト体内動態の予測方法として PBPK が一般的になりつつあるが、PBPK によるヒト動態予測には、ヒトおよび実験動物における *in vitro* 代謝に関するデータと共に、実験動物における代謝・動態のプロフ

ファイル全体に関する精緻な情報が必要となる。即ち、ヒト動態の正確な評価のためにも、化合物の体内挙動を実験室レベルで確認し把握する重要性は更に高まりつつあるものと考えられた。また、長期暴露により生じる毒性においても、酵素誘導等の変化が長期的な作用を及ぼし毒性を引き起こすケースが少なくないことから考えて、実験動物において毒性の発生メカニズムと合わせて化合物の代謝および動態を精緻に把握することは、ヒトでの安全性を評価する上で極めて重要と考えられた。

第2章 毒性原因物質の動態および活性種差の精査に基づくヒト安全性評価

前章において、ヒト毒性を評価し安全性を把握する上で、実験動物における毒性に対する活性と合わせて化合物の動態を正確に把握する重要性が確認された。そこで、実験動物にて毒性に種差が認められた化合物について、その動態および代謝を各動物種で確認し、毒性に関わる活性と合わせて原因物質を特定すると共に、得られたデータからヒトにおける毒性発現のリスクを評価する手法の確立を試みた。フルミオキサジン (7-fluoro-6-(3,4,5,6-tetrahydrophthalimido)-4-(2-propynyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one) はスミソーヤ®の商標名で扱われ、一年生の広葉雑草の除去に卓効を示す *N*-フェニルイミド系の除草剤である^[63]。フルミオキサジンの除草活性は、植物内での葉緑素合成に必須な酵素であるプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (PPO) の阻害に由来することが明らかとなっている。即ち、PPO の阻害により細胞内に蓄積したプロトポルフィリン IX (PPIX) が太陽光を受けることで活性酸素を生成し、これが細胞膜に損傷を与えることで除草活性を示す (Figure 2-1) ^[64,65]。

PPO は植物細胞内にてポルフィリン合成の一部を担う酵素として葉緑素の生合成に関与するが、一方で哺乳動物の細胞内にも存在しヘム合成の主要な酵素として関与していることが明らかになっている^[66]。フルミオキサジンによる哺乳動物毒性として、ラットにおける発生毒性が挙げられる^[67,68]。具体的には、妊娠ラットにフルミオキサジンを投与することで、胎児致死、あるいは心室中隔欠損 (ventricular septal defects、VSD) および波状肋骨を主とする催奇形性が生じることが報告されている。そのメカニズムは既に解明されており、フルミオキサジンが PPO を阻害することにより胎児中でのヘム合成量が低下して貧血が生じ致死となる。あるいは貧血の代償反応として心拍出量が増大するために心臓の肥大が生じ、心臓の心室中隔形成過程が遅延することで結果として心室中隔欠損が生じる (Figure 2-2) ^[65,69]。

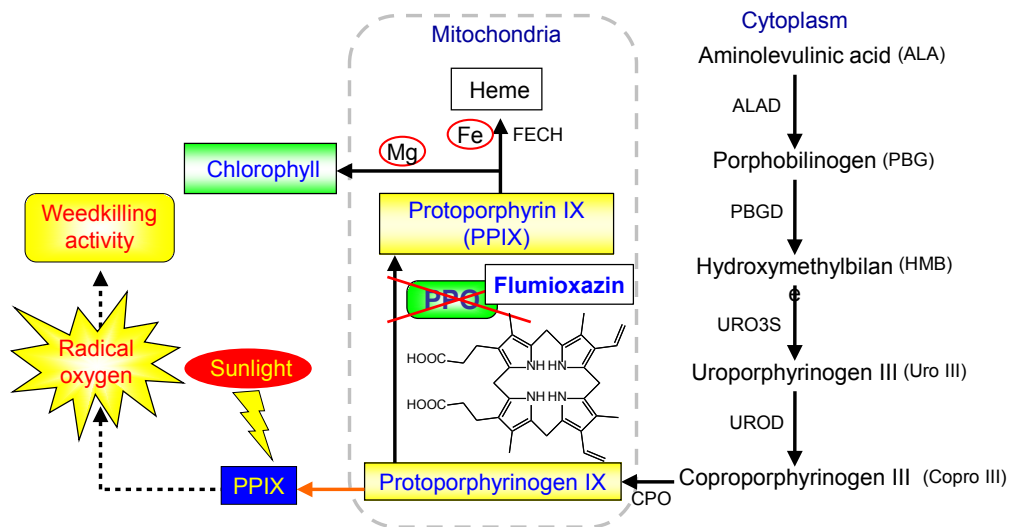


Figure 2-1 Weedkilling mechanism of flumioxazin in plant^[64,65].

ALAD: ALA dehydratase, PBGD: PBG deaminase, URO3S: Uro III synthase, UROD: Uro III decarboxylase, CPO: Copro III oxidase, PPO: Protoporphyrinogen oxidase, FECH: Ferrochelatase.

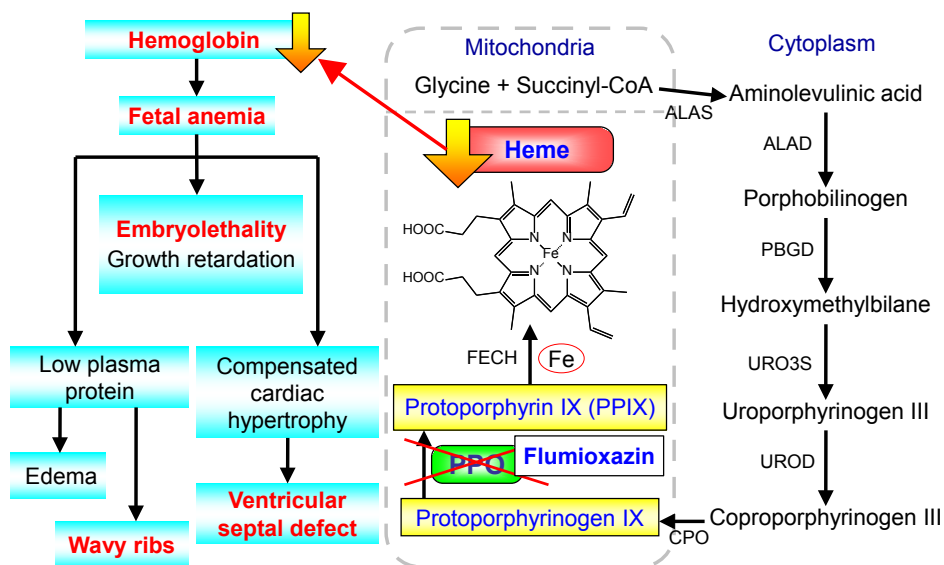


Figure 2-2 Proposed mechanism of the developmental toxicity in rats caused by flumioxazin^[65,69].

一方、PPO は全ての哺乳動物において生命活動に不可欠なヘム合成酵素の一つとして存在しているが、上述したフルミオキサジンによる発生毒性は全ての哺乳動物で生じるわけではなく、その毒性には種差があることが報告されている。具体的には、ラットにおける毒性用量である 30 mg/kg の 100 倍用量である 3,000 mg/kg で経口投与した場合にも、ウサギでは発生毒性が生じない^[67]。また、PPO 阻害の指標となる PPIX の蓄積について検討した場合にも、ラットでは胎児中に顕著な PPIX の蓄積が認められたのに対して、1,000 mg/kg で経口投与した場合にもウサギ胎児では PPIX の蓄積が確認されていな

い^[70]。同様の種差はミトコンドリア画分を用いた *in vitro* PPO 阻害実験においても確認されており、ウサギはラットと比べてフルミオキサジンに対する感受性が低かった^[71]。これら一連の先行研究より、フルミオキサジンによるラット発生毒性は PPO 阻害に起因しており、その毒性の種差は PPO 感受性の差に由来するものであると結論付けられている。一方、フルミオキサジン自体については上述の通り、毒性およびその種差に関する検討がなされてきたが、代謝物の影響についてはこれまで検討されていなかった。加えて、PPO による阻害活性の種差は従来ミトコンドリア画分を用いて検討されたが、PPO は細胞内あるいはミトコンドリア内で高度に制御され機能していることから考えると、化合物がミトコンドリア内まで到達し PPO に対して阻害活性を発揮する過程を考慮し、細胞を用いた試験系での評価がより望ましいと考えられた。過去にフルミオキサジンのラットにおける代謝については確認がされており、主な代謝物として 3-OH フルミオキサジン、4-OH フルミオキサジン、APF、AcAPFA、3-OH フルミオキサジン-SA および 4-OH フルミオキサジン-SA が代謝物として生成することが報告されている^[32,72] (Figure 2-3)。これら代謝物のうち一部は、その構造類似性や物理化学的類似性より PPO 阻害活性を持つ可能性が考えられたが、これまでその点について検討されていなかった。さらに、フルミオキサジンの妊娠ラットおよび妊娠ウサギにおける代謝や、胎児中での主要代謝物についても確認がされていなかった。

以上の状況を踏まえて本研究では、*in vivo* 代謝試験により妊娠ラットおよび妊娠ウサギにおける代謝ならびに胎児中の主要代謝物を確認すると共に、ミトコンドリア画分を用いた *in vitro* 試験によりラット体内にて代謝物の PPO 阻害活性を確認することで、ラットにおける発生毒性の活性本体を特定した。さらに、PPO がミトコンドリア内あるいは細胞内にて体系化され活性を発揮することを考慮し、細胞を用いた試験系によりラット、ウサギ、サル、ヒトにおける PPO 阻害活性の種差を確認することで、フルミオキサジンのヒトにおける安全性を評価することを試みた。

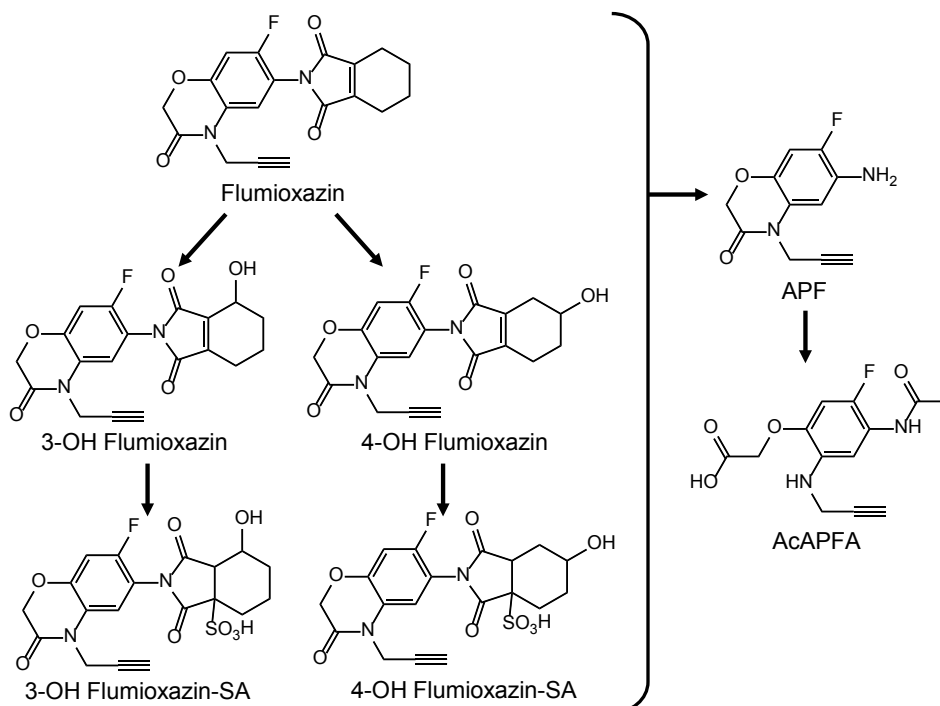


Figure 2-3 Proposed metabolic pathways of flumioxazin^[32,72].

第 2-1 節 フルミオキサジンの妊娠ラットおよび妊娠ウサギにおける代謝

2.1.1 実験方法

被験物質およびその他実験材料

[phenyl-¹⁴C]フルミオキサジン（比放射能：4.80 GBq/mmol）および非標識体のフルミオキサジン、ならびに 3-OH フルミオキサジン、4-OH フルミオキサジン、APF の代謝物標品は住友化学において合成した。AcAPFA、3-OH フルミオキサジン-SA および 4-OH フルミオキサジン-SA は既報に従い準備した^[32]。

クロマトグラフィー条件

代謝物分析のための TLC 分析は、1.1.1 に記載の手順に従った。移動相として、低極性代謝物の分離には (A) トルエン/酢酸エチル/酢酸=5:7:1 (v/v/v) または (B) トルエン/酢酸エチル/酢酸=30:70:1 (v/v/v) を用い、高極性代謝物の分離には (C) 酢酸エチル/アセトン/水/酢酸=4:1:1:1 (v/v/v/v) を用いた。

動物の飼育

妊娠した雌の SD ラット (10~12 週齢) および JW/NBIS ウサギ (6 か月齢) は日本チャールスリバーより購入し、単回経口投与試験にて使用した。妊娠した雌の Wistar Hannover ラット (10~11 週齢) および NZW ウサギ (6~7 か月齢) はそれぞれ日本クレア (東京、日本) および北山ラベス (長野、日本) より購入し、反復経口投与試験に使用した。その他、1.1.1 に記述の条件下で飼育を行い、3~7 日の検疫の後に試験に使用した。

投与液の調製および投与

単回投与試験の投与液は、[phenyl-¹⁴C]フルミオキサジンを 2.94 MBq/mg (ラット用) または 294 kBq/mg (ウサギ用) に非標識体で希釈したものを、30 mg/kg/5 mL となるようにコーンオイルに溶解し調製した。

反復投与試験の投与液は、[phenyl-¹⁴C]フルミオキサジンを 377 kBq/mg (ラット用) または 37.3 kBq/mg (ウサギ用) に非標識体で希釈したものを、30 mg/kg/5 mL となるようにコーンオイルに溶解し調製した。

単回投与試験

妊娠 12 日目のラット (4 匹/群) およびウサギ (2 匹/群) に [phenyl-¹⁴C]フルミオキサジンを 30 mg/kg の用量で単回経口投与し、1、2、4 および 24 時間後に麻酔下で腹部大動脈から全採血した後、遠心分離して血漿を得た。肝臓、腎臓、卵巣、子宮、胎盤、羊水および胎仔を摘出し、一部をサンプリングして放射能を測定した。最終時点にてサンプリングとなる動物については代謝ケージ内にて飼育し、糞および尿を得た。

反復投与試験

妊娠 6 日目のラットおよびウサギに [phenyl-¹⁴C]フルミオキサジンを 30 mg/kg/日の用量で 7 日間反復経口投与した。ラットおよびウサギ (各 3 匹) より経時的に約 400 μ L の全血を採取し、遠心分離して血漿を得た。別途、ラットについては最終投与の 7 および 24 時間後、ウサギについては最終投与の 3 および 24 時間後に各群 3 匹/時点を腹部大動脈全採血により安楽死させ、組織、全血、血漿、糞および尿を単回投与群と同様の方法で得た。

放射能測定

尿およびサンプル抽出液はシンチレーションカクテルに添加した後、液体シンチレーションカウンターにより放射能を測定した。全血、血漿、組織および各種サンプルの抽出残渣はサンプルオキシダイザーにより燃焼後、放射能を測定した。TLC プレート上の放射能の分布は、X 線フィルムに露光した後に Model M6B Processor (Kodak, NY, アメリカ合衆国) にて現像するか、あるいはイメージングプレートに転写した後にバイオイメージングアナライザー (BAS-2000II) にて画像化し、対象部分のシリカゲルを掻き取ってシンチレーターに添加することで定量した。

代謝物分析

単回投与試験においては、組織サンプルは 3 倍量のアセトニトリルと共に Polytron にて 3 回ホモジナイズした。同様に、血漿は振盪機 (タイテック、埼玉、日本) にて 2 回、糞はエクセルオートホモジナイザー (日本精機、東京、日本) にて 3 回、抽出処理を行った。なお、糞は 3 倍量の水を用いて 3 回の抽出を続けて行った。反復投与試験においては、組織は 4 倍量の水、糞は適量の水を加えた後に Physcotron ホモジナイザー (マイクロテック、千葉、日本) により均一化し、その一部をアセトニトリル/水 (1:1, v/v) により 3 回抽出した。それぞれ抽出液は濃縮した後にアセトニトリルに再溶解し、必要に応じヘキサンで洗浄を行った後、TLC 分析に供した。

2.1.2 結果

単回投与試験

[phenyl-¹⁴C]フルミオキサジンを経口投与した妊娠 12 日目のラットおよびウサギに 30 mg/kg で単回経口投与した際の糞および尿への ¹⁴C 排泄割合および代謝物分析の結果を **Table 2-1** に示す。ラットでは投与量の 75%以上が投与 24 時間以内に排泄されたのに対し、ウサギではおよそ 30%しか排泄されなかった。非妊娠ラットにおけるフルミオキサジンの主要代謝物は、3-OH フルミオキサジン、4-OH フルミオキサジン、APF、AcAPFA、3-OH フルミオキサジン-SA および 4-OH フルミオキサジン-SA であることが明らかにされている^[32]。本研究において、妊娠ラットでも同様に、これら代謝物が糞および尿

中に主要に認められた。ウサギにおいても、4-OH フルミオキサジン-SA が糞および尿中に検出されなかった点を除けば概ねラットと同様に、上記の代謝物が主要に検出された。その他、複数の未同定代謝物が検出されたが、いずれも個別には投与量の3%以下であり、また4-OH フルミオキサジンと比べてTLCクロマトグラム上で高極性であった。

Table 2-1 Amounts of total ^{14}C and identified metabolites in urine and feces of pregnant rats and rabbits excreted within 24 h after single oral administration of ^{14}C -flumioxazin at 30 mg/kg on gestational day 12.

	[% of dosed ^{14}C]			
	Rats		Rabbits	
	Urine	Feces	Urine	Feces
Extractable				
Flumioxazin	0.2 ± 0.05	38.4 ± 6.54	N.D.	12.3
3-OH flumioxazin	2.4 ± 0.50	0.6 ± 0.12	0.2	0.1
4-OH flumioxazin	1.1 ± 0.49	0.5 ± 0.08	N.D.	0.5
APF	3.4 ± 1.63	0.3 ± 0.06	0.7	N.D.
AcAPFA	2.1 ± 0.69	0.3 ± 0.05	2.3	0.2
3-OH flumioxazin-SA	2.0 ± 0.55	3.1 ± 0.71	N.D.	0.1
4-OH flumioxazin-SA	0.8 ± 0.22	1.5 ± 0.24	N.D.	N.D.
Others*	10.2	7.4	8.8	4.2
Unextractable	N.A.	2.8 ± 0.53	N.D.	0.8
Total	21.7 ± 1.80	54.9 ± 8.45	11.9	18.3

Values are expressed as mean ± standard deviation of 4 rats and mean of 2 rabbits.

N.A.: Not available. N.D.: Not detected or < 0.1 µg/g.

*: No individual metabolite exceeded 3%.

主要組織中の ^{14}C 濃度を **Table 2-2** に記す。ラットにおいて、肝臓および腎臓中の ^{14}C 濃度が高く、血漿中 ^{14}C の2~5倍であった。生殖器官を含むその他の臓器においては、 ^{14}C の濃度は血漿以下であり、ラット胎児中の ^{14}C は血漿中 ^{14}C の5分の1程度であった。全ての組織において、投与2~4時間後に最高濃度に達した後、24時間にかけて ^{14}C 濃度は減少した。ウサギにおいても同様の傾向が認められ、肝臓および腎臓で高い放射能濃度を示し、2~4時間で最高値となった後に24時間に向けて ^{14}C は減少した。

Table 2-2 ^{14}C concentration in tissues in pregnant rats and rabbits after single oral administration of ^{14}C -flumioxazin at 30 mg/kg on gestational day 12.

