



Title	哺乳動物における農薬の代謝とヒトへの外挿に関する研究
Author(s)	高久, 朋之
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56176
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士論文

哺乳動物における農薬の代謝と
ヒトへの外挿に関する研究

高久 朋之

目次

緒論	1
本論	5
第 1 章 プロピリスルフロンのラットにおける <i>in vivo</i> 代謝研究	5
実験方法	6
結果	13
考察	35
小括	39
第 2 章 ペルメトリンのヒトおよびラットにおける <i>in vitro</i> 代謝研究	40
実験方法	42
結果および考察	46
小括	53
第 3 章 フルミオキサジンのヒトおよびラットにおける PBPK モデル研究	54
実験方法	56
結果	63
考察	71
小括	74
第 4 章 化学物質のヒトにおける胎盤透過性予測のための QSAR 研究	75
実験方法	76
結果および考察	78
小括	84
結論	85
謝辞	88
参考文献	89

緒論

食糧の安定生産等に用いられる農薬は、我々の生活に欠かすことのできない化学物質である。農作物の病害虫（菌、昆虫、だに等）や雑草の防除に優れた効果を有し、ヒトおよび環境に対する安全性に優れた農薬が望まれているため、世界中の企業により精力的に農薬開発が進められている。以前は、優れた防除効果をもつ殺虫剤 Dichloro-diphenyl-trichloroethane（DDT）やパラチオン、除草剤パラコート等の農薬が使用されていたが、DDT においては、作物や土壌に残留することが明らかになったこと、そしてパラチオンおよびパラコートにおいては、ヒトに対する中毒、死亡事故が多数発生したことにより、現在は農薬として使用されることは少なくなっている¹⁾。今日では、ヒトおよび環境に対する安全性が確保された農薬のみが上市を許可されている。したがって、新規農薬の開発において、安全性評価研究は重要な役割を担っている。

農薬の安全性評価では、ヒトおよび環境に対する農薬の影響を調べるため、多数の試験が実施される²⁻³⁾。農薬の使用者は高濃度の農薬に暴露される可能性があることから、使用者への安全性を調べる目的で、急性毒性試験等が実施される。また、消費者は農薬が使用された農作物を食べることにより、長期的に微量な農薬を摂取する可能性があることから、消費者への安全性を担保するため、1年間反復投与毒性試験等が行われる。さらに、農薬の毒性評価に資することを目的とした、動物代謝試験の実施も必要とされている。

哺乳動物における代謝試験により、農薬の体内における蓄積性や毒性代謝物の生成について明らかになるため、安全性評価の中で果たす役割は大きい⁴⁾。一般的に代謝試験では、¹⁴C 等の放射性同位元素で標識した化合物をラット等の実験動物に投与し、尿、糞および呼吸への排泄率、組織への分布、血中濃度、代謝物の化学構造を明らかにする。放射性同位元素を用いる利点は、化合物の体内での挙動を代謝物も含めて追跡できることである⁵⁾。以

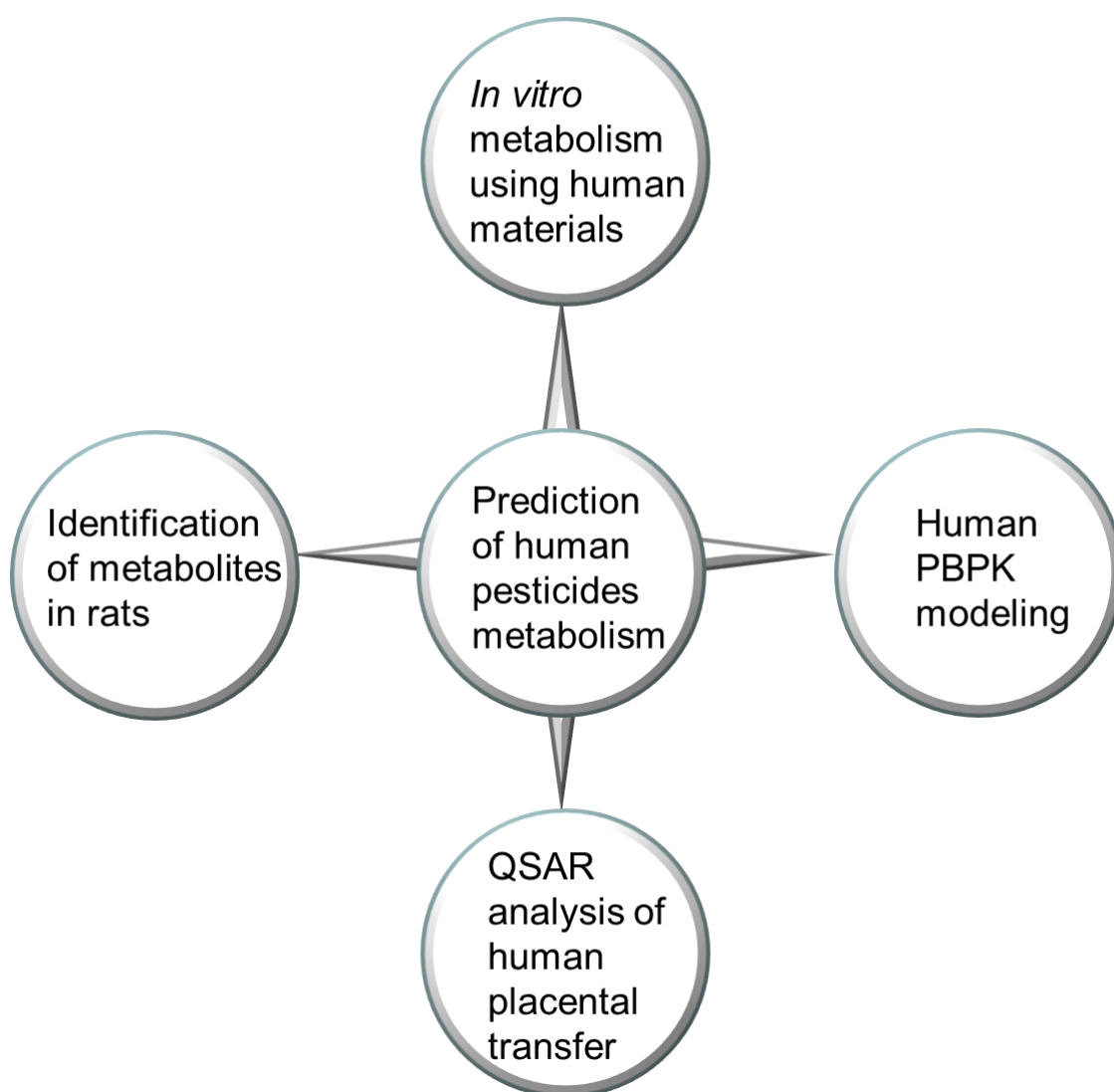
上のように、農薬の安全性評価において代謝試験は重要であるが、代謝には動物とヒトで種差があることが知られており、それを明確化することが重要と考える⁶⁾。動物における代謝をヒトに外挿する方法としては、*in vitro* 代謝、生理学的薬物動態 (PBPK) モデル、定量的構造活性相関 (QSAR) 解析、バイオモニタリング等が知られている。