Time after administration	Concentration [$\mu\text{g eq. of flumioxazin/g tissue}$]			
	1 h	2 h	4 h	24 h
Rat				
Plasma	2.18 \pm 0.402	3.14 \pm 0.896	2.96 \pm 0.197	0.50 \pm 0.067
Liver	9.63 \pm 2.006	12.4 \pm 4.29	13.2 \pm 1.52	2.42 \pm 0.514
Kidney	4.96 \pm 0.654	8.69 \pm 3.143	8.28 \pm 0.097	2.05 \pm 0.369
Amniotic fluid	0.84 \pm 0.439	1.14 \pm 0.350	1.46 \pm 0.600	0.33 \pm 0.114
Ovary	2.16 \pm 0.442	2.78 \pm 1.063	2.85 \pm 0.467	0.46 \pm 0.129
Placenta	1.32 \pm 0.337	1.79 \pm 0.470	2.03 \pm 0.306	0.52 \pm 0.130
Uterus	1.59 \pm 0.670	2.42 \pm 0.583	2.29 \pm 0.366	0.54 \pm 0.142
Fetus	0.56 \pm 0.250	0.67 \pm 0.219	0.78 \pm 0.192	0.12 \pm 0.032
Rabbit				
Plasma	0.6	1.5	1.7	0.8
Liver	3.9	5.3	7.1	7.0
Kidney	2.5	10.8	14.4	5.6
Amniotic fluid	<0.1	0.2	0.2	0.3
Ovary	0.7	0.6	0.7	0.3
Placenta	0.1	0.4	0.4	0.3
Uterus	<0.2	0.8	1.0	0.9
Fetus	<0.1	0.1	0.2	0.1

Data represents the mean \pm standard deviation of 4 rats or the mean of 2 rabbits.

血漿、肝臓および胎児サンプルを抽出し、TLCにより代謝物を分析した結果を **Table 2-3** に示す。フルミオキサジンの濃度はウサギと比較してラットで高く、ラットにおける最高濃度は血漿で 0.12 $\mu\text{g/g}$ 、肝臓で 2.80 $\mu\text{g/g}$ および胎児で 0.06 $\mu\text{g/g}$ であったのに対し、ウサギではそれぞれ 0.02、0.15、および 0.02 $\mu\text{g/g}$ であった。ラット血漿中には APF が最も多く認められたが、その量はフルミオキサジンの 6 倍以下であった。ラット胎児においては 4-OH フルミオキサジン (0.07 $\mu\text{g/g}$) およびフルミオキサジン (0.06 $\mu\text{g/g}$) が高い濃度を示した。複数の未同定代謝物がラット胎児にて検出されたが、その濃度は 0.05 $\mu\text{g/g}$ よりも低く、またクロマトグラム上で 4-OH フルミオキサジンよりも高い極性を示した。

ウサギにおいては、AcAPFA を除くフルミオキサジンおよび代謝物の濃度はラットよりも常に低かった。血漿中および肝臓中で最も多く認められた代謝物はそれぞれ AcAPFA および 4-OH フルミオキサジンであった。胎児において、同定された 7 種類の化合物のうちフルミオキサジンが最も高い濃度を示した。

Table 2-3 Concentration of flumioxazin and identified metabolites in the plasma, liver and fetus of pregnant rats and rabbits after single oral administration of ¹⁴C-flumioxazin at 30 mg/kg on gestational day 12.

Time after administration	Concentration [$\mu\text{g eq. of flumioxazin/g tissue}$]							
	Rat				Rabbit			
	1 h	2 h	4 h	24 h	1 h	2 h	4 h	24 h
Plasma								
Flumioxazin	0.08	0.12	0.06	0.02	N.D.	0.01	0.02	N.D.
3-OH flumioxazin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.01	0.05	0.09	N.D.
4-OH flumioxazin	0.35	0.42	0.42	0.05	0.01	0.07	0.05	0.02
APF	0.51	0.45	0.17	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AcAPFA	0.01	0.04	0.09	N.D.	0.03	0.13	0.22	0.02
3-OH flumioxazin-SA	0.08	0.21	0.21	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4-OH flumioxazin-SA	0.03	0.10	0.10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Max other*	0.11	0.32	0.16	N.D.	0.25	0.13	0.25	0.05
Liver								
Flumioxazin	2.50	2.80	1.83	0.14	0.12	0.15	0.11	0.08
3-OH flumioxazin	0.59	0.87	0.88	0.07	0.06	0.09	0.10	0.17
4-OH flumioxazin	0.88	1.09	1.39	0.17	0.23	0.16	0.32	0.20
APF	0.14	0.28	0.27	0.03	0.05	0.07	0.08	0.05
AcAPFA	0.09	0.10	0.11	0.02	0.11	0.14	0.20	0.23
3-OH flumioxazin-SA	0.29	0.53	0.84	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4-OH flumioxazin-SA	0.09	0.13	0.19	0.01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Max other*	0.47	0.81	0.58	0.13	0.36	0.52	0.67	0.45
Fetus								
Flumioxazin	0.06	N.A.	N.A.	N.D.	N.A.	0.02	N.A.	0.01
3-OH flumioxazin	0.03	N.A.	N.A.	N.D.	N.A.	0.01	N.A.	N.D.
4-OH flumioxazin	0.07	N.A.	N.A.	0.01	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.
APF	N.D.	N.A.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.
AcAPFA	0.02	N.A.	N.A.	0.01	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.
3-OH flumioxazin-SA	N.D.	N.A.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.
4-OH flumioxazin-SA	N.D.	N.A.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.	N.A.	N.D.
Max other*	0.05	N.A.	N.A.	0.01	N.A.	0.06	N.A.	0.01

Values are expressed as the mean of 4 rats or 2 rabbits.

N.A.: Not analyzed. N.D.: Not detected or $< 0.01 \mu\text{g/g}$. *: Maximum of other single metabolite.

以上、単回投与試験において、非妊娠ラットで認められた6種類の代謝物が妊娠ラットおよび妊娠ウサギにおいても主要であり、ラット特有代謝物およびウサギ特有代謝物は主要には検出されなかった。ラット胎児における主要代謝物はフルミオキサジン、3-OH フルミオキサジンおよび4-OH フルミオキサジンであり、それらの濃度はいずれもウサギ胎児中でラットと比べて低かった。ラット胎児にて検出された未同定代謝物はいずれも量的に主要ではなく、また高極性であった。

反復投与試験

フルミオキサジンおよびその代謝物について、反復投与時の分布を調べるための検討を行った。 ^{14}C フルミオキサジンを発生毒性試験と同じ妊娠 6~12 日目の期間中、妊娠ラットおよび妊娠ウサギに 30 mg/kg/日で単回経口投与した際の糞および尿への ^{14}C 排泄割合および代謝物分析の結果を **Table 2-4** に示す。糞および尿中の代謝物のパターンは単回投与時と概ね同様であったが、投与回数を重ねるにつれて、APF、AcAPFA、3-OH フルミオキサジン-SA および 4-OH フルミオキサジン-SA の量がラット糞にて増加する傾向がみられた。

Table 2-4 Amounts of flumioxazin and identified metabolites in excreta of pregnant rats and rabbits after single and repeated oral administration of ^{14}C -flumioxazin for 3 or 7 days at 30 mg/kg/day on gestational day 6 through 12.

	[% of ^{14}C of total 7-time doses]*											
	Rats						Rabbits					
	Urine			Feces			Urine			Feces		
	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
Extractable												
Flumioxazin	0.1	0.1	0.1	1.2	1.9	2.2	N.D.	N.D.	N.D.	0.8	2.5	2.0
3-OH flumioxazin	0.5	0.5	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	N.D.	N.D.
4-OH flumioxazin	0.5	0.5	0.4	N.D.	0.1	0.1	N.D.	0.1	N.D.	0.1	N.D.	N.D.
APF	1.0	1.2	1.2	0.2	0.3	0.5	0.5	0.7	0.6	0.2	0.5	0.3
AcAPFA	0.4	0.3	0.3	0.1	0.2	0.4	0.5	0.7	0.5	0.1	0.1	0.1
3-OH flumioxazin-SA	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5	0.6	0.1	0.3	0.3	N.D.	0.1	0.1
4-OH flumioxazin-SA	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.2	N.D.	0.1	0.1
Sum of others	1.6	1.7	1.8	1.1	1.5	2.3	4.7	5.9	5.4	1.3	0.7	1.0
Unextractable	N.A.	N.A.	N.A.	1.9	3.2	4.1	N.A.	N.A.	N.A.	0.5	1.9	3.8
Total	4.5	4.7	4.7	5.1	8.1	10.7	6.0	8.0	7.1	3.1	5.9	7.4

N.A.: Not available. N.D.: Not detected or $< 0.1 \mu\text{g/g}$. Values are the mean of 3 rats or 3 rabbits.

*: Each datum represents the amount of ^{14}C excreted within 24 h after the 1st, 3rd, or 7th administration to the cumulative ^{14}C -flumioxazin dose for 7 days.

単回および反復投与時の血漿中 ^{14}C 濃度推移を **Figure 2-4** に示す。実験期間中、ラットおよびウサギの血漿中 ^{14}C 濃度は概ね同様のレベルであったが、ラットでは投与 2 回目までに濃度が平衡に達したのに対して、ウサギでは最終投与までわずかずつではあるが濃度が増加する傾向がみられた。7 回目の投与時、ラットでは 2~4 時間後、ウサギでは 6~8 時間後にかけて最高血漿中濃度を示したことから、血漿中 ^{14}C が概ね最大になると予想された最終投与の 7 時間後および 3 時間後を、それぞれラットおよびウサギの反復投与時の組織分布を確認する時点として設定した。

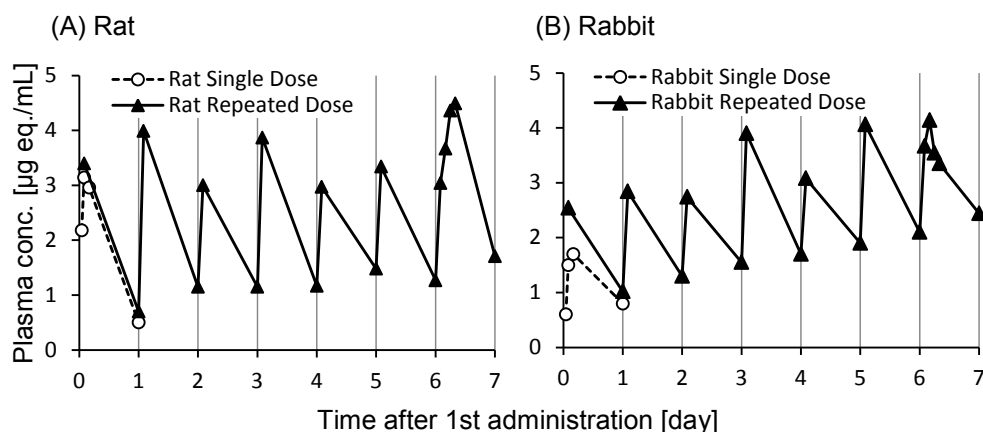


Figure 2-4 Concentrations of radioactivity in plasma of pregnant rats and rabbits after single oral administration and during repeated oral administration of flumioxazin at a daily dose of 30 mg/kg.

Data represents the mean of 4 rats (single dose), 2 rabbits (single dose), 3 rats (repeated dose) or 3 rabbits (repeated dose).

反復投与時の主要組織における ^{14}C 濃度を **Table 2-5** に示す。単回投与時と同様、ラットおよびウサギの両方において、肝臓および腎臓にて ^{14}C が高い濃度にて検出された。その他の組織では概ね血漿よりも低い濃度を示した。解剖の時点が異なるため直接の比較はできないものの、**Table 2-2** に示した単回投与時の結果と比較して、7回反復投与時の組織中 ^{14}C の濃度は概ね3倍以内であることが確認された。

Table 2-5 ^{14}C concentration in tissues of pregnant rats and rabbits at 7 or 24 h after repeated oral administration of ^{14}C -flumioxazin for 7 days at 30 mg/kg/day on gestational day 6 through 12.

Time after administration	Concentration [$\mu\text{g eq. of flumioxazin/g tissue}$]			
	Rats		Rabbits	
	7 h	24 h	3 h	24 h
Plasma	3.34 \pm 0.36	1.07 \pm 0.35	3.91 \pm 0.78	2.69 \pm 0.36
Liver	21.73 \pm 2.06	6.68 \pm 1.85	15.77 \pm 3.46	13.91 \pm 1.1
Kidney	12.03 \pm 1.99	4.81 \pm 1.23	24.37 \pm 3.69	14.56 \pm 4.31
Amniotic fluid	0.98 \pm 0.27	0.36 \pm 0.09	0.69 \pm 0.23	1.04 \pm 1.16
Ovary	3.57 \pm 0.56	1.13 \pm 0.32	1.38 \pm 0.22	2.56 \pm 2.67
Placenta	5.66 \pm 3.11	2.34 \pm 0.77	1.26 \pm 0.3	1.02 \pm 0.14
Uterus	2.96 \pm 0.53	1.03 \pm 0.3	1.73 \pm 0.38	2.51 \pm 2.09
Fetus	1.14 \pm 0.17	0.73 \pm 0.35	0.32 \pm 0.12	0.2 \pm 0.02

Data represents the mean \pm standard deviation of 3 animals.

血漿、肝臓、胎児および羊水の代謝物分析の結果を **Table 2-6** に示す。ラット胎児において、APF が他と比べて高い濃度を示した以外には、同定した代謝物は概ね同程度であり、その濃度は 0.01~0.02 $\mu\text{g/g}$ であった。ウサギ胎児ではフルミオキサジン、

APF および AcAPFA が検出され、その濃度は概ね同程度 (0.01~0.03 µg/g) であった。

Table 2-6 Concentration of flumioxazin and major metabolites in plasma, liver and fetus of pregnant rats and rabbits after repeated oral administration of ¹⁴C-flumioxazin for 7 days at 30 mg/kg/day on gestational day 6 through 12.

Time after administration	Concentration [µg eq. of flumioxazin/g tissue]			
	Rats		Rabbits	
	7 h	24 h	3 h	24 h
Plasma				
Flumioxazin	0.02	ND	ND	0.01
3-OH flumioxazin	0.08	0.03	0.03	0.02
4-OH flumioxazin	0.02	ND	0.01	0.01
APF	0.94	0.17	0.18	0.1
AcAPFA	0.13	0.02	0.13	0.07
3-OH flumioxazin-SA	0.03	0.01	0.03	0.03
4-OH flumioxazin-SA	0.02	0.01	0.02	0.02
Liver				
Flumioxazin	1.74	0.21	0.03	0.13
3-OH flumioxazin	0.54	0.13	0.01	0.03
4-OH flumioxazin	1.11	0.14	0.18	0.04
APF	2.97	0.45	0.16	0.17
AcAPFA	0.18	0.02	0.17	0.06
3-OH flumioxazin-SA	0.37	0.05	0.06	0.03
4-OH flumioxazin-SA	0.08	0.02	0.03	0.02
Fetus				
Flumioxazin	0.02	0.01	0.01	ND
3-OH flumioxazin	0.01	0.01	ND	ND
4-OH flumioxazin	0.01	ND	ND	ND
APF	0.48	0.29	0.02	0.01
AcAPFA	0.02	0.02	0.03	ND
3-OH flumioxazin-SA	0.01	0.01	ND	ND
4-OH flumioxazin-SA	0.01	0.01	ND	ND
Amniotic Fluid				
Flumioxazin	0.02	0.01	ND	ND
3-OH flumioxazin	0.07	0.03	ND	ND
4-OH flumioxazin	0.08	0.02	ND	ND
APF	0.41	0.14	0.03	0.04
AcAPFA	0.07	0.03	0.06	0.06
3-OH flumioxazin-SA	0.01	ND	ND	0.01
4-OH flumioxazin-SA	0.01	ND	ND	ND

ND: Not detected or < 0.01 µg/g. Values are expressed as the mean of 3 animals.

以上、反復投与試験の結果より、胎児形成において重要な妊娠 7~12 日のラットでは、血漿中の ¹⁴C が 7 回目の投与までに平衡状態に達することが明らかとなった。胎児中には APF が最も多く、次いでフルミオキサジンおよびその他 5 種の同定済み代

謝物 (3-OH フルミオキサジン、4-OH フルミオキサジン、AcAPFA、3-OH フルミオキサジン-SA および 4-OH フルミオキサジン-SA) が存在し、それらの濃度は概ね同程度であった。一方、ウサギ胎児では AcAPFA、APF およびフルミオキサジンが検出され、ラットでみられた他 4 種の代謝物の濃度は定量下限以下であった。

2.1.3 小括

過去、非妊娠ラットを用いた実験において、フルミオキサジンの主要代謝物は酸化体である 3-OH フルミオキサジンおよび 4-OH フルミオキサジン、イミド結合開裂体である APF、およびこれら代謝物が抱合並びに更なる代謝を受けた 3-OH フルミオキサジン-SA、4-OH フルミオキサジン-SA および AcAPFA の 6 種類であることが明らかにされている^[32,72]。まず初めに、妊娠ラットにフルミオキサジンを投与し、非妊娠ラットとの代謝の差の有無を検討したところ、糞および尿中の代謝物に妊娠による影響は認められなかった。一方、妊娠ウサギにおいても代謝経路にラットとの顕著な差はみられず、4-OH フルミオキサジン-SA を除き、前述した代謝物が同様に糞および尿中に検出された。ラット胎児中には 4-OH フルミオキサジンおよびフルミオキサジンが多く、次いで 3-OH フルミオキサジンおよび AcAPFA が認められた。ラットおよびウサギの両方で、複数の未同定代謝物が検出されたが、いずれも少量で、4-OH フルミオキサジンと比較して高極性であった。

催奇形性試験と同じ胎児形成の高感受期に反復投与した場合の代謝および分布について検討したところ、APF、AcAPFA、3-OH フルミオキサジン-SA および 4-OH フルミオキサジン-SA の糞中への排泄割合ならびに組織中 APF 濃度が増加しており、これらはアミド結合の開裂およびグルタチオン抱合に関連する酵素の誘導によるものと考えられた。フルミオキサジンの毒性に関し、そのメカニズムから考えると、胎児中のフルミオキサジンあるいはその代謝物の濃度およびそれらの活性が影響しているものと考えられる。反復投与時のラット胎児には APF が最も多く、次いでフルミオキサジン、AcAPFA、3-OH フルミオキサジン、4-OH フルミオキサジン、3-OH フルミオキサジン-SA および 4-OH フルミオキサジン-SA が同程度検出された。一方、ウサギにおいて、胎児中の主要代謝物は AcAPFA、APF およびフルミオキサジンであ

った。

第 2-2 節 フルミオキサジン・代謝物のプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ 阻害活性の比較

2.2.1 実験方法

被験物質およびその他実験材料

ラット肝ミトコンドリア画分は後述の方法により調製した。ヒト肝ミトコンドリア画分は XenoTech (KS、アメリカ合衆国) より購入した。その他の化合物は特級以上のグレードのものを使用した。

ラット肝ミトコンドリア画分の調製

ラット肝ミトコンドリア画分の調製は、既報の方法^[73]を一部改変して行った。9 週齢の Crl:CD(SD)ラット 6 匹を日本チャールスリバーより購入し、肝臓を摘出してハサミで細断した後、0.25 M スクロース、1 mM EDTA および 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む氷冷した Tris-HCl 緩衝液 (4 mM、pH 7.4) を肝臓 1 g あたり 9 mL 添加した。ポッター型ホモジナイザーにより 1,000 rpm、5 ストローク処理して均一化した後、4°C にて 700 x g で 15 分間遠心した。上清を別のチューブに移し、さらに 4°C にて 7,000 x g で 15 分間遠心した。上清を取り除き、沈殿物を 4 倍量の緩衝液に懸濁させた後、再度遠心して洗浄した。再懸濁させたサンプルは 0.5 mL ずつ分注し、-80°C にて保存した。調製したミトコンドリア画分に含まれるタンパク量は、BCA Protein Assay キット (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した。

プロトポルフィリノーゲン IX の調製

6 mg のプロトポルフィリン IX (PPIX) を既報の手順^[74]にて溶解した後、窒素気流下にておよそ 1 g のナトリウムアマルガムを添加した。反応液が茶褐色から無色に変化した後、2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を 0.5 mL 添加し、セルロースアセテートフィルター (0.45 µm 孔径、Merck) にて未反応の PPIX を除去した。調製したプロトポルフィリノーゲン IX は液体窒素にて保管した。調製したプロトポルフィリノーゲン

IX 溶液は、後述する手法において、十分量 (1 mg/mL) のミトコンドリアを添加した際の平衡蛍光強度より、その濃度は 1,237 μM と算出された。

肝ミトコンドリア画分を用いた PPO 阻害実験

化合物による PPO 阻害実験は既報に従い実施した^[73-75]。被験物質および終濃度 0.25 mg protein/mL のミトコンドリアを含む 0.1% Triton-X、1 mM EDTA および 40 mM アスコルビン酸含有 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を 96-well プレートに 50 μL /well ずつ添加した。プロトポルフィリノーゲン IX の自動酸化を補正するためのバックグラウンドサンプルとして、ミトコンドリアを 80°C にて 15 分間熱処理し失活させたサンプルを同様に処理し得られた値を全てのサンプルから差し引いた。サンプルを 37°C にて 10 分間プレインキュベートした後、15 μM プロトポルフィリノーゲン IX 溶液を 50 μL ずつ各 well に添加し、プレートリーダー (Safire II, Tecan Group Ltd., Männedorf, スイス) 内にて 37°C でインキュベートしながら励起波長 410 nm、検出波長 630 nm にて PPIX 由来の蛍光強度を 1 分間隔で 60 分間測定した。別途、0.25、0.5、1 および 2 μM の PPIX 溶液を調製し、得られた蛍光強度にて PPIX の検量線を作成した。

PPO 活性の算出

上記アッセイにて得られた時点ごとの蛍光強度より、PPIX 濃度の時間あたりの生成量を算出した。溶媒コントロールサンプルを阻害がない活性 100% として、相対的な PPO 活性を各サンプルについて算出した。横軸に化合物濃度、縦軸に相対 PPO 活性をプロットしたグラフを作成し、1/Y の重み付け条件下で 4 パラメータシグモイド阻害曲線を GraphPad Prism Ver.5 (GraphPad Software Inc., CA, アメリカ) を用いてフィッティングさせることで、 IC_{50} 値を算出した。なお、本検討における IC_{50} 値とは、シグモイドの上部平衡と下部平衡の中間を示す濃度 (EC_{50}) ではなく、上述した失活ミトコンドリアサンプルの速度を 0%、溶媒コントロールを 100% とした相対値の 50% を示す濃度として算出した。

2.2.2 結果

得られたデータより PPIX 生成速度を求めるのに際し、単位時間あたりの PPIX 生

成量を算出するのに適した時点を選択した。代表的な蛍光強度-時間曲線を **Figure 2-5** に示す。ラット・ヒト共に、蛍光強度は基質添加から 60 分後まで増加傾向を示し、特に開始から 30~40 分後にかけてその増加は直線的であったことから、この 2 時点における蛍光強度より PPO 活性を測定することとした。

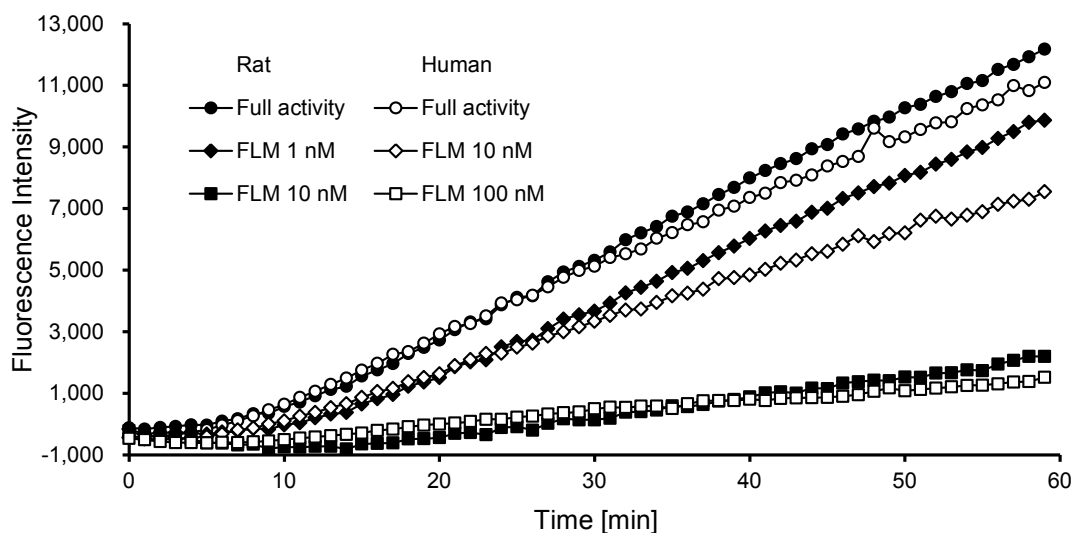


Figure 2-5 Typical fluorescence-time curves in protoporphyrinogen oxidase (PPO) inhibitory assays using rat and human mitochondrial fractions.

Background (values of auto-oxidation obtained with heat-denatured mitochondria) was subtracted from each group. FLM: Flumioxazin.

ラットおよびヒトミトコンドリア画分におけるフルミオキサジンおよび代謝物の阻害曲線を **Figure 2-6** に示す。ラットミトコンドリア画分において、PPO 阻害活性はフルミオキサジンが最も強く、その IC_{50} は 4.58 nM であった。次いで 3-OH フルミオキサジンおよび 4-OH フルミオキサジンが強い活性を持ち、それぞれ IC_{50} は 63.8 nM および 685 nM であり、フルミオキサジンの 14.0 倍および 150 倍の濃度であった。ヒトミトコンドリアにおいても同様に、フルミオキサジンが最も強い PPO 阻害能を持ち、 IC_{50} は 20.9 nM であった。3-OH フルミオキサジンおよび 4-OH フルミオキサジンの IC_{50} はそれぞれ 104 nM および 893 nM であり、フルミオキサジンの 4.97 倍および 42.8 倍の濃度であった。APF はラットおよびヒトの両方で PPO に対して阻害活性を示さなかった。ラットとヒトの結果を比較した場合、フルミオキサジンはラット PPO に対してヒト PPO よりも 4.56 倍低い濃度で阻害を示した。

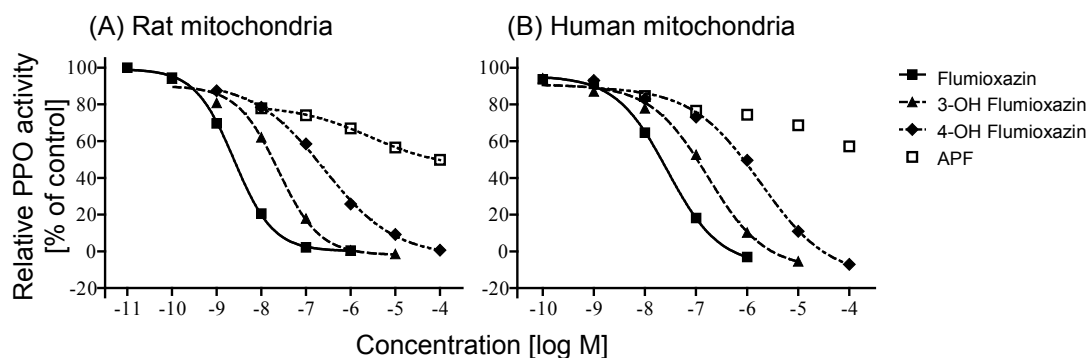


Figure 2-6 Inhibitory curves of flumioxazin, 3-OH flumioxazin, 4-OH flumioxazin and APF against protoporphyrinogen oxidase (PPO).

Points represent the mean of 3 individual experiments.

2.2.3 小括

ラットおよびヒトにおける PPO に対する阻害活性は、フルミオキサジン、3-OH フルミオキサジン、4-OH フルミオキサジンの順に強かった。一般的に化合物の毒性は、標的組織における原因物質の暴露量 (TK) と化合物に対する感受性 (TD) の積により発現するものと表現される。前節において、ラット胎児中にはフルミオキサジンおよびこれら水酸化体が概ね同程度存在していたことから、ミトコンドリアにおける PPO 阻害活性の差と合わせ、ラット体内における 3-OH 体および 4-OH 体の寄与はそれぞれフルミオキサジンの 10 分の 1 以下および 100 分の 1 以下であり、催奇形性の原因物質はフルミオキサジン自体であることが明らかとなった。また、フルミオキサジンと代謝物について IC_{50} を比較した場合、その阻害濃度の相対的な差はラットとヒトで同程度であり、3-OH フルミオキサジンで数倍～十数倍、4-OH フルミオキサジンで数十倍～百数十倍であったことから、フルミオキサジンおよびこれら水酸化体の阻害活性の相対比は種を超えて同程度であることが示唆された。

第 2-3 節 フルミオキサジンの初代肝細胞を用いたプロトポルフィリノーゲン オキシダーゼ阻害能の評価

2.3.1 実験方法

被験物質およびその他実験材料

ラット (SD、雌、1 lot)、サル (Cynomolgus、雌、1 lot) の凍結肝細胞は、Biopredic International (Saint-Gregoire、フランス) より購入した。ウサギ (NZW、雌、1 lot) およびヒト (Caucasian、雌、3 lot) の肝細胞は、それぞれ Cellz Direct (NC、アメリカ合衆国) および Celsis IVT (MD、アメリカ合衆国) より購入し使用した。細胞融解用培地 (Leibovitz L15 Glutamax 1 medium) および細胞播種用培地 (Williams E Glutamax 1 medium) はいずれも Thermo Fisher より購入した。その他の試薬は特級以上のものを使用した。

細胞の準備および化合物の添加

初代凍結肝細胞の融解および培養は既報の手法^[76,77]を元に、一部改変して行った。初代凍結肝細胞は水浴 (37°C) にて融解し、直ちに 30 mL の融解用培地 (Leibovitz L15 Glutamax 1 medium) に添加した。室温にて 160 x g で 5 分間遠心し、上清を除去した後、10 mL の播種用培地 (Williams E Glutamax 1 medium、終濃度 100 IU/mL のペニシリン、100 µg/mL のストレプトマイシン、4 µg/mL のウシ由来インスリンおよび 10% v/v のウシ胎児血清を含む) にて再懸濁した。細胞密度を 0.5×10^6 cells/mL に調整したものを 0.5 mL/well ずつ 24-well プレートに播種し、24 時間培養した。播種用培地を除去した後、暴露用培地 (播種用培地に、ウシ胎児血清に代わって 50 µM hydrocortisone hemisuccinate を加えたもの) に終濃度 0、0.01、0.03、0.1 および 0.3 µg/mL のフルミオキサジンを添加し、これを 0.5 mL ずつ well に添加した。上記、フルミオキサジンは 1 試験につき濃度あたり 6 well 以上設定し、同様の試験を 3 回実施してデータを得た。

肝細胞からの PPIX の抽出および精製

細胞を 24 時間培養した後、既報の方法^[70]を一部変更して細胞を処理した。培地を除去した後、リン酸緩衝生理食塩水により 3 回細胞を洗浄した。塩基メタノール (メ

メタノール/0.1 M アンモニア水=9/1、v/v) を添加して PPIX を抽出した後、細胞を掻き取り、抽出液と合わせて別のチューブに移した。20 秒間攪拌し、30 秒間超音波処理した後、20,000 x g、4°Cにて 10 分間遠心し、上清から 700 μ L を別のチューブに移した。なお、残渣は 0.4 M 水酸化ナトリウム/0.4%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液を 500 μ L を添加し溶解した後、BCA Protein Assay キットを用いてタンパク濃度を測定した。回収した上清に内部標準として deuteroporphyrin IX (DP、終濃度 0.075 ng/mL) を添加した後、そのうち 500 μ L を Oasis MAX μ Elution Plate (Waters) にて精製した。まず、メタノール 400 μ L および水 400 μ L にてカラムを平衡化した後、サンプルを添加して PPIX を固相に吸着させた。5%アンモニア水 400 μ L およびメタノール 200 μ L にて洗浄後、0.2%ギ酸メタノール 75 μ L により PPIX を溶出させた。

PPIX の定量分析

固相抽出後のサンプルに含まれる PPIX 濃度を既存の方法^[78]を一部改変した手順にて分析した。分析は島津 10A シリーズ (ポンプ: LC-10ADvp、UV 検出器: SPD-10Avp、オートサンプラー: SIL-HTc、島津製作所、京都、日本) を使用し、YMC-Pack Pro C4 カラム (3 μ m、3.0 x 50 mm、YMC Co., Ltd.、京都、日本) を用いて室温で行った。移動相は A ; 0.1%ギ酸水、B ; 0.1%ギ酸アセトニトリルにて、%B=10% (0.0 分) - 10% (0.3 分) - 100% (2.0 分) - 100% (8.0 分) のグラジエント条件により、流速 0.3 mL/分で分析した。UV 吸収は 400 nm で測定した。HPLC は QTRAP 2000 質量分析計 (AB Sciex、MA、アメリカ合衆国) に接続し、電子スプレーイオン化法 (ESI) により生成した陽性イオンを SRM モードにて測定した。検出に使用した前駆イオンおよび生成イオンはそれぞれ PPIX が $m/z=563.4/504.4$ (CE=63)、DP が $m/z=511.3/452.3$ (CE=40) であった。測定に用いた MS の各パラメータは、declustering potential (DP) = 110、entrance potential (EP) = 10、collision cell potential (CXP) = 4、curtain gas (CUR) = 20、collision gas (CAD) = 5、ion spray voltage (IS) = 5500、temperature (TEM) = 550、ion source gas 1 (GS1) = 30、ion source gas 2 (GS2) = 80、interface heater (ihe) = OFF であった。以上の分析条件下で、PPIX および内部標準 (DP) はそれぞれ 4.7 分および 4.3 分に溶出した。なお、分析用のサンプルと並行して検量線サンプルを作成し分析した。これらサンプルは、被験物質を添加せずに培養した細胞を上記と同様に処理した抽出上清に、既知量の PPIX を添加して作成した。LC/MS 分析後の PPIX

および内部標準の定量は Analyst 1.4.1 (AB Sciex) により行った。

2.3.2 結果

ミトコンドリアを用いた *in vitro* アッセイにて認められた感受性の種差が、生物学的により複雑である細胞を用いた試験系でも同様にみられることを確認すべく、肝細胞を用いた実験を実施した。本アッセイ系においては、フルミオキサジンによる PPO 阻害能を PPIX の蓄積を指標として^[79-81]、ラット、ウサギ、サルおよびヒトの肝細胞を用いて評価した。

まず初めに、一般的に実験動物と比較して個体差が大きいとされるヒトについて、肝細胞が示す PPO 阻害の個体差について評価した。フルミオキサジン添加による PPIX 蓄積について、3 種の個体ロットから取得した結果を **Figure 2-7** に示す。化合物未添加時の PPIX 濃度の平均は 180 pg/mg protein で、3 ロットのばらつきは平均±50% の範囲内に収束しており、個体差は顕著ではなかった。また、フルミオキサジンを 0.3 µg/mL で添加した際の PPIX の増加率は 3 ロットの平均で無処理時の 4.4 倍であり、ばらつきは平均±40%であったことから、PPO 阻害による PPIX の蓄積についても個体差は大きくないことが示された。

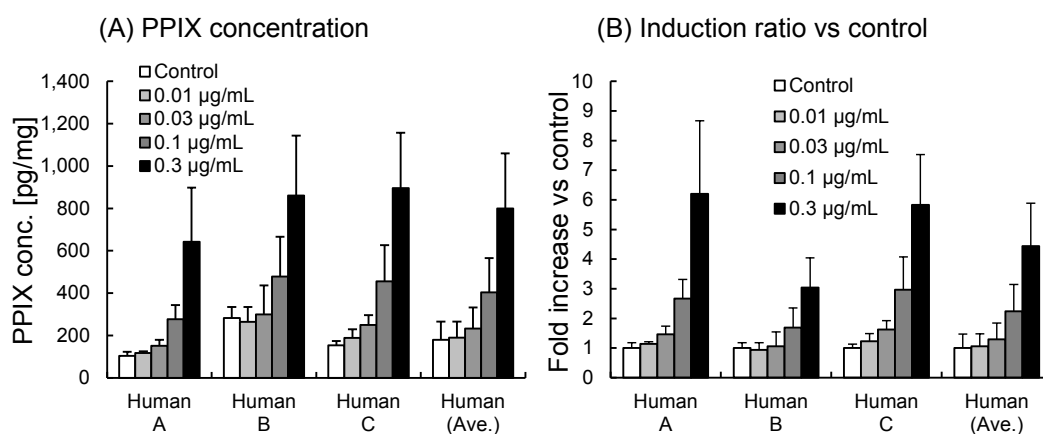


Figure 2-7 Accumulation of protoporphyrin IX (PPIX) by the flumioxazin treatment (0.01 – 0.3 µg/mL) in individual human hepatocytes. Columns and bars are mean values and standard deviations for 3 individual experiments.

ヒト 3 ロットの平均およびラット、ウサギならびにサルの計 4 動物種について、フルミオキサジンによる PPIX 蓄積を検討した結果を **Figure 2-8** に示す。ラット肝細胞

において、化合物未処理の群で PPIX 濃度は 294 pg/mg protein であったが、フルミオキサジンを 0.03、0.1 および 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で処理した際の PPIX 濃度はそれぞれ 524、1,231 および 3,007 pg/mg protein であり、概ね 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上にて用量依存的な増加を示し、最高濃度である 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では溶媒対照群の 10.2 倍まで増加した。ウサギにおいては、未処理時の PPIX 濃度は 310 pg/mg protein であり、ラットと同程度であったが、フルミオキサジンを 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加した際にもコントロールの 1.1 倍までしか増加せず、その濃度は 336 pg/mg protein であった。サルの化合物未処理時の PPIX 濃度は 42 pg/mg protein であり、ラットおよびウサギと比較して顕著に低い値であったが、サルもウサギと同様にフルミオキサジンに対する感受性は低く、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ フルミオキサジン添加時にも 57 pg/mg protein (コントロールの 1.4 倍) までしか PPIX は増加しなかった。ヒトにおいては前述の通り、未処理時の PPIX 濃度は 180 pg/mg protein で、フルミオキサジンを添加した際には概ね 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から PPIX が増加し、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加時にはコントロールの 4.4 倍まで PPIX が増加した。4 動物種を比較すると、フルミオキサジンを 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理した際の PPIX 濃度の増加はラット、ウサギ、サルおよびヒトでそれぞれ 10.2 倍、1.1 倍、1.4 倍および 4.4 倍であり、また PPIX 濃度が増加し始めるフルミオキサジン濃度はラットで 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ヒトで 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。即ち、ヒト肝細胞のフルミオキサジンに対する感受性はラット肝細胞より低く、またウサギおよびサルの肝細胞よりも高いことが示された。

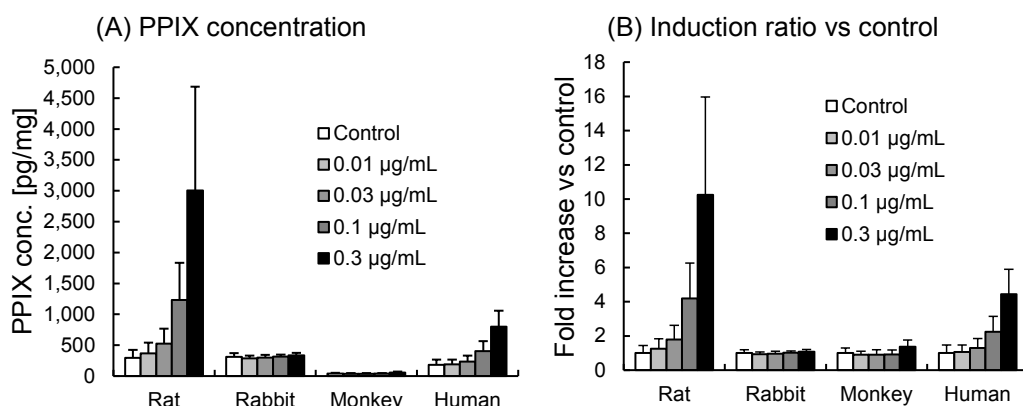


Figure 2-8 Accumulation of protoporphyrin IX (PPIX) in hepatocytes of rat, rabbit, monkey, and human by the flumioxazin treatment (0.01 – 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Columns and bars are mean values and standard deviations for 3 individual experiments (rats, rabbits and monkeys) or for 3 different lots (humans).

2.3.3 小括

ミトコンドリアより複雑な系である初代肝細胞を用いた試験により、フルミオキサジンに対する感受性の種差を検討した。その結果、検討した最高濃度である 0.3 µg/mL のフルミオキサジンの処理において、ウサギおよびサルでは PPIX が蓄積しなかったのに対し、ラットでは 10.2 倍まで PPIX が増加した。即ちヒトの感受性はラットより低く、ウサギおよびサルより高かった。

第 2-4 節 考察

前述した通り、フルミオキサジンはラットに対して 30 mg/kg の用量にて発生毒性を示す一方で、この毒性には明確な種差があることが明らかとなっている^[67]。これら毒性メカニズムについては研究が進められ^[68-71]、フルミオキサジンの PPO 阻害に由来する胎児貧血が上記毒性に関与するものとされている。さらに、毒性種差に関する検討により、フルミオキサジンによる PPO 阻害の感受性には種差があることが示されている。一方で、フルミオキサジンがラット体内で毒性を引き起こす過程には、フルミオキサジンの妊娠ラットにおける代謝あるいは標的組織である胎児への分布が重要であると考えられるが、この点についてはこれまで未検討であった。そこで今回、フルミオキサジンの妊娠ラットおよび妊娠ウサギにおける代謝プロファイルを解明し、特に胎児における未変化体および代謝物の分布を明らかにするための *in vivo* 代謝試験を実施した。その結果、妊娠ラットにおける代謝は過去に報告のあった非妊娠ラットと比較して顕著な差はなく、また妊娠ウサギと比較して妊娠ラットで特有となる代謝物は認められなかった。また、催奇形性試験と同様に妊娠 6 日目から 12 日目までフルミオキサジンを反復投与した場合にも、一部代謝物で単回投与時と比較して生成量に増加傾向がみられた他は代謝パターンに顕著な差は認められなかった。毒性評価の観点からラット胎児中の放射能分布に注目した場合、単回投与時には 3-OH フルミオキサジン、4-OH フルミオキサジン等の既知代謝物の他に複数の未同定代謝物が検出されたが、これらはいずれも量的に主要でなく、また既知の水酸化代謝物（3-OH フルミオキサジンおよび 4-OH フルミオキサジン）と比較して TLC 上で高極性であった。一般的に未変化体が酵素に対し阻害活性を示す場合、酵素タンパクに対する近接性の点から、構造的および物理化学的

に類似した代謝物が同様に活性を持つと考えられる。PPO 阻害剤に関する構造活性相関については過去に複数の報告があり^[82-84]、また PPO の立体構造に基づいたドッキングシミュレーションについても研究が進められている^[85-87]が、これら全ての論文で、PPO に対し高い結合能を持つ化合物は硫酸基等の高極性な置換基を持たず、いずれも比較的極性が低かった。このことから、ラット胎児で検出された未同定代謝物や、あるいは既知代謝物のなかでも AcAPFA、3-OH フルミオキサジン-SA および 4-OH フルミオキサジン-SA 等の高極性代謝物は PPO 阻害能を持たないものと推測された。従って本研究では、フルミオキサジンおよびフルミオキサジンと構造ならびに極性の近い 3-OH フルミオキサジン、4-OH フルミオキサジンおよび APF のいずれかが *in vivo* における毒性本体である可能性が高いものと考え以降の検討を行った。ミトコンドリア画分を用いた *in vitro* 実験において、ラットではフルミオキサジンが最も強い阻害活性を持ち、その強度は 3-OH フルミオキサジンおよび 4-OH フルミオキサジンのそれぞれ 14.0 倍および 150 倍であり、また APF は阻害活性を持たないことが示された。一般的に化合物の毒性は、標的組織における暴露量 (TK) と化合物に対する感受性 (TD) の積により発現するものと表現される。第 2-1 節にて示した通り、APF はラット胎児にて最も高い濃度を示したが、APF は PPO 阻害活性を持たず、また APF を除くとフルミオキサジンの濃度が他の主要代謝物と同程度であったことから、ラット体内における 3-OH 体および 4-OH 体の寄与はそれぞれフルミオキサジンの 10 分の 1 以下および 100 分の 1 以下であり、即ち毒性本体は代謝物ではなくフルミオキサジン本体であるものと結論付けた。なお、ヒトのミトコンドリアにおいても同様に、供試した 4 化合物のうちフルミオキサジンの阻害活性が最も強く、化合物間の強度の差はラットおよびヒトで同等であった。また、ラットとヒトを比較した場合、フルミオキサジンによる阻害に 5 倍程度の差がみられた。なお、本検討により得られたフルミオキサジンの IC₅₀ 値 (ラット 4.58 nM、ヒト 20.9 nM) は既報の値^[71] (ラット 7.15 nM、ヒト 17.3 nM) を概ね再現するものであった。

PPO はミトコンドリア内あるいは細胞内で複雑かつ組織的に存在していることが知られている。即ち、フルミオキサジンの PPO に対する近接性や阻害活性が単離したミトコンドリアで試験した場合と細胞に存在する場合とで異なる可能性が考えられた。そこで、ミトコンドリアを用いた試験でみられた PPO 阻害の種差が細胞内でも同様に認められることを確認するためさらに実験を行った。肝細胞は高いポルフィリン産生能を

持つことが知られており^[88]、従って過去にも PPO 阻害能を検討する実験に使用されている^[89]。加えて、肝細胞は均一に調製された凍結品が複数の動物種について市販されており、種差を検討するのに適していたことから、本研究では肝細胞を選択し、無処置群に対するフルミオキサジン添加時の PPIX 蓄積倍率により PPO 阻害能を評価した。その結果、フルミオキサジンの PPO 阻害に関する傾向はミトコンドリアを用いた試験と同様にラットでヒトよりも感受性が高かった。これら 2 種類の試験系は PPO 阻害によるエンドポイントが異なるため、一概に比較はできないものの、ヒトとラットによる感受性の種差を比較した場合、ミトコンドリアでは PPO 阻害の IC₅₀ の差が 4.56 倍であったのに対し、肝細胞では PPIX が顕著な蓄積を示す用量におよそ 3 倍程度(ヒト:0.3 µg/mL、ラット:0.1 µg/mL) の差があり、概ね同程度であると考えられた。これらの結果より、フルミオキサジンによる PPO 阻害に関しては PPO の細胞内での組織的な制御は大きくは影響せず、両試験系とも PPO 阻害能を適切かつ定量的に評価可能であるものと考えられた。即ち、ラットはヒトと比べて 3~5 倍程度感受性が高く、ウサギおよびサルはヒトよりさらに感受性が低いことが示された。

冒頭にも述べた通り、一般的に化合物の毒性発現には化合物に対する感受性および標的組織における化合物濃度の両方が関係しているとされる。この観点からヒトに関して評価した場合、フルミオキサジンに対する感受性はヒトの方がラットより低いことが本研究においてミトコンドリアおよび肝細胞を用いた試験系の両方にて示された。加えて、別途実施した *in vitro* 代謝試験において、フルミオキサジンの代謝はラットとヒトで定量的・定性的に同等であることが確認されており、さらにこの結果を元にした PBPK モデル解析において、ヒトとラットの胎児中のフルミオキサジン濃度は同等と推定されている^[90]。これら結果より、フルミオキサジンによる催奇形性のリスクはヒトにおいてラットよりも低いことが示された。

以上、催奇形性に種差を有する除草剤フルミオキサジンについて、実験動物における体内動態および未変化体・代謝物の活性を解明して原因物質を特定した上で、主に原因物質に対する感受性の差に基づきヒトでの毒性発現のリスクを評価した。即ち本手法により、原因物質の活性に種差がある化合物について、動態も考慮した上でヒトにおける毒性リスクを正確に評価し、安全性を担保することが可能であるものと考えられた。

第3章 ヒト肝キメラマウスを用いた動態の解明によるヒト安全性評価

一般的に毒性の種差を動態と関連付けて評価する場合、化合物あるいは代謝物に対する感受性の種差や、生成する代謝物の定量的・定性的な違いが原因である場合が多くみられる。一方で、実験動物における毒性種差のメカニズムを追究した結果、原因物質の生体内での排泄経路の差が暴露量の差の主要因となり、これが毒性に種差を引き起こす化合物が存在する。このような化合物の場合、通常実施される *in vitro* 試験による毒性感受性の種差評価や代謝の定量的・定性的な評価は *in vivo* での暴露量の種差に直結せず、従ってヒトでの安全性を評価することは困難と考えられる。このように、排泄経路の違いが暴露量の差につながり、結果として毒性に種差が生じる化合物について、ヒト肝キメラマウスを用いてカギとなる排泄経路や原因物質に対する暴露量を調べることで、ヒト安全性を評価する手法の確立を試みた。プロシミドン (*N*-(3,5-dichlorophenyl)-1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide) は商品名スミレックス®として上市されており、ブドウやモモ等の果樹や野菜類の重要病害である灰色かび病、菌核病および灰星病に卓効を示す農業用殺菌剤である^[91-94]。プロシミドンの哺乳動物における代謝経路は既に明らかにされており (Figure 3-1)、イミド環メチル基の酸化を受けて PCM-CH₂OH となった後、水酸基がさらなる酸化を受けてカルボン酸体になる経路と、水酸基がグルクロン酸抱合を受ける経路が主要代謝経路として存在する。このカルボン酸体およびグルクロン酸抱合体はいずれも水酸化体よりも極性が高く、従ってプロシミドンは主にこれらの代謝物として尿中に排泄される^[95-97]。一方、環状イミドを持つ親化合物および代謝物 (プロシミドン、PCM-CH₂OH および PCM-COOH) はイミド結合が開裂した代謝物 (PCM-NH-COOH、PA-CH₂OH および PA-COOH) と哺乳動物体内にて pH 等の要因により相互変換されているため^[98]、従って本研究においてはプロシミドンと PCM-NH-COOH を合わせて PCM、PCM-CH₂OH と PA-CH₂OH を合わせて Hydroxylated-PCM、PCM-COOH と PA-COOH を合わせて Carboxylated-PCM として扱うことにする (Figure 3-1)。

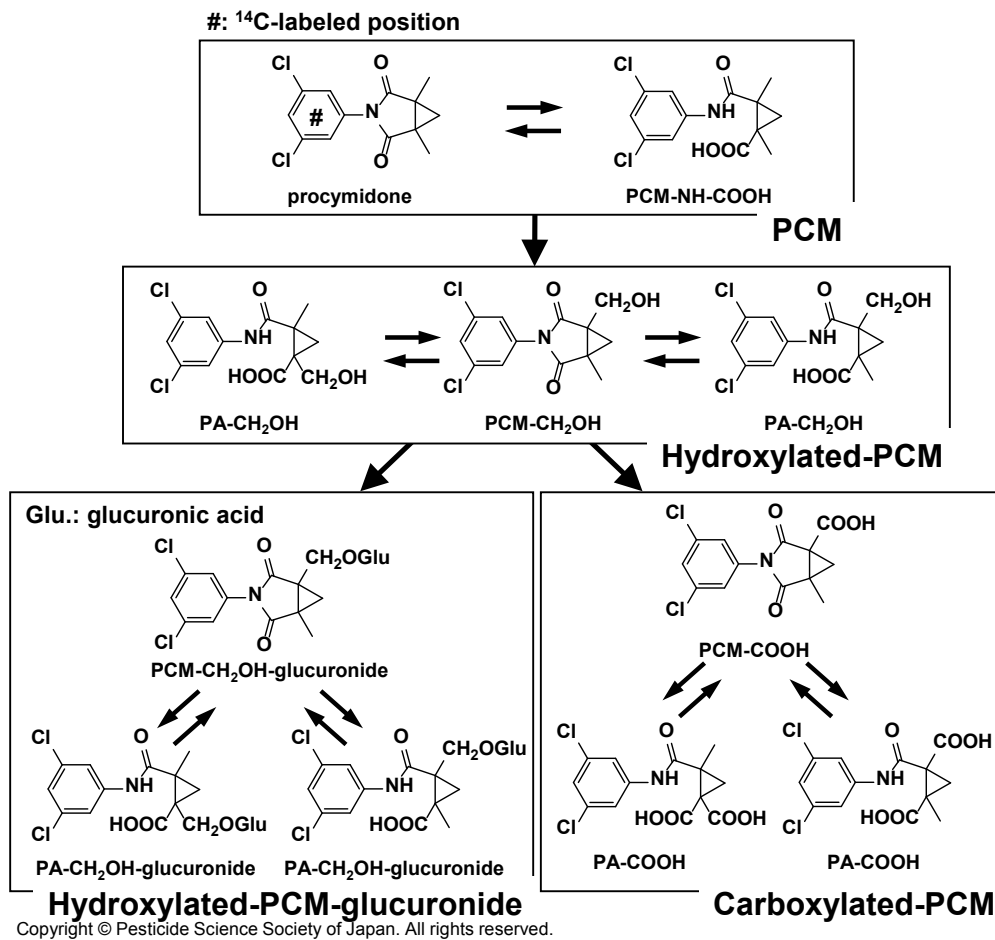


Figure 3-1 Proposed main metabolic pathways of procymidone in mammals^[95-97].

プロシミドンは世界的規模で広く用いられており、従ってその毒性については数多くの研究が行われている。主要な毒性の一つとしてラットにおける催奇形性が挙げられるが、この毒性には種差があり、ウサギやサルでは同様の毒性が認められないことが報告されている^[99-102]。この毒性種差の原因を解明するため、過去に数多くの研究が行われている^[101-106]。*in vitro* 試験にて、プロシミドンは抗アンドロゲン受容体活性を持ち、PCM-CH₂OH も比較して弱いものの同様の活性を持つことが示されている^[103,104]。また *in vivo* 代謝試験にて、ウサギやサルでは Hydroxylated-PCM が主に抱合体へと代謝され、全身血を經由して尿から速やかに排泄されることにより、結果として Hydroxylated-PCM の体内での暴露が低いのに対し (**Figure 3-2**)、ラットではウサギやサルとは異なり、抱合化された Hydroxylated-PCM が主に胆汁に排泄され、それが消化管内で脱抱合されて再吸収される腸肝循環が生じ、一方で全身循環する Hydroxylated-PCM 自体も腎臓にて再吸収を受けるため、結果として体外へ排泄されにくく高暴露となることが報告されて

いる^[101] (**Figure 3-3**)。さらに別の *in vivo* 試験にて、Hydroxylated-PCM はラット、ウサギおよびサルいずれでも胎児への移行性を持つものの、その割合が特にラットで高く、反復投与時にウサギおよびサルと比べて顕著に高い胎児中濃度を示すことが報告されている^[105]。これらの結果より、プロシミドンによる催奇形性の活性本体は Hydroxylated-PCM であり、これがラットでは抱合体となって胆汁に排泄されて腸肝循環を受け、かつ腎臓からの排泄もわずかであるため高い暴露量を示し、最終的に胎児に移行し蓄積することが催奇形性およびその種差の原因であると考えられている。一方、これらの毒性メカニズムに基づき、プロシミドンのヒトにおける毒性リスクについても研究が進められつつある^[106]。肝細胞を用いた *in vitro* 試験により、ヒトではウサギやサルと同様に Hydroxylated-PCM およびその抱合体が高い割合で生成し、またヒト肝キメラマウスを用いた *in vivo* 試験により、この抱合体が尿における主要代謝物として検出されることが確認されている。ただし、前述した催奇形性のメカニズムから考えると、Hydroxylated-PCM およびその抱合体のヒトにおける動態、とりわけ肝臓における Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体の排泄経路の振り分けは、ヒトでの毒性を見極める上で極めて重要であると考えられた。そこで本研究においては、ラット肝またはヒト肝を有するキメラマウスを用い、この点を明らかにすることを計画した。まず初めに、過去にデータが取得されているラットにおけるプロシミドンの代謝・動態と、ラット肝キメラマウスにおける代謝・動態を比較することで、キメラマウスがプロシミドンの動態を精査するのに適したモデルであることを確認した。その後、ヒト肝キメラマウスを用いて代謝試験を行い、得られたデータからヒトにおける PCM、Hydroxylated-PCM およびその他の代謝物の動態を評価することで、その毒性の懸念について考察した。

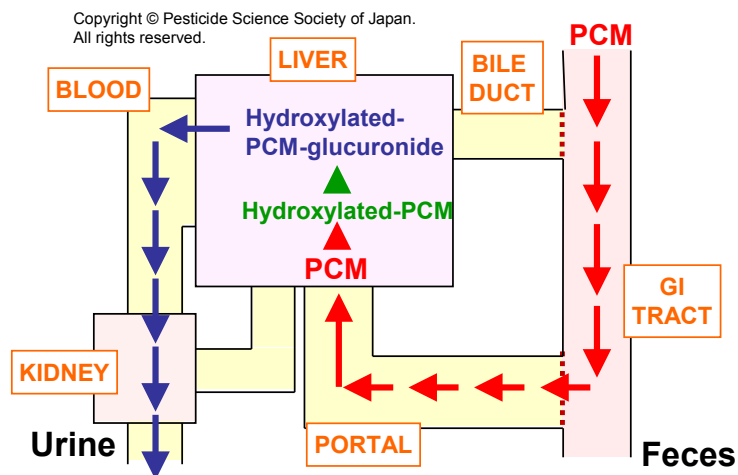


Figure 3-2 Flow diagrams of procymidone and its metabolites in rabbits and monkeys^[101].

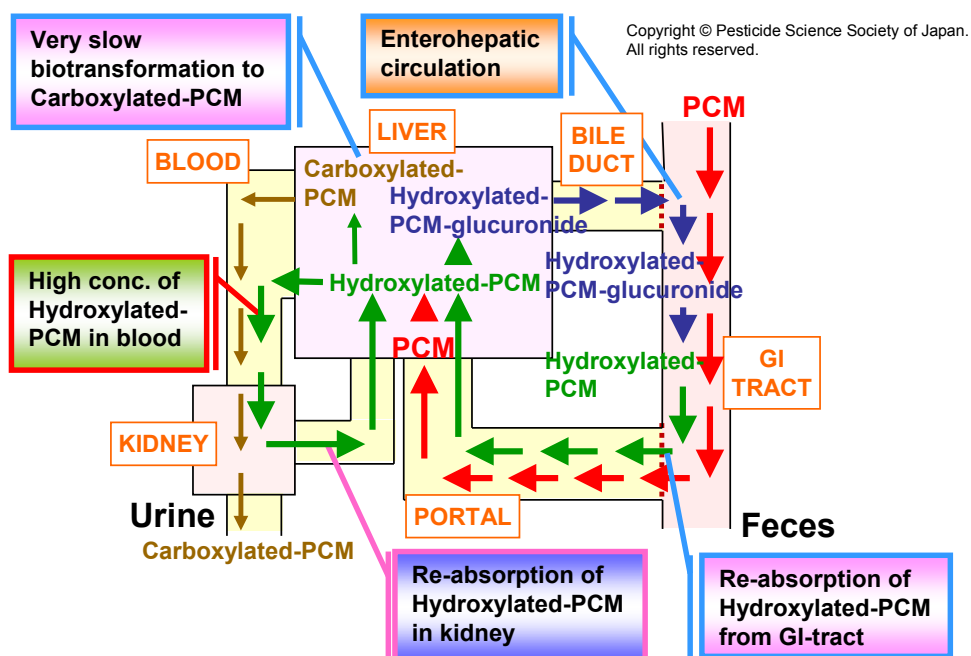


Figure 3-3 Flow diagrams of procymidone and its metabolites in rats^[101].

第3-1節 ヒト肝・ラット肝キメラマウスによるプロシミドン動態の評価

3.1.1 実験方法

被験物質およびその他実験材料

ベンゼン環の全炭素原子を均一に ^{14}C 標識したプロシミドン（比放射能：4.48 GBq/mmol）および非標識体のプロシミドンを住友化学にて合成した。また、PCM-NH-

COOH、PCM-CH₂OH、PCM-COOH、PA-CH₂OH および PA-COOH を合成し、代謝物標品として使用した。プロシミドンおよび代謝物の構造は前述した **Figure 3-1** 中に記した。他の試薬類は特級以上のものを使用した。

動物の飼育

10～14 週齢のラット肝キメラマウス 14 匹、ヒト肝キメラマウス 15 匹（いずれも雌）をフェニックスバイオ（広島、日本）より購入した。動物は室温 20～26℃、12 時間明期/12 時間暗期の照明サイクルの環境下で少なくとも 2 日間の馴化期間の後に実験に使用した。飼育期間中、固形飼料（ビタミン C 含有 CRF-1、ガンマ線滅菌済み、オリエンタル酵母、東京、日本）および飲料水を自由摂取とした。全ての動物は馴化期間中、正常な体重増加を示し、症状観察時にも異常は認められなかった。

投与液の調製および投与

¹⁴C 標識したプロシミドンを非標識体で希釈し、37.5 および 62.5 mg/150 MBq/kg/10 mL となるようにコーンオイルで溶解して投与液を調製した。ラット肝およびヒト肝キメラマウスはいずれも以下に示す 5 つの群に分け、ラット肝キメラマウスの 5 群（2 匹/群）を除き、いずれも 3 匹/群にて試験を実施した。1、2 および 5 群；低用量（37.5 mg/kg）、3 および 4 群；高用量（62.5 mg/kg）。1～4 群；血漿中濃度推移試験、2 および 4 群；吸収排泄試験、5 群；胆汁排泄試験。

血漿中 ¹⁴C 濃度推移試験（1～4 群）

馴化期間の後、¹⁴C-プロシミドンを低用量（37.5 mg/kg、1 および 2 群）および高用量（62.5 mg/kg、3 および 4 群）にてラット肝およびヒト肝キメラマウスに単回経口投与した。なお、低用量は催奇形性が確認された用量のうち最低用量、高用量は自発行動減少がみられる毒性用量より設定した。投与後、1 および 3 群はポリカーボネートケージ（175×245×125 mm）にて、また 2 および 4 群は代謝ケージ（MM-1STZ、スギヤマゲン）にて個別飼育した。1 および 3 群については投与 1、4、8 および 12 時間後、2 および 4 群については投与 2、24 および 48 時間後に眼窩静脈叢から全血約 75 μL をヘパリン処理したガラスキャピラリーに採取した。また、投与 72 時間後には 1～4 群の全てから同様に全血 250 μL を採取した。全血は 1,800 x g、4℃にて 15

分間遠心 (MX-300、トミー精工、東京、日本) し、血漿を得た。血漿 (約 10 μ L) に蒸留水 (40~90 μ L) を添加し、そのうち約 20 μ L を秤取して含まれる放射能を測定した。最大血漿中濃度 (C_{max} 、 μ g プロシミドン等量/g 血漿) および最大血漿中濃度時間 (T_{max} 、h) は実測値を採用した。血中濃度曲線下面積 (AUC_{0-72h} および AUC_{0-48h} 、 μ g プロシミドン等量 \cdot h/g 血漿) は実測値による台形法から求め、投与無限時間後までの AUC ($AUC_{0h-\infty}$) は、外挿により求めた $AUC_{72h-\infty}$ を AUC_{0-72h} に加算することにより算出した。なお、 $AUC_{72h-\infty}$ および消失半減期 ($T_{1/2}$ 、h) は消失相 (β 相) に一相性消失速度式 ($\ln 2/\alpha$) を近似外挿した際の傾き (α) から求めた。

糞・尿中 ^{14}C 排泄性試験 (2 および 4 群)

代謝ケージにて飼育したキメラマウスより、糞および尿を投与 24、48 および 72 時間後に回収した。尿の回収の度にケージ内を水で洗浄し、含まれる放射能を尿への排泄に含めた。投与 72 時間後の採血の後にキメラマウスを安楽死させ、残屍体を得た。

胆汁中 ^{14}C 排泄性試験 (5 群)

馴化後のキメラマウスに麻酔下で胆管カニューレーションを施術し、麻酔から覚醒後に ^{14}C -プロシミドンを低用量 (37.5 mg/kg) にて単回経口投与した。キメラマウスはボールマンケージに収容し、糞、尿および胆汁を投与 24 および 48 時間後に回収した。最終サンプリング後に解剖し、消化管内容物、膀胱尿およびその他の残屍体を別々に回収した。膀胱尿に含まれる放射能は尿中排泄に含めた。

代謝物分析

キメラマウスより得られた血漿、糞抽出液、尿および胆汁に含まれる代謝物の同定および定量のため、TLC 分析を実施した。シリカゲルをコートしたガラスプレート (20 x 20 cm、0.25 または 0.5 mm シリカゲル厚、Merck) にサンプルを塗布し、トルエン/ギ酸エチル/ギ酸 (5:7:1、v/v/v) を移動層として定量分析を行った。

放射能測定

尿、胆汁、膀胱尿およびケージ洗浄液は全重を測定した後に一部を秤取し、含まれる放射能を測定した。糞は 3 倍量のアセトニトリルを添加してホモジナイズし、抽出液 (約 100 mg) および抽出残渣 (約 200 mg) を別々に放射能測定した。消化管内容

物は3倍量の蒸留水を加えてホモジナイズし、約200 mgを秤取して放射能測定した。残屍体は約100 mLの3 M水酸化カリウム水溶液に溶解し、そのうち約1 gを秤取して含まれる放射能を測定した。

尿、ケージ洗浄液、胆汁、糞抽出液、残屍体溶解液等の液状サンプルは、シンチレーションカクテル (Emulsifier Scintillator Plus または Hionic Fluor) に添加した後、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb[®] 2500TR) により放射能を測定した。残屍体溶解液については、過酸化水素により脱色した後に同様に処理した。糞抽出残渣、消化管内容物等の固形サンプルは、一部を秤取し乾燥させた後、サンプルオキシダイザー (307 型、PerkinElmer) により燃焼し、¹⁴CO₂を Carbosorb および Permafluor E⁺ にトラップしたものを液体シンチレーションカウンターにより放射能測定に供した。TLC上の非標識体のスポットは、UVライト照射下にて検出してその位置をマークし、放射性スポットはイメージングプレートに転写後に蛍光イメージングアナライザー (FLA-5000、富士フィルム) にて読み取り定量した。

3.1.2 結果

血漿中 ¹⁴C 濃度推移

¹⁴C-プロシミドンをラット肝およびヒト肝キメラマウスに投与後の経時的血漿中放射能濃度および薬物動態パラメータをそれぞれ **Table 3-1** および **Table 3-2** に示す。低用量 (37.5 mg/kg) 投与群のラット肝キメラマウスにおいて、投与 12 時間後に最大濃度 8.9 µg プロシミドン等量/mL 血漿 (以下、µg/mL) となり、AUC_{0h-∞}は 164 µg プロシミドン等量·h/mL 血漿 (以下、µg·h/mL) であった。一方、低用量のヒト肝キメラマウスにおいては、投与 2 時間後に最大濃度 14.3 µg/mL となり、AUC_{0h-∞}は 185 µg·h/mL であった。

高用量 (62.5 mg/kg) 投与群のラット肝キメラマウスにおいて、投与 12 時間後に最大濃度 14.8 µg/mL となり、AUC_{0h-∞}は 271 µg·h/mL であった。一方、高用量のヒト肝キメラマウスにおいては、投与 8 時間後に最大濃度 13.3 µg/mL となり、AUC_{0h-∞}は 292 µg·h/mL であった。ラット肝およびヒト肝キメラマウスの両方で、AUC は用量依存的

に増加したが、 C_{max} の用量差は不明瞭であった。

Table 3-1 ^{14}C concentrations in plasma after single oral administration of ^{14}C -procymidone to chimeric mice with rat and human hepatocytes.

Time [h]	Concentration [μg equiv. of procymidone/mL plasma]			
	37.5 mg/kg		62.5 mg/kg	
	Rat chimeric mice	Human chimeric mice	Rat chimeric mice	Human chimeric mice
1	7.0 \pm 1.70	4.9 \pm 2.04	8.6 \pm 2.52	10.4 \pm 6.13
2	7.1 \pm 1.24	14.3 \pm 5.30	9.3 \pm 1.04	11.4 \pm 6.53
4	7.0 \pm 0.87	7.9 \pm 2.49	9.9 \pm 1.48	9.7 \pm 3.78
8	8.9 \pm 0.91	7.4 \pm 2.29	13.7 \pm 4.38	13.3 \pm 2.89
12	8.9 \pm 0.93	4.6 \pm 2.16	14.8 \pm 6.03	9.5 \pm 2.77
24	0.5 \pm 0.08	2.9 \pm 0.84	1.5 \pm 0.41	3.8 \pm 1.24
48	0.1 \pm 0.02	0.6 \pm 0.29	0.2 \pm 0.05	1.3 \pm 0.43
72	0.1 \pm 0.03	0.2 \pm 0.07	0.1 \pm 0.04	0.5 \pm 0.06

Data are presented as the mean value \pm standard deviation of 3 animals.

Table 3-2 Pharmacokinetics parameters of ^{14}C in plasma after single oral administration of ^{14}C -procymidone to chimeric mice with rat and human hepatocytes.

Parameter	37.5 mg/kg		62.5 mg/kg	
	Rat chimeric mice	Human chimeric mice	Rat chimeric mice	Human chimeric mice
	C_{max} [μg equiv./mL]	8.9	14.3	14.8
T_{max} [h]	12	2	12	8
AUC_{0-72h} [μg equiv. \cdot h/mL]	158	184	259	290
$AUC_{0h-\infty}$ [μg equiv. \cdot h/mL]	164	185	271	292

Parameters were obtained from the mean plasma concentrations of 3 animals.

糞および尿中 ^{14}C 排泄

^{14}C -プロシミドン をラット肝およびヒト肝キメラマウスに投与後 72 時間以内に糞および尿中に排泄された ^{14}C の割合を **Table 3-3** に示す。低用量 (37.5 mg/kg) のラット肝キメラマウスにおいて、糞および尿への排泄率はそれぞれ 18.7%および 77.2%であり、残屍体中放射能 0.5%を合わせて合計 96.3%が回収された。一方、低用量のヒト肝キメラマウスにおいては、糞および尿への排泄率はそれぞれ 10.7%および 86.4%であり、残屍体中放射能 0.7%を合わせて合計 97.7%が回収された。ラット肝およびヒト肝キメラマウスのいずれにおいても、投与された ^{14}C は投与後 72 時間以内に定

量的かつ速やかに体外へ排泄された。

高用量（62.5 mg/kg）のラット肝キメラマウスにおいて、糞および尿への排泄率はそれぞれ 11.3%および 84.7%であり、残屍体中放射能 0.4%を合わせて合計 96.5%が回収された。一方、高用量のヒト肝キメラマウスにおいては、糞および尿への排泄率はそれぞれ 14.4%および 83.5%であり、残屍体中放射能 0.6%を合わせて合計 98.5%が回収された。高用量においても ^{14}C の排泄は速やかで、排泄経路や排泄速度に顕著な用量差は認められなかった。

Table 3-3 Cumulative ^{14}C -excretions in urine and feces after single oral administration of ^{14}C -procymidone to chimeric mice with rat and human hepatocytes.

(A) 37.5 mg/kg

Time [h]	Excretion [% of dose]					
	Chimeric mice with rat hepatocytes			Chimeric mice with human hepatocytes		
	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total
0-24	72.1 ± 3.22	15.4 ± 4.16	87.5 ± 1.92	69.1 ± 4.85	8.0 ± 0.43	77.1 ± 5.28
0-48	76.0 ± 3.68	18.1 ± 3.52	94.1 ± 1.41	83.4 ± 0.92	10.3 ± 0.41	93.7 ± 1.28
0-72	77.2 ± 3.75	18.7 ± 3.81	95.9 ± 1.07	86.4 ± 0.45	10.7 ± 0.27	97.1 ± 0.52
Carcass	0.5 ± 0.06			0.7 ± 0.25		
Total	77.2 ± 3.75	18.7 ± 3.82	96.3 ± 1.13	86.4 ± 0.45	10.7 ± 0.27	97.7 ± 0.70

(B) 62.5 mg/kg

Time [h]	Excretion [% of dose]					
	Chimeric mice with rat hepatocytes			Chimeric mice with human hepatocytes		
	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total
0-24	76.6 ± 4.07	8.9 ± 1.43	85.5 ± 3.53	61.2 ± 8.20	11.2 ± 9.08	72.4 ± 7.49
0-48	81.8 ± 3.92	11.1 ± 2.51	92.9 ± 2.34	80.7 ± 9.15	14.1 ± 9.31	94.8 ± 0.22
0-72	84.7 ± 2.92	11.3 ± 2.50	96.0 ± 1.00	83.5 ± 8.58	14.4 ± 9.40	97.9 ± 0.83
Carcass	0.4 ± 0.19			0.6 ± 0.02		
Total	84.7 ± 2.92	11.3 ± 2.50	96.5 ± 0.91	83.5 ± 8.58	14.4 ± 9.40	98.5 ± 0.82

Data are presented as the mean value ± standard deviation of 3 animals.

血漿中代謝物分析

^{14}C -プロシミドンラット肝およびヒト肝キメラマウスに投与した際の血漿中代謝物濃度の推移および薬物動態パラメータをそれぞれ **Figure 3-4** および **Table 3-4** に示す。低用量（37.5 mg/kg）のラット肝キメラマウスにおいて、血漿中の主要成分は PCM および Hydroxylated-PCM であり、それぞれ投与 1 時間後に最大 3.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および投与 8 時間後に最大 2.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示した。また $\text{AUC}_{0-72\text{h}}$ はそれぞれ 26.1 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ および 47.4 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であった。なお、血漿中の Carboxylated-PCM および Hydroxylated-PCM

のグルクロン酸抱合体は PCM および Hydroxylated-PCM と比較して少量であった。一方、低用量のヒト肝キメラマウスにおいて、血漿中の主要成分は Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体であり、次いで Carboxylated-PCM が多く、PCM および Hydroxylated-PCM は同程度であった。PCM および Hydroxylated-PCM は投与 2 時間後にそれぞれ最大 3.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 2.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示した。また $\text{AUC}_{0-72\text{h}}$ はそれぞれ 22.2 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ および 20.8 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であった。PCM の C_{max} および AUC はラット肝キメラマウスとヒト肝キメラマウスで同等であったが、Hydroxylated-PCM に関してはヒト肝キメラマウスと比べてラット肝キメラマウスで AUC が 2 倍程度大きくまた T_{max} が遅かった。

ラット肝およびヒト肝キメラマウスの両方について、高用量 (62.5 mg/kg) における血漿中代謝物の組成は低用量と同様であった。高用量のラット肝キメラマウスにおける血漿中の主要成分は PCM および Hydroxylated-PCM であり、それぞれ投与 1 時間後に最大 4.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および投与 12 時間後に最大 9.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示した。また $\text{AUC}_{0-72\text{h}}$ はそれぞれ 48.3 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ および 120.8 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であった。一方、高用量のヒト肝キメラマウスにおいては、PCM および Hydroxylated-PCM はそれぞれ投与 2 時間後に最大 3.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および投与 1 時間後に 1.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示した。また $\text{AUC}_{0-72\text{h}}$ はそれぞれ 44.3 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ および 36.1 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ であった。低用量と同様に、PCM については C_{max} および AUC は両キメラマウスで同等であったのに対し、Hydroxylated-PCM では AUC および C_{max} がヒト肝キメラマウスと比べてラット肝キメラマウスで 3~5 倍程度大きく、また T_{max} の遅延が認められた。

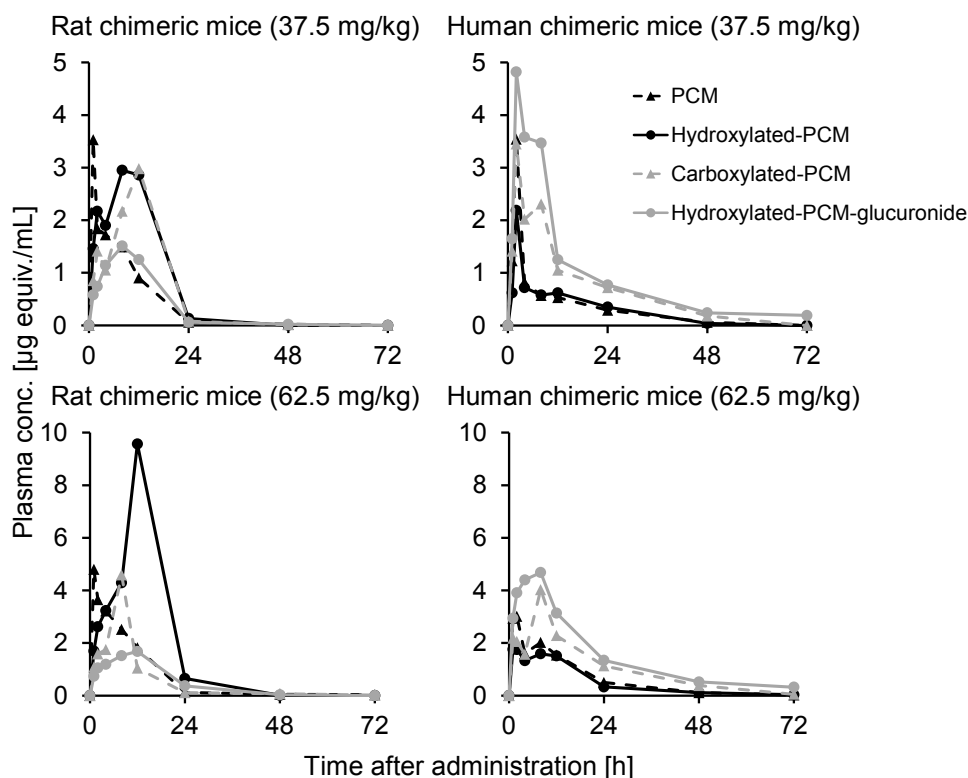


Figure 3-4 Concentration of procymidone and its metabolites in plasma after single oral administration of ^{14}C -procymidone to chimeric mice with rat and human hepatocytes. Points are mean values from 3 animals.

Table 3-4 Pharmacokinetics parameters of PCM and Hydroxylated-PCM in plasma after single oral administration of ^{14}C -procymidone to rats and chimeric mice.

(A) 37.5 mg/kg

Parameter	Rats*		Chimeric mice with rat hepatocytes		Chimeric mice with human hepatocytes	
	PCM	Hydroxylated PCM	PCM	Hydroxylated PCM	PCM	Hydroxylated PCM
C_{\max} [$\mu\text{g equiv./mL}$]	3.7	8.2	3.54	2.95	3.55	2.19
T_{\max} [h]	6	12	1	8	2	2
$\text{AUC}_{0-72\text{h}}$ [$\mu\text{g equiv.}\cdot\text{h/mL}$]	40.9	225.3	26.1	47.4	22.2	20.8

(B) 62.5 mg/kg

Parameter	Rats*		Chimeric mice with rat hepatocytes		Chimeric mice with human hepatocytes	
	PCM	Hydroxylated PCM	PCM	Hydroxylated PCM	PCM	Hydroxylated PCM
C_{\max} [$\mu\text{g equiv./mL}$]	6.8	10.4	4.80	9.57	3.01	1.77
T_{\max} [h]	4	12	1	12	2	1
$\text{AUC}_{0-72\text{h}}$ [$\mu\text{g equiv.}\cdot\text{h/mL}$]	89.9	332.1	48.3	120.8	44.3	36.1

Data are presented as the mean value of 3 animals. *: Data of rats was reproduced from the previous article^[101].

糞および尿中代謝物

¹⁴C-プロシミドンを経口投与したラット肝およびヒト肝キメラマウスに投与した際の糞および尿中代謝物の組成を **Table 3-5** に示す。低用量のラット肝キメラマウスにおいて、尿中の主要代謝物は Carboxylated-PCM (投与量の 58.3%、以下同様) であり、次いで Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体 (10.4%) であった。また、糞中では PCM (6.0%) が主要であった。一方、低用量のヒト肝キメラマウスでは、Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体 (37.4%) および Carboxylated-PCM (42.2%) が尿中で主要であり、糞中では Carboxylated-PCM (1.7%) が主要であった。即ち、両キメラマウスとも ¹⁴C の主要排泄経路は尿であったが、その代謝物の組成には若干の差があり、ラット肝キメラマウスでは Carboxylated-PCM が主要であったのに対し、ヒト肝キメラマウスではそれに加えて Hydroxylated-PCM の抱合体の排泄が主要であった。

高用量のラット肝キメラマウスにおいて、尿中の主要代謝物は Carboxylated-PCM (62.4%) であり、次いで Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体 (12.5%) であった。また、糞中では PCM (4.5%) が主要であった。一方、低用量のヒト肝キメラマウスでは、Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体 (37.8%) および Carboxylated-PCM (38.4%) が尿中で主要であり、糞中では PCM (3.1%) が主要であった。糞および尿中の代謝物の組成は低用量と高用量で概ね同様であった。

Table 3-5 Amounts of metabolites in urine and feces within 72 h after single oral administration of ¹⁴C-procymidone to chimeric mice.

Metabolite	Excretion [% of dose]											
	37.5 mg/kg						62.5 mg/kg					
	Rat chimeric mice			Human chimeric mice			Rat chimeric mice			Human chimeric mice		
	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total
PCM	0.5	6.0	6.5	0.4	0.5	0.8	0.7	4.5	5.2	0.5	3.1	3.6
Hydroxylated-PCM	3.9	3.1	7.0	3.5	0.9	4.3	4.6	1.5	6.1	3.4	2.0	5.5
Carboxylated-PCM	58.3	1.9	60.2	42.2	1.7	43.9	62.4	0.5	62.8	38.4	0.9	39.4
Hydroxylated-PCM-glucuronide	10.4	0.5	10.9	37.4	1.0	38.3	12.5	0.5	13.1	37.8	0.9	38.7
Others*	4.1	0.8	4.9	2.9	0.5	3.4	4.5	0.6	5.1	3.4	0.7	4.1
Unextractable	NA	6.4	6.4	NA	6.3	6.3	NA	3.8	3.8	NA	6.6	6.6
Total	77.2	18.7	95.9	86.3	10.7	97.1	84.7	11.3	96.0	83.5	14.3	97.9

Values were obtained from pooled samples of 3 animals. *: Sum of the amounts of 5 or 6 unidentified metabolites. NA: Not applicable.

糞、尿および胆汁中 ¹⁴C 排泄

胆管カニューレーションを施したラット肝およびヒト肝キメラマウスに低用量で ¹⁴C-プロシミドンを投与後 48 時間以内に糞、尿および胆汁中に排泄された ¹⁴C の割合

を **Table 3-6** に示す。ラット肝キメラマウスにおいて、糞、尿および胆汁への排泄率はそれぞれ 6.5%、29.4%および 24.8%であり、消化管内および残屍体中の放射能（各 2.0%および 34.5%）を合わせて合計 97.2%が回収された。一方、ヒト肝キメラマウスにおいては、糞、尿および胆汁への排泄率はそれぞれ 2.6%、75.7%および 7.0%であり、消化管内および残屍体中の放射能（各 0.4%および 10.9%）を合わせて合計 96.7%が回収された。ラット肝およびヒト肝キメラマウスのいずれにおいても、投与された ^{14}C は投与後 48 時間以内に定量的かつ速やかに体外へ排泄されたが、ラット肝キメラマウスで胆汁中への ^{14}C の排泄が多かったのに対し、ヒト肝キメラマウスでは大部分が尿中に排泄された。

Table 3-6 Cumulative ^{14}C -excretions in urine, bile, and feces after single oral administration of ^{14}C -procymidone to bile duct-cannulated chimeric mice at 37.5 mg/kg.

Time [h]	Excretion [% of dose]							
	Chimeric mice with rat hepatocytes ¹⁾				Chimeric mice with human hepatocytes ²⁾			
	Urine	Bile	Feces	Total	Urine	Bile	Feces	Total
0-24	14.2	9.5	3.7	27.5	46.6 ± 1.9	4.8 ± 2.1	1.6 ± 1.3	53.0 ± 2.3
0-48	29.4	24.8	6.5	60.7	75.7 ± 10.9	7.0 ± 1.7	2.6 ± 1.1	85.4 ± 9.2
GI contents				2.0				0.4 ± 0.1
Carcass				34.5				10.9 ± 8.2
Total	29.4	24.8	6.5	97.2	75.7 ± 10.9	7.0 ± 1.7	2.6 ± 1.1	96.7 ± 1.1

1) Data are the mean values for 2 animals.

2) Data are the mean values ± standard deviations for 3 animals.

糞、尿および胆汁中代謝物

胆管カニューレションを施したラット肝およびヒト肝キメラマウスに低用量にて ^{14}C -プロシミドン投与した際の糞、尿および胆汁中代謝物の組成を **Table 3-7** に示す。ラット肝キメラマウスにおいて、尿中の主要代謝物は Carboxylated-PCM (21.5%) であり、次いで Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体 (4.3%) であった。また、胆汁中では Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体 (19.7%) が主要であった。一方、ヒト肝キメラマウスでは、Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体 (45.8%) および Carboxylated-PCM (25.6%) が尿中で主要であり、胆汁中では Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体 (5.4%) が主要であった。両キメラマウスで排泄経路および代謝物に顕著な違いがあり、特に Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体については、ラ

ット肝キメラマウスで主に胆汁に排泄されたのに対し、ヒト肝キメラマウスではほぼ全量が尿中に排泄された。過去にラットを用いて実施されたプロシミドン代謝試験の結果と比較した場合、ラットでは尿中に Carboxylated-PCM が多く、一方で胆汁中には Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体が多く存在しており、本試験におけるラット肝キメラマウスでの結果と同様であった。

Table 3-7 Amounts of metabolites in urine, bile, and feces within 48 h after single oral administration of ¹⁴C-procymidone to rats at 62.5 mg/kg or to bile duct-cannulated chimeric mice at 37.5 mg/kg.

Metabolite	Excretion [% of dose]											
	Rat*				Chimeric mice with rat hepatocytes ¹⁾				Chimeric mice with human hepatocytes ²⁾			
	Urine	Bile	Feces	Total	Urine	Bile	Feces	Total	Urine	Bile	Feces	Total
PCM	<0.1	<0.1	3.8	3.8	0.4	0.2	4.5	5.0	0.2	0.1	1.0	1.4
Hydroxylated-PCM	3.0	<0.1	1.1	4.1	1.4	0.6	0.7	2.7	2.1	0.3	0.1	2.5
Carboxylated-PCM	49.3	0.5	0.1	49.9	21.5	3.5	0.3	25.2	25.6	0.6	<0.1	26.3
Hydroxylated-PCM-Glucuronide	4.0	18.8	<0.1	22.8	4.3	19.7	<0.1	24.0	45.8	5.4	<0.1	51.3
Others ³⁾	2.4	<0.1	<0.1	2.4	1.8	0.9	0.2	2.9	2.0	0.5	0.1	2.6
Unextractable	NA	NA	1.6	1.6	NA	NA	0.9	0.9	NA	NA	1.3	1.3
Total	58.6	19.3	6.7	84.6	29.4	24.8	6.5	60.7	75.7	7.0	2.6	85.4

1) Values were obtained from pool samples of 2 animals.

2) Values were obtained from pool samples of 3 animals.

3) Sum of the amounts of 5 or 6 unidentified metabolites.

NA: Not applicable. *: Values were reproduced from the previous article^[10].

3.1.3 小括

ヒト肝キメラマウスは、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクティベーター (uPA) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスと重症複合免疫不全 (SCID) マウスとを交配させて作成した uPA/SCID マウスにヒト肝細胞を移植したマウスである。uPA/SCID マウスでは、uPA 遺伝子により劇症肝障害が惹起され、かつ免疫能を持たないため、移植したヒト肝細胞が定着することが可能である。このようにして作製されたヒト肝キメラマウスはヒトの肝臓に由来する酵素やトランスポーターを持つことから、近年ヒト代謝や肝臓における排泄を検討する目的で多く用いられつつある^[106-111]。本研究を開始するにあたり、今回注目するヒトにおけるプロシミドンおよびその代謝物の動態がキメラマウスを用いて評価可能であることを確認するための検

証を行った。具体的には、過去に取得されたラットにおけるプロシミドンの動態と、ラット肝キメラマウスにおける動態を比較することで、ラット肝キメラマウスがプロシミドンおよび代謝物のラットにおける動態を反映することを確認しようと試みた。PCM および Hydroxylated-PCM のラットおよびラット肝キメラマウスにおける薬物動態パラメータ (Table 3-4) において、両動物とも PCM と比較して Hydroxylated-PCM の T_{max} は遅く、また AUC は高い値を示した^[101,105]。なお、ラットとラット肝キメラマウスを比較した場合、 C_{max} および AUC ともラット肝キメラマウスで若干値が低い傾向を示したが、これは宿主となったマウスの性質が現れた可能性が推察された。今回実験に使用したキメラマウスに関しては、元々のマウスの肝臓のみがラットあるいはヒトの肝細胞で置換されており、その他 (消化管吸収、腎排泄等) は元のマウス由来の性質が維持されている。加えて、キメラマウスでは 20%以下と多くはないものの、元のマウスに由来する肝細胞が残されていることが報告されている^[112]。プロシミドンはマウスにおいて代謝・排泄速度がラットよりも速やかである傾向が報告されていることから^[96]、ラット肝キメラマウスでラットと比較して C_{max} および AUC が若干低かったのは、宿主であるマウスの性質が代謝および排泄に一部影響したことが原因と考えられた。ただし、動態パラメータ等からも読み取れる通り、ラットとの差は限定的であったことから、キメラマウスは移植した肝臓による代謝や排泄等の性質を十分に反映しており、従ってキメラマウスはプロシミドンの代謝および排泄のプロファイルを評価する上で有用であると考えられた。

以上の評価結果を踏まえ、ラット肝およびヒト肝キメラマウスを用いてプロシミドンの血漿中濃度推移、代謝および肝臓での排泄経路について比較検討した。その結果、Hydroxylated-PCM の C_{max} および AUC はヒト肝キメラマウスと比較してラット肝キメラマウスで顕著に高く、2~5 倍の差が認められた。ラット肝キメラマウスでは PCM と比べて Hydroxylated-PCM で T_{max} が遅かったことから、腸肝循環により Hydroxylated-PCM の濃度が高く維持されている可能性が示唆された。この点について胆管カニュレーション手術を施したキメラマウスを用いて確認したところ、ラット肝キメラマウスでは胆汁中への Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体の排泄が顕著であり、上記結果と合わせてラット肝キメラマウスでは Hydroxylated-PCM が腸肝循環を受けていることが示された。一方、ヒト肝キメラマウスでは Hydroxylated-PCM

の抱合体は胆汁中にはほとんどなく、代わりに尿中に主要代謝物として検出された。胆汁排泄性試験において、Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体の胆汁排泄比（胆汁中に排泄された割合を尿中に排泄された割合で除したパラメータ）を **Table 3-8** に示す。また、Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体の尿および胆汁への排泄比を図にしたものを **Figure 3-5** に示す。ラット肝キメラマウスにおいて胆汁排泄比は 4.5（胆汁 19.7%/尿 4.3%）で、ラットの結果（3.14~4.70）を再現したのに対し、ヒト肝キメラマウスでは 0.12（胆汁 5.4%/尿 45.8%）であり、ウサギ（0.06）およびサル（0.41）と類似していた。これらの結果より、ラット肝キメラマウスではラットの結果を再現し、Hydroxylated-PCM の抱合体が腸肝循環を受けて高い暴露を示すのに対し、ヒト肝キメラマウスではウサギやサルと同様、抱合体となった Hydroxylated-PCM が尿中に速やかに排泄されることが示された。

Table 3-8 Biliary excretion ratio of Hydroxylated-PCM-glucuronide.

Rats*		Rabbits*	Monkeys*	Chimeric mice with rat hepatocytes	Chimeric mice with human hepatocytes
3.5 mg/kg	62.5 mg/kg	125 mg/kg	125 mg/kg	37.5 mg/kg	37.5 mg/kg
3.14	4.70	0.06	0.41	4.52	0.12

Biliary excretion ratio = Biliary excretion rate [% of dose] / Urinary excretion rate [% of dose]

*: Values were reproduced from the previous article^[101].

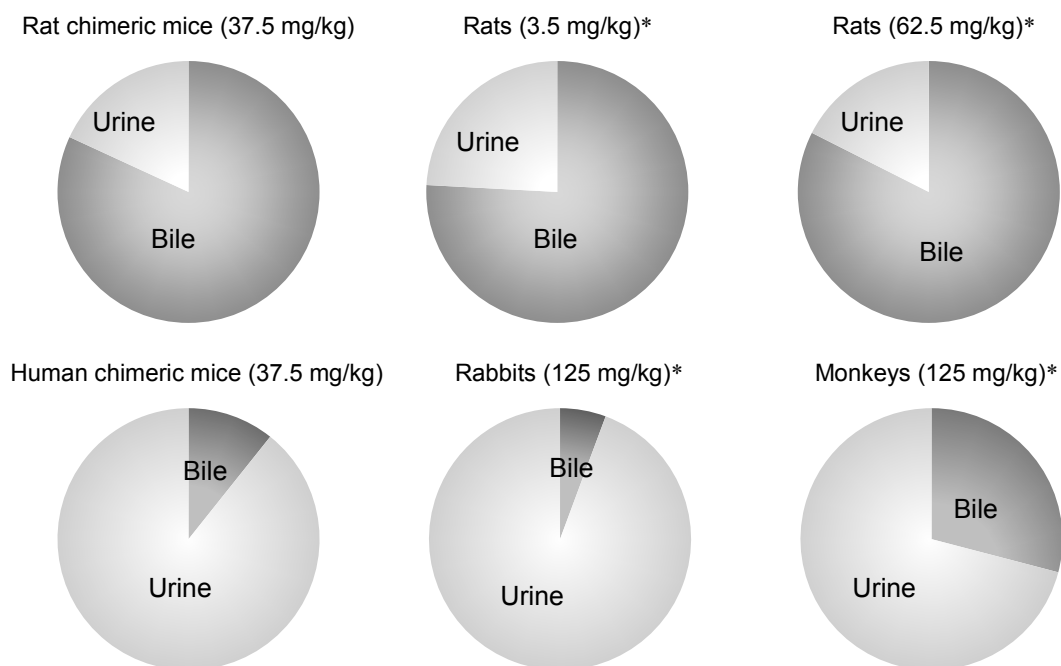


Figure 3-5 The proportion of Hydroxylated-PCM-glucuronide excreted in urine and bile.

*: Charts were reproduced from the previous article^[101].

第 3-2 節 考察

上述の通り、プロシミドンの哺乳動物における代謝に関しては、ラットやウサギ、サル等複数の動物種を用いて検討され、共通する主要代謝経路がイミド環メチル基の酸化 (Hydroxylated-PCM) およびそれに続くさらなる酸化 (Carboxylated-PCM) あるいはグルクロン酸抱合化であることが明らかとなっている^[95-97]。プロシミドンによる主な毒性として催奇形性が挙げられるが、過去に行われた毒性メカニズムに関する複数の研究より、催奇形性の原因物質は弱い抗アンドロゲン活性を持つ Hydroxylated-PCM であることが示されている^[101-106]。また、毒性種差の原因は Hydroxylated-PCM の動態の差に起因しており、ラットでは主に Hydroxylated-PCM の抱合体が胆汁排泄された後に腸肝循環を受けるために体外への排泄が遅く、結果として Hydroxylated-PCM が高い血漿中濃度を維持するのに対し、ウサギおよびサルでは抱合体が尿を介して速やかに排泄されることが低暴露の要因と考えられている^[101]。上記の毒性メカニズムおよび種差原因に基づき、プロシミドンのヒトにおけるリスクについても検討されつつある。肝細胞を用いた *in vitro* 試験およびヒト肝キメラマウスを用いた *in vivo* 試験において、ヒトでもウサギやサルと同様、ラットよりも速やかにグルクロン酸抱合体が生成することが確認されている^[106]。一方、催奇形性およびその種差の原因から考えると、Hydroxylated-PCM およびその抱合体のヒトにおける動態、とりわけ肝臓における Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体の胆汁あるいは全身血への振り分けを把握することは、ヒトでの毒性を見極める上で極めて重要であると考えられ^[101]、本研究ではその点を明らかにすべくヒト肝キメラマウスを用いた検討を行った。

その結果、ラット肝およびヒト肝キメラマウスにおける血漿中 Hydroxylated-PCM の C_{max} および AUC には 2~5 倍の顕著な差が認められた。なお、プロシミドンのラットにおける代謝試験にて認められた、抱合体の腸肝循環に由来すると考えられる Hydroxylated-PCM の T_{max} の遅延^[101,105]は本検討においてもラット肝キメラマウスにて再現されたが、ヒト肝キメラマウスではこのような傾向はみられなかった。これら 2 種類のキメラマウスで消化管における吸収の過程は共通していることから、この差は肝臓における代謝および排泄の違いを反映しているものと推測された。即ち、ラット肝キメラマウスではラットと同様、Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体が胆汁に排泄され、消化管内で脱抱合を受けて再吸収される腸肝循環の経路を辿るために Hydroxylated-

PCM の体外への排泄が遅く、結果的に長期間暴露を受け続けるのに対し、ヒト肝キメラマウスではウサギおよびサルと同様、抱合体が肝臓にて全身循環血に振り分けられ、これが尿より速やかに排泄することが AUC および T_{max} の差として現れていることが示唆された。この暴露量を左右する要因となる機構について、胆管カニュレーションを施したキメラマウスを用いて検討した。その結果、Hydroxylated-PCM のグルクロン酸抱合体の胆汁排泄比（尿への排泄割合に対する胆汁への排泄割合）はラット肝キメラマウスで 4.5、ラットで 3.14~4.70 で同程度であったのに対し、ヒト肝キメラマウスでは 0.12 であり、ウサギ (0.06) およびサル (0.41) にて得られた値と同等であった。以上の結果より、催奇形性の主要因である Hydroxylated-PCM のヒト肝臓における挙動はウサギやサルと同様で、従ってその暴露の程度は低く、ヒトにおけるリスクは極めて低いものと考えられた。

以上、ラットにて催奇形性を有し、その毒性に顕著な種差を持つ殺菌剤プロシミドンについて、ヒト肝キメラマウスを用いてヒト肝臓における抱合体の排泄経路を解明し、結果的に原因物質が低暴露となるためにヒトにおける毒性リスクが低いことを明らかにした。プロシミドンのように、生体内での原因物質の排泄経路の差が暴露量の差の主要因となり、これが毒性種差の原因となる化合物については、*in vitro* 試験による代謝の種差評価やそれに基づいた一般的な PBPK 技術では *in vivo* での暴露量の種差を明確にすることができず、これら技術ではヒトでの安全性を評価するのに不十分であると考えられた。一方、今回プロシミドンの評価に用いた手法は、キメラマウスを用いることで原因物質の排泄経路の種差およびそれに基づく暴露量の種差を明確にするものであり、即ち本手法により上記のような化合物についてヒトでの安全性を確実に評価することが可能になるものと考えられた。

結論

農化品について化合物を登録し販売する上でヒトに対する安全性を担保することが必要とされるが、農化品はヒトに投与することを目的としない点で医薬品と大きく異なり、そのため最終的にヒト臨床試験により動態や毒性を確認して安全性を担保することができない。そのため従来、齧歯類等を用いた試験により得られた安全用量を安全係数で除する事でのみ、ヒトにおける安全域を担保してきた。一方で近年、変異原性、発癌性、催奇形性や内分泌攪乱等の毒性については動物実験の結果からヒトの安全性が十分に担保できないとして、登録に際し極めて厳しい基準が一律に課されつつある。このような状況に科学的な面から対処すべく、近年発展しつつある様々な *in vivo*、*in vitro* あるいは *in silico* 技術を組み合わせ、ヒトにおける農化品の安全性評価手法を開発することを試みた。

まず第1章では、世界的に汎用されるピレスロイド系殺虫剤を例として、ヒト安全性評価における実験動物を用いた代謝試験の位置付けを検討し考察した。まず、新規化合物であるメトフルトリンおよびプロフルトリンについてラット代謝試験を実施し、多数の代謝物の構造を同定すると共に、その代謝・動態プロファイル全体を明らかにした。特に両化合物の共通構造である菊酸誘導体部分について、*E/Z* 異性体による代謝経路の違いや、既知の酸側構造との代謝反応性の差等に関する知見を得た。これら2化合物については急性毒性等に性差はなく、今回の結果はそれに合致するものであった。ピレスロイド系化合物についてはヒトが実生活にて接する機会が多く、そのためヒトでの毒性リスクについて研究が進んでいる。デルタメスリンを例として示した通り、PBPK 技術等により種を超えてヒト動態を予測する場合、ラットにおける *in vivo* 代謝・動態や、*in vitro* 試験による代謝速度あるいは関与する酵素の精査等が必要となる。また長期毒性に関しても、ラット発癌性のメカニズムが詳細に研究された結果、原因となる酵素の誘導がヒトでは生じないためにヒトに関与しない毒性として扱われる例がピレスロイド系殺虫剤に限らず複数報告されている。このように、短期・長期いずれの毒性を評価する際にも、まず実験動物における代謝・動態や毒性の有無、あるいはその機構を精査し理解することが、ヒトの毒性を予測し評価するため重要であると考えられた。即ち、従来、農化品の開発において、齧歯類を用いた代謝試験は哺乳動物における化合物の動態を広く代表するものとしての意味合いが強かったが、化合物のヒトにおける動態を予測し安

全性を評価していく上で、動物種ごとの動態を精査しその相同性や違いを正確に把握する必要性は更に増すものと考えられた。

以上の知見を踏まえ、実験動物における化合物の動態および毒性メカニズムを正確に把握した上で、各種技術を用いることでヒト安全性を評価する手法の開発を試みた。第2章では、催奇形性に種差を有する除草剤フルミオキサジンを題材として、動物における動態および未変化体・代謝物の活性を解明し原因物質を特定し、原因物質に対する感受性およびその動態の差に基づきヒトにおける毒性発現のリスクを評価する手法について検討した。まず、標的組織における原因物質およびその濃度を確認すべく、妊娠ラットおよびウサギにてフルミオキサジンの代謝を調べた結果、妊娠ラットに特有な代謝物は検出されず、胎児に移行するのは未変化体および6種の既知代謝物であることが示された。このうち、未変化体と近い性質を持つ3代謝物について、ミトコンドリア画分を用いた試験により PPO 阻害能を未変化体と比較した結果、未変化体の阻害活性が最も強く、胎児中濃度の差を考慮して、未変化体が胎児中での毒性本体であるものと判断した。さらに肝細胞を用いた試験により、未変化体に対する感受性には明確な種差があり、ラットの感受性と比較してヒトは低く、またウサギやサルはさらに低感受であることを示した。以上、フルミオキサジンの催奇形性の原因物質は代謝物ではなく未変化体であることを明らかにし、またその感受性の差からヒトにおけるリスクがラットよりも顕著に低いものであることを裏付けた。即ち本アプローチにより、毒性の原因物質を特定し、その活性の種差を把握することで、ヒトにおける毒性リスクを正確に評価し、ヒトでの安全性を担保することが可能であると考えられた。

続いて第3章にて、催奇形性に種差を持つ農業用殺菌剤プロシミドンに関する研究を基に、生体内での排泄経路の差が暴露量の差を生み、それが毒性種差の主原因となる化合物について、ヒトにおけるリスクを評価する手法の開発を試みた。プロシミドンの催奇形性種差の原因は、水酸化体およびその抱合体の肝臓での排泄経路の差に由来する。ヒトにおいて、毒性のカギとなる水酸化体の肝臓での排泄経路を確認するため、ラット肝キメラマウスおよびヒト肝キメラマウスを用いたプロシミドンの代謝試験を実施した。その結果、ラット肝キメラマウスではラットと同様、水酸化体の抱合体が主に胆汁排泄されて腸肝循環を受け、排泄が遅延するため高い血漿中暴露量を示した。一方、ヒト肝キメラマウスでは抱合体の排泄経路は尿であり、また水酸化体の血漿中暴露は低く、

そのためヒトではウサギやサルと同様、催奇形性のリスクが極めて低いことが示された。即ち本手法により、排泄経路の差が暴露量の差となるために *in vitro* 試験等による代謝の定量的・定性的な評価が実暴露量の種差に直結しない化合物について、キメラマウスを用いることでヒトにおける排泄経路や暴露量を正確に見積もり、安全性を評価することが可能であると考えられた。

ここまで示した通り、ヒト臨床試験が実施できない農化学品について懸念された毒性に関し、実験動物より得られたデータを基にしてヒト安全性の正確な評価が可能となるアプローチを開発した。化合物による毒性を評価する上では、化合物の暴露量・動態 (TK) および標的部位に対する活性 (TD) をそれぞれ評価することが基本であると考えられる。TK の部分に関しては、実験動物における代謝・動態を精査した上で、*in vitro* 試験における代謝の定量的・定性的な比較評価やそれに基づく *in silico* PBPK 技術がヒト動態の予測に重要であるものと考えられた。さらに、ヒト肝キメラマウスを用いることにより、*in vitro* 試験のみでは評価できない化合物・代謝物の排泄経路についても評価可能であった。なお、これらの技術にトランスポーターや消化管吸収に関する *in vitro*・*in silico* 技術等を組み合わせることで、ヒト動態の予測に関しさらに精度の改善あるいはより複雑な系への対応が可能になるものと予想される。一方、TD 部分に関しては、齧歯類を用いた *in vivo* 試験やヒト・動物由来試料を用いた *in vitro* 試験により、化合物の活性を確認する手法が有用であることが改めて確認された。現時点では TD の種差検討に使用できるヒトの酵素や細胞はそのバリエーションに限りがあるが、この点については今後、ES 細胞あるいは iPS 細胞より分化誘導された各種細胞や、それを立体的に成形した小組織による評価系等が発展していくものと予想され、その適用範囲はさらに拡大するものと考えられる。

以上、本研究では、実験動物における動態に関するデータに各種技術を組み合わせることでヒトでの動態を予測し、さらに毒性発現機構の感受性に関する評価を組み合わせることでヒトにおける農化学品の安全性を科学的に妥当かつ高い精度・信頼度で予測することが可能であった。本研究の成果は、今後、より安全性の高い農化学品の開発や使用に寄与していくものと考えられる。

引用論文

- [1] 伊藤 高明, 奥野 武, マラリア防除用資材オリセットネット®の開発, *住友化学*, **2006-II**, 4-11 (2006)
- [2] Abad-Franch F., Zamora-Perea E., Luz S.L., Mosquito-disseminated insecticide for citywide vector control and its potential to block arbovirus epidemics: Entomological observations and modeling results from Amazonian Brazil. *PLoS Med.*, **14**, doi:10.1371 (2017)
- [3] Martin O.V., Martin S., Kortenkamp A., Dispelling urban myths about default uncertainty factors in chemical risk assessment - sufficient protection against mixture effects? *Environ. Health*, **12**:53 (2013)
- [4] Renwick A.G., Data-derived safety factors for the evaluation of food additives and environmental contaminants. *Food Add. Contam.*, **10**, 275-305 (1993)
- [5] Bars R., Fegert I., Gross M., Lewis D., Weltje L., Weyers A., Wheeler J.R., Galay-Burgos M., Risk assessment of endocrine active chemicals: Identifying chemicals of regulatory concern. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **64**, 143-154 (2012)
- [6] Hennes C., Batke M., Bomann W., Duhayon S., Kosemund K., Politano V., Stinchcombe S., Doe J., Incorporating potency into EU classification for carcinogenicity and reproductive toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **70**, 457-467 (2014)
- [7] Boobis A.R., Cohen S.M., Dellarco V.L., Doe J.E., Fenner-Crisp P.A., Moretto A., Pastoor T.P., Schoeny R.S., Seed J.G., Wolf D.C., Classification schemes for carcinogenicity based on hazard-identification have become outmoded and serve neither science nor society. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **82**, 158-166 (2016)
- [8] Sager J.E., Yu J., Ragueneau-Majlessi I., Isoherranen N., Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation approaches: A systemic review of published models, applications, and model verification. *Drug Metab. Dispos.*, **43**, 1823-1837 (2015)
- [9] Yoshikado T., Yoshida K., Kotani N., Nakada T., Asami R., Toshimoto K., Maeda K., Kusuhara H., Sugiyama Y., Quantitative analyses of hepatic OATP-mediated interactions

- between statins and inhibitors using PBPK modeling with a parameter optimization method. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **100**, 513-523 (2016)
- [10] Kaneko H., Pyrethroids: Mammalian metabolism and toxicity. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 2786-2791 (2011)
- [11] Tang W., Wang D., Wang J., Wu Z., Li L., Huang M., Xu S., Yan D., Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. *Chemosphere*, **191**, 990-1007 (2018)
- [12] Mikata K., Isobe N., Kaneko H., Biotransformation and enzymatic reactions of synthetic pyrethroids in mammals. *Top. Curr. Chem.*, **314**, 113-135 (2012)
- [13] Costa L.G., The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. *Handb. Clin. Neurol.*, **131**, 135-48 (2015)
- [14] Knaak J.B., Dary C.C., Zhang X., Gerlach R.W., Tornero-Velez R., Chang D.T., Goldsmith R., Blancato J.N., Parameters for pyrethroid insecticide QSAR and PBPK/PD models for human risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **219**, 1-114 (2012)
- [15] Tsuji R., Yamada T., Kawamura S., Mammal toxicology of synthetic pyrethroids. *Top. Curr. Chem.*, **314**, 83-111 (2012)
- [16] 松尾 憲忠, 氏原 一哉, 庄野 美德, 岩崎 智則, 菅野 雅代, 吉山 寅仙, 宇和川 賢, 新規ピレスロイド系殺虫剤メトフルトリン (SumiOne[®]、エミネンス[®]) の開発, *住友化学*, **2005-II**, 4-16 (2005)
- [17]. 氏原 一哉, 菅野 雅代, 中田 一英, 岩倉 和憲, 西原 圭一, 加藤 日路士, 衣料用防虫剤プロフルトリン(フェアリテール[®])の発明と開発, *住友化学*, **2010-II**, 13-23 (2010)
- [18] Mori T., Ujihara K., Matsumoto O., Yanagi K., Matsuo N., Synthetic studies of fluorine-containing compounds for household insecticides. *J. Fluor. Chem.*, **128**, 1174-1181 (2007)
- [19] Ujihara K., Mori T., Iwasaki T., Sugano M., Shono Y., Matsuo N., Metofluthrin: A potent new synthetic pyrethroid with high vapor activity against mosquitoes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 170-174 (2004)
- [20] Ujihara K., Matsuo N., Kitahara T., Synthesis of all stereoisomers of the norchrysanthem

acid methyl ester. *Synth. Commun.*, **34**, 1001-1010 (2004)

[21] Abe J., Nagahori H., Tarui H., Tomigahara Y., Isobe N., Metabolism of metofluthrin in rats: I. Identification of metabolites. *Xenobiotica*, **48**, 157-169 (2018)

[22] Holm R., Tønberg H., Jørgensen E.B., Abedinpour P., Farsad S., Müllertz A., Influence of bile on the absorption of halofantrine from lipid-based formulations. *Euro. J. Pharm. Biopharm.*, **81**, 281-287 (2012)

[23] Hasselt P.M., Janssens G.E.P.J., Slot T.K., Ham M., Minderhoud T.C., Talelli M., Akkermans L.M., Rijcken C.J.F., Nostrum C.F., The influence of bile acids on the oral bioavailability of vitamin K encapsulated in polymeric micelles. *J. Control. Release*, **133**, 161-168 (2009)

[24] Ou Y.H., Lin J.K., Biotransformation of butachlor through mercapturic acid pathway in rat tissue homogenates. *J. Toxicol. Environ. Health*, **35**, 19-28 (1992)

[25] Baxter J.H., Steinberg D., Mize C.E., Avigan J., Absorption and metabolism of uniformly ¹⁴C-labeled phytol and phytanic acid by the intestine of the rat studied with thoracic duct cannulation. *Biochim. Biophys. Acta*, **137**, 277-290 (1967)

[26] Dugave C., Demange L., Cis-trans isomerization of organic molecules and biomolecules: Implications and applications. *Chem. Rev.*, **103**, 2475-2532 (2003)

[27] Tomigahara Y., Shiba K., Isobe N., Kaneko H., Nakatsuka I., Yamada H., Identification of two new types of S-linked conjugates of Etoc in rat. *Xenobiotica*, **24**, 839-852 (1994)

[28] Delbressine L.P.C., Balen H.C.J.G., Seutter-Berlage F., Isolation and identification of mercapturic acid metabolites of phenyl substituted acrylate esters from urine of rats. *Arch. Toxicol.*, **49**, 321-330 (1982)

[29] van Doorn R., Bos R.P., Brouns R.M.E., Leijdekkers C.M., Henderson P.T., Effect of toluene and xylenes on liver glutathione and their urinary excretion as mercapturic acids in rats. *Arch. Toxicol.*, **43**, 293-304 (1980)

[30] Chidgey M.A., Kennedy J.F., Caldwell J., Studies on benzyl acetate. II. Use of specific

metabolic inhibitors to define the pathway leading to the formation of benzylmercapturic acid in the rat. *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 1267-1272 (1986)

[31] Tomigahara Y., Mori M., Shiba K., Isobe N., Kaneko H., Nakatsuka I., Yamada H., Metabolism of tetramethrin isomers in rat. I. Identification of a sulphonic acid type of conjugate and reduced metabolites. *Xenobiotica*, **24**, 473-484 (1994)

[32] Tomigahara Y., Onogi M., Kaneko H., Nakatsuka I., Yamane S., Metabolism of 7-fluoro-6-(3,4,5,6-tetrahydrophthalimido)-4-(2-propynyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (S-53482, flumioxazin) in the rat: II. Identification of reduced metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2429-2438 (1999)

[33] Kitamura S., Tatsumi K., Purification of NADPH-linked α,β -ketoalkene double bond reductase from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, **282**, 183-187 (1990)

[34] Dick R.A., Kwak M.K., Sutter T.R., Kensler T.W., Antioxidative function and substrate specificity of NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 40803-40810 (2001)

[35] Stoffel W., Därr W., 2-Alkenal reductase isolation, properties and specificities. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 54-60 (1974)

[36] Bahnson B.J., Anderson V.E., Petsko G.A., Structural mechanism of enoyl-CoA hydratase: Three atoms from a single water are added in either an E1cb stepwise or concerted fashion. *Biochemistry*, **41**, 2621-2629 (2002)

[37] 松田 純子, 黒田 泰弘, フマラーゼ, *日本臨床*, **60 (増刊号 4)**, 126-129 (2002)

[38] Tanaka K., Inoue T., Kadota S., Kikuchi T., Metabolism of illudin S, a toxic principle of *Lampteromyces japonicus*, by rat liver. I. Isolation and identification of cyclopropane ring-cleavage metabolites. *Xenobiotica*, **20**, 671-681 (1990)

[39] Schiller J., Chung A.E., Mechanism of cyclopropane ring cleavage in cyclopropanecarboxylic acid. *J. Biol. Chem.*, **245**, 6553-6557 (1970)

[40] Vessey D.A., Crissey M.H., Zakim D., Kinetic studies on the enzymes conjugating bile

- acids with taurine. *Biochem. J.*, **163**, 181-183 (1977)
- [41] Kaneko H., Ohkawa H., Miyamoto J., Comparative metabolism of fenvalerate and the [2S, α S]-isomer in rats and mice. *J. Pestic. Sci.*, **6**, 317-326 (1981)
- [42] Kelley M., Vessey D.A., Techniques for measuring the activity of carboxylic acid:CoA ligase and acyl-CoA:amino acid N-acyltransferase: The amino acid conjugation pathway. *Curr. Protoc. Toxicol.*, **Suppl. 14**, 4.11.1-4.11.16 (2002)
- [43] Bellucci C., Chiappe C., Cordoni A., Marioni F., Enantioselectivity in the rabbit liver microsomal biotransformation of styrene and phenylpropenes. *Biocatalysis*, **10**, 149-157 (1994)
- [44] Metzler M., Neumann H.G., Epoxidation of the stilbene double bond, a major pathway in aminostilbene metabolism. *Xenobiotica*, **7**, 117-132 (1977)
- [45] Vos R.M.E., van Welie R.T.H., Peters W.H.M., Evelo C.T.A., Boogaards J.J.P., Vermeulen N.P.E., van Bladeren P.J., Genetic deficiency of human class mu glutathione S-transferase isoenzymes in relation to the urinary excretion of the mercapturic acids of Z- and E-1,3-dichloropropene. *Arch. Toxicol.*, **65**, 95-99 (1991)
- [46] Abe J., Nagahori H., Omori R., Mikata K., Kurosawa M., Tomigahara Y., Isobe N., Metabolism of (Z)-(1R,3R)-profluthrin in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 8651-8661 (2015)
- [47] Yang D., Wang X., Chen Y., Deng R., Yan B., Pyrethroid insecticides: Isoform-dependent hydrolysis, induction of cytochrome P450 3A4 and evidence on the involvement of the pregnane X receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **237**, 49-58 (2009)
- [48] Kaneko H., Matsuo M., Miyamoto J., Comparative metabolism of stereoisomers of cyphenothrin and phenothrin isomers in rats. *J. Pestic. Sci.*, **9**, 237-247 (1984)
- [49] Kaneko H., Izumi T., Ueda Y., Matsuo M., Miyamoto J., Metabolism and placental transfer of stereoisomers of tetramethrin isomers in pregnant rats. *J. Pestic. Sci.*, **9**, 249-258 (1984)
- [50] Kaneko H., Ohkawa H., Miyamoto J., Metabolism of tetramethrin isomers in rats. *J. Pestic. Sci.*, **6**, 425-435 (1981)
- [51] Tomigahara Y., Mori M., Shiba K., Isobe N., Kaneko H., Nakatsuka I., Yamada H.,

Metabolism of tetramethrin isomers in rat: II. Identification and quantitation of metabolites.

Xenobiotica, **24**, 1205-1214 (1994)

[52] Knaak J.B., Tan C., Dary C.C., Pesticide regulations: Exposure-dose modeling from FIFRA to FQPA. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **112**, 117-162 (2012)

[53] Soderlund D.M., Clark J.M., Sheets L.P., Mullin L.S., Piccirillo V.J., Sargent D., Stevens J.T., Weiner M.L., Mechanism of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, **171**, 3-59 (2002)

[54] Wolansky M.J., Gennings C, Crofton K.M., Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. *Toxicol. Sci.*, **89**, 271-277 (2006)

[55] Mirfazaelian A., Kim K-B., Anand S.S., Kim H.J., Tornero-Velez R., Bruckner J.V., Fisher J.W., Development of a physiologically based pharmacokinetic model for deltamethrin in the adult male Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.*, **93**, 432-442 (2006)

[56] Godin S.J., DeVito M.J., Hughes M.F., Ross D.G., Scollon E.J., Starr J.M., Setzer R.W., Conolly R.B., Tornero-Velez R., Physiologically based pharmacokinetic modeling of deltamethrin: Development of a rat and human diffusion-limited model. *Toxicol. Sci.*, **115**, 330-343 (2010)

[57] Tornero-Velez R., Mirfazaelian A., Kim K.B., Anand S.S., Kim H.J., Haines W.T., Bruckner J.V., Fisher J.W., Evaluation of deltamethrin kinetics and dosimetry in the maturing rat using a PBPK model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **244**, 208-217 (2010)

[58] Anand S.S., Bruckner J.V., Haines W.T., Muralidhara S., Fisher J.W., Padilla S., Characterization of deltamethrin metabolism by rat plasma and liver microsomes. *Toxicol. Ind. Health*, **13**, 407-84 (1997)

[59] Yamada T., Uwagawa S., Okuno Y., Cohen S.M., Kaneko H., Case Study: An evaluation of the human relevance of the synthetic pyrethroid metofluthrin-induced liver tumors in rats based on mode of action. *Toxicol. Sci.*, **108**, 59-68 (2009)

[60] Deguchi Y., Yamada T., Hirose Y., Nagahori H., Kushida M., Sumida K., Sukata T.,

Tomigahara Y., Nishioka K., Uwagawa S., Kawamura S., Okuno Y., Mode of action analysis for the synthetic pyrethroid metofluthrin-induced rat liver tumors: Evidence for hepatic CYP2B induction and hepatocyte proliferation. *Toxicol. Sci.*, **108**, 69-80 (2009)

[61] Okuda Y., Kushida M., Sumida K., Nagahori H., Nakamura Y., Higuchi H., Kawamura S., Lake B.G., Cohen S.M., Yamada T., Mode of action analysis for rat hepatocellular tumors produced by the synthetic pyrethroid momfluorothrin: Evidence for activation of the constitutive androstane receptor and mitogenicity in rat hepatocyte. *Toxicol. Sci.*, **158**, 412-430 (2017)

[62] Okuda Y., Kushida M., Kikumoto H., Nakamura Y., Higuchi H., Kawamura S., Cohen S.M., Lake B.G., Yamada T., Evaluation of the human relevance of the constitutive androstane receptor-mediated mode of action for rat hepatocellular tumor formation by the synthetic pyrethroid momfluorothrin. *J. Toxicol. Sci.*, **42**, 773-788 (2017)

[63] Yoshida R., Sakaki M., Sato R., Haga T., Nagaho E., Oshio H., Kamoshita K., S-53482 - a new N-phenyl phthalimide herbicide. *Brighton Crop Prot. Conf. - Weeds*, p.69-75 (1991)

[64] Matringe M., Scalla R., Studies on the mode of action of acifluorfen-methyl in nonchlorophyllous soybean cells. *Plant physiol.*, **86**, 619-622 (1988)

[65] 永野 栄喜, 佐藤 良, 山田 昌宏, 船木 雄司, 古田 リツ子, 藤澤 卓生, 川村 聡, フルミオキサジンの発明と開発, *住友化学*, **2001-I**, 14-25 (2001)

[66] Dailey H.A., Conversion of coproporphyrinogen to protoheme in higher eukaryotes and bacteria. *Biosynthesis of heme and chlorophylls*. McGraw-Hill Publishing Co. New York: p.123-161 (1990)

[67] Kawamura S., Kato T., Matsuo M., Sasaki M., Katsuda Y., Hoberman A.M., Yasuda M., Species difference in developmental toxicity of an N-phenylimide herbicide between rats and rabbits and sensitive period of the toxicity to rat embryos. *Cong. Anom.*, **35**, 123-132 (1995)

[68] Kawamura S., Yoshioka T., Kato T., Matsuo M., Yasuda M., Histological changes in rat embryonic blood cells as a possible mechanism for ventricular septal defects produced by an N-phenylimide herbicide. *Teratology*, **54**, 237-244 (1996)

- [69] Kawamura S., Kato T., Fantel A.G., Close link between protoporphyrin IX accumulation and developmental toxicity induced by N-phenylimide herbicides in rats. *Birth Defects Res. B*, **101**, 429-437 (2014)
- [70] Kawamura S., Kato T., Matsuo M., Katsuda Y., Yasuda M., Species difference in protoporphyrin IX accumulation produced by an N-phenylimide herbicide in embryos between rats and rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **141**, 520-525 (1996)
- [71] Kawamura S., Yoshioka T., Mito N., Kishimoto N., Nakaoka M., Fantel A.G., Mechanism of developmental effects in rats caused by an N-phenylimide herbicide: Transient fetal anemia and sequelae during mid-to-late gestation. *Birth Defects Res. B*, **107**, 45-59 (2016)
- [72] Tomigahara Y., Matsui M., Matsunaga H., Isobe N., Kaneko H., Nakatsuka I., Yoshitake A., Yamane S., Metabolism of 7-fluoro-6-(3,4,5,6-tetrahydrophthalimido)-4-(2-propynyl)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (S-53482) in rat. 1. Identification of a sulfonic acid type conjugate. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 305-312 (1999)
- [73] Famei L.I., Chang K.L., Timothy J.P., An h.p.l.c. assay for protoporphyrinogen oxidase activity in rat liver. *Biochem. J.*, **243**, 863-866 (1987)
- [74] Shepherd M., Dailey H.A., A continuous fluorimetric assay for protoporphyrinogen oxidase by monitoring porphyrin accumulation. *Anal. Biochem.*, **344**, 115-121 (2005)
- [75] Jacobs N.J., Jacobs J.M., Assay for enzymatic protoporphyrinogen oxidation, a late step in heme synthesis. *Enzyme*, **28**, 206-219 (1982)
- [76] Chesné C., Guyomard C., Grislain L., Clerc C., Fautrel A., Guillouzo A., Use of cryopreserved animal and human hepatocytes for cytotoxicity studies. *Toxicol. In Vitro*, **5**, 479-482 (1991)
- [77] Chesné C., Guyomard C., Fautrel A., Poullain M.G., Frémond B., De Jong H., Guillouzo A., Viability and function in primary culture of adult hepatocytes from various animal species and human beings after cryopreservation. *Hepatology*, **18**, 406-414 (1993)
- [78] Moulin M., McCormac A.C., Terry M.J., Smith A.G., Tetrapyrrole profiling in Arabidopsis

- seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 15178-15183 (2008)
- [79] Jacobs J.M., Sinclair P.R., Gorman N., Jacobs N.J., Sinclair J.F., Bement W.J., Walton H., Effects of diphenyl ether herbicides on porphyrin accumulation by cultured hepatocytes. *J. Biochem. Toxicol.*, **7**, 87-95 (1992)
- [80] Marks G., Follows B., Felt D., Cole S., Patterns of porphyrin accumulation in response to chemicals in chick embryo liver cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **61**, 546-553 (1983)
- [81] Sinclair P.R., Bement W.J., Bonkovsky H.L., Sinclair J.F., Inhibition of uroporphyrinogen decarboxylase by halogenated biphenyls in chick hepatocyte culture. *Biochem. J.*, **222**, 737-748 (1984)
- [82] Yu H., Yang H., Cui D., Lv L., Li B., Synthesis and herbicidal activity of diphenyl ether derivatives containing unsaturated carboxylates. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 11718-11726 (2011)
- [83] Zuo Y., Yang S.G., Luo Y.P., Tan Y., Hao G.F., Wu Q.Y., Xi Z., Yang G.F., Design and synthesis of 1-(benzothiazol-5-yl)-1*H*-1,2,4-triazol-5-ones as protoporphyrinogen oxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 3245-55 (2013)
- [84] Zuo Y., Wu Q., Su S., Niu C., Xi Z., Yang G.F., Synthesis, herbicidal activity, and QSAR of novel *N*-benzothiazolylpyrimidine-2,4-diones as protoporphyrinogen oxidase inhibitors. *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 552-562 (2016)
- [85] Lei B., Li J., Lu J., Du J., Liu H., Yao X., Rational prediction of the herbicidal activities of novel protoporphyrinogen oxidase inhibitors by quantitative structure – activity relationship model based on docking-guided active conformation. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 9593-9598 (2009)
- [86] Roy K., Paul S., Docking and 3D QSAR studies of protoporphyrinogen oxidase inhibitor 3*H*-pyrazolo[3,4-*d*][1,2,3]triazin-4-one derivatives. *J. Mol. Model.*, **16**, 137-153 (2010)
- [87] Heinemann I.U., Diekmann N., Masoumi A., Coch M., Messerschmidt A., Jahn M., Jahn D., Functional definition of the tobacco protoporphyrinogen IX oxidase substrate-binding site.

Biochem. J., **402**, 575-580 (2007)

[88] Corrigan A.V., Campbell J.A.H., Siziba K., Kirsch R.E., Meissner P.N., The expression of protoporphyrinogen oxidase in human tissues. *Cell. Mol. Biol.*, **55**, 89-95 (2009)

[89] Jinno H., Hatakeyama N., Hanioka N., Yoda R., Nishimura T., Ando M., Cytotoxic and porphyrinogenic effects of diphenyl ethers in cultured rat hepatocytes: Chlornitrofen (CNP), CNP-amino, chlomethoxyfen and bifenoX. *Food Chem. Toxicol.*, **37**, 69-74 (1999)

[90] Takaku T., Nagahori H., Sogame Y., Metabolism and physiologically based pharmacokinetics modelling of flumioxazin in pregnant animals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **277**, 242-249 (2014)

[91] 藤浪 嘩, 農業用殺菌剤プロシミドンの開発, *化学と生物*, **21**, 35-44 (1983)

[92] Hisada Y., Maeda K., Tottori N., Kawase Y., Plant disease control by *N*-(3',5'-dichlorophenyl)-1,2-dimethylcyclopropane-1,2-dicarboximide. *J. Pestic. Sci.*, **1**, 145-149 (1976)

[93] Hisada Y., Maeda K., Kawase Y., Miyamoto J., Uptake and translocation of a systemic fungicide, S-7131 in cucumber plant. *J. Pestic. Sci.*, **1**, 201-206 (1976)

[94] Hisada Y., Kato T., Kawase Y., Systemic movement in cucumber plants and control of cucumber gray mould by a new fungicide. *Neth. J. Plant Pathol.*, **83**, 71-78 (1977)

[95] Mikami N., Satogami H., Miyamoto J., Metabolism of procymidone in rats. *J. Pestic. Sci.*, **4**, 165-174 (1979)

[96] Shiba K., Kaneko H., Yoshino H., Kakuta N., Iba K., Nakatsuka I., Yoshitake A., Yamada H., Miyamoto J., Comparative metabolism of procymidone in rats and mice. *J. Pestic. Sci.*, **16**, 27-33 (1991)

[97] Nagahori H., Matsui M., Tomigahara Y., Matsunaga H., Kaneko H., Nakatsuka I., Metabolism of procymidone in female rabbits. *J. Pestic. Sci.*, **22**, 293-298 (1997)

[98] Tarui H., Abe J., Tomigahara Y., Kawamura S., Kaneko H., Metabolism of procymidone derivatives in female rats. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 10883-10888 (2009)

- [99] Pesticide residues in food - 2007. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. *FAO Plant Production and Protection Paper*, **191**, 202-210 (2007)
- [100] Ostby J., Kelce W.R., Lambright C., Wolf C.J., Mann P., Gray L.E., The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro. *Toxicol. Ind. Health*, **15**, 80-93 (1999)
- [101] Tomigahara Y., Tarui H., Nagahori H., Sugimoto K., Mogi M., Nishioka K., Kawamura S., Isobe N., Okuno Y., Kaneko H., Species differences in the developmental toxicity of procymidone -Remarkable variation in pharmacokinetics, metabolism, and excretion-. *J. Pestic. Sci.*, **40**, 111-123 (2015)
- [102] Inawaka K., Kishimoto N., Higuchi H., Kawamura S., Maternal exposure to procymidone has no effects on fetal external genitalia development in male rabbit fetuses in a modified developmental toxicity study. *J. Toxicol. Sci.*, **35**, 299-307 (2010)
- [103] Hosokawa S., Murakami M., Ineyama M., Yamada T., Yoshitake A., Yamada H., Miyamoto J., The affinity of procymidone to androgen receptor in rats and mice. *J. Toxicol. Sci.*, **18**, 83-93 (1993)
- [104] Tomigahara Y., Suzuki N., Tarui H., Saito K., Kaneko H., Anti-androgenic activity of procymidone and its metabolites. *J. Pestic. Sci.*, **39**, 181-186 (2014)
- [105] Tarui H., Tomigahara Y., Nagahori H., Sugimoto K., Mogi M., Kawamura S., Isobe N., Kaneko H., Species differences in the developmental toxicity of procymidone - Placental transfer of procymidone in pregnant rats, rabbits and monkeys -. *J. Pestic. Sci.*, in press.
- [106] Tomigahara Y., Tarui H., Matsui M., Kurosawa M., Kawamura S., Isobe H., No toxicological relevance to humans of rat developmental effects caused by procymidone: Distinct differences on biotransformation, protein binding and biliary excretion. *J. Pestic. Sci.*, in press.
- [107] Kato M., Matsui T., Nakajima M., Tateno C., Kataoka M., Soeno Y., Horie T., Iwasaki K., Yoshizato K., Yokoi T., Expression of human cytochromes P450 in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1402-1410 (2004)

- [108] Naritomi Y., Sanoh S., Ohta S., Chimeric mice with humanized liver: Application in drug metabolism and pharmacokinetics studies for drug discovery. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **33**, 31-39 (2018)
- [109] Katoh M., Sawada T., Soeno Y., Nakajima M., Tateno C., Yoshizato K., Yokoi T., *In vivo* drug metabolism model for human cytochrome P450 enzyme using chimeric mice with humanized liver. *J. Pharm. Sci.*, **96**, 428-437 (2007)
- [110] Yamazaki H., Suemizu H., Mitsui M., Shimizu M., Guengerich FP., Combining chimeric mice with humanized liver, mass spectrometry, and physiologically-based pharmacokinetic modeling in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, **29**, 1903-1911 (2016)
- [111] Katoh M., Tateno C., Yoshizato K., Yokoi T., Chimeric mice with humanized liver. *Toxicology*, **246**, 9-17 (2008)
- [112] Tateno C., Yoshizane Y., Saito N., Kataoka M., Utoh R., Yamasaki C., Tachibana A., Soeno Y., Asahina K., Hino H., Asahara T., Yokoi T., Furukawa T., Yoshizato K., Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am. J. Pathol.*, **165**, 901-912 (2004)

謝辞

本研究の終わりに臨み、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 病態機能分析学分野 小野 正博 教授ならびに佐治 英郎 名誉教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、本論文の作成に際し、懇切なる御指導を賜りました京都大学大学院 薬学研究科 病態機能分析学分野 渡邊 裕之 助教に心中より深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり貴重な御助言および御協力を戴きました住友化学株式会社 生物環境科学研究所 片木 敏行 氏、磯部 直彦 氏、川村 聡 氏、富ヶ原 祥隆 氏、藤澤 卓生 氏、永堀 博久 氏、小高 理香 氏、バイオサイエンス研究所 住田 佳代 氏、味方 和樹 氏に心から深謝いたします。

本研究の遂行および本論文の作成に際しご協力を戴きました住友化学株式会社 生物環境科学研究所 細胞生化学グループ 動物代謝テーマならびに環境科学グループ 環境代謝テーマの皆様へ深く感謝いたします。

学位論文の基礎となる学術雑誌公表論文のリスト

第1章 実験動物における動態および毒性メカニズム精緻評価の重要性

第1-1節 メトフルトリンのラットにおける代謝

Abe J., Nagahori H., Tarui H., Tomigahara Y., Isobe N., Metabolism of metofluthrin in rats: I. Identification of metabolites. *Xenobiotica*, **48**, 157-169 (2018)

<https://doi.org/10.1080/00498254.2017.1283718> Rights managed by Taylor & Francis

Abe J., Tomigahara Y., Tarui H., Nagahori H., Kurosawa M., Sugimoto K., Isobe N., Metabolism of metofluthrin in rats: II. Excretion, distribution and amount of metabolites. *Xenobiotica*, in press (published online, 20 Nov 2017)

<https://doi.org/10.1080/00498254.2017.1397813> Rights managed by Taylor & Francis

第1-2節 プロフルトリンのラットにおける代謝

Abe J., Nagahori H., Omori R., Mikata K., Kurosawa M., Tomigahara Y., Isobe N., Metabolism of (Z)-(1R,3R)-profluthrin in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 8651-8661 (2015)

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03321> Copyright © 2015, American Chemical Society

第2章 原因物質の動態および活性種差の精査に基づくヒト安全性評価

Abe J., Isobe N., Mikata K., Nagahori H., Naito Y., Saji H., Ono M., Kawamura S., Flumioxazin metabolism in pregnant animals and cell-based protoporphyrinogen IX oxidase (PPO) inhibition assay of fetal metabolites in various animal species to elucidate the mechanism of the rat-specific developmental toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **339**, 34-41 (2018)

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.11.028> © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

第3章 ヒト肝キメラマウスを用いた動態の解明によるヒト安全性評価

Abe J., Tomigahara Y., Tarui H., Omori R., Kawamura S., Identification of metabolism and excretion differences of procymidone between rats and humans using chimeric mice: Implications for differential developmental toxicity. *J. Agric. Food Chem.*, in press (published online, 9 Jan 2018)

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05463> Copyright © 2018, American Chemical Society