肝臓のミクロソーム画分 (肝ミクロソーム) 等を用いた *in vitro* 代謝研究は、代謝のヒトへの外挿に有用である⁷⁾。化合物をヒトの肝ミクロソーム、もしくは肝細胞とインキュベートし、反応終了後のサンプルを高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、薄層クロマトグラフィー (TLC)、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) 等で分析することにより、ヒトの代謝物を検出することができる。肝ミクロソームには主に代謝酵素シトクロム P450 (CYP) が含まれているため、肝ミクロソームによる *in vitro* 代謝により酸化や水酸化といった第 1 相代謝反応を調べることができるが、肝細胞には抱合反応に必要な補酵素等も含まれているため、肝細胞を用いた *in vitro* 代謝ではグルクロン酸抱合等の第 2 相反応も検出できる⁸⁾。

PBPK モデルでは、全身を肝臓、腎臓、脂肪、脳、血液、消化管といった多くのコンパートメントに分け、物質収支式を解き、血中濃度や組織中濃度を計算する⁹⁾。各コンパートメントは、生理学的および化合物特異的パラメータを必要とする。血流量や組織重量等の生理学的パラメータは通常文献値を引用し、代謝速度や吸収率等の化合物特異的パラメータは実測値、もしくは *in silico* による推定値を用いる。ヒト特有のパラメータを用いて PBPK モデルを作成すれば、ヒトにおける代謝を予測できる。

QSAR 研究の一種である *in silico* 代謝予測研究では、代謝部位や速度に関する情報が得られ、SmartCYP は代表的なソフトウェアとして知られている¹⁰⁾。また近年、農薬のヒトにおける暴露を調べるため、バイオモニタリング研究が実施されている¹¹⁾。バイオモニタリング研究では、ヒトの排泄物 (尿) や血漿中に農薬がどの程度含まれているか調査される。

本博士論文では、安全性の高い農薬開発に貢献するため、直接ヒトへの投与により代謝実験ができない農薬について、動物における代謝をヒトに外挿する手法を確立することを目的とした。農薬を有効成分により分類すると、殺虫剤、除草剤、および殺菌剤の 3 種類に分けることができるが、本博士論文では代謝を受けやすいことが明らかとなった除草剤プロピスルフロン、殺虫剤ペルメトリン、および除草剤フルミオキサジンを対象とした。なお、農薬によっては代謝を受けにくい化合物も知られているが、その場合、ヒトへの外挿を目的とした研究を実施することは困難と考えられる。第 1 章では、プロピスルフロンのラットにおける *in vivo* 代謝実験により詳細な代謝を明らかにし、特に、ヒトと動物における代謝種差を明確化する際に重要な代謝物に関して、機器分析を駆使して主要代謝物から微量代謝物に至るまで多数の代謝物の構造を決定した。第 2 章では、ペルメトリンのヒトにおける詳細な代謝を、ヒト肝ミクロソーム、代謝に関わる酵素（CYP、UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT））を用いた *in vitro* 代謝実験により明らかにした。第 3 章では、フルミオキサジンのヒトにおける体内濃度を予測するための PBPK モデルを構築した。さらに、農薬の催奇形性を理解する上で重要である胎盤透過性に関して、ヒトに外挿する手法を確立しようと考えたが、農薬においてはヒトの胎盤透過性に関するデータを得ることが困難であるため、農薬に限らず、医薬や一般化学物質まで研究対象とすることとした。第 4 章では、ヒトにおける化学物質の胎盤透過性を簡便に予測するための QSAR 式を構築した。第 1～4 章で述べる研究はそれぞれが動物における代謝をヒトに外挿する際に必要であり、これらの技術を複合的に適用することにより精緻な外挿が実現できると考えた（Summary figure）。



Summary figure. Complex evaluation method for predicting human pesticides metabolism.

本論

第 1 章 プロピリスルフロンのラットにおける *in vivo* 代謝研究

スルホニルウレア系除草剤 (SU 剤) は、従来の除草剤と比較して低用量で効果を発揮し、広い除草スペクトルを有する農薬である。対象としない生物に対する安全性が高く、構造修飾により多くの作物に対し選択性を付与できることから、選択性除草剤において重要な位置を占めている¹²⁻¹⁵⁾。SU 剤は分岐鎖アミノ酸の合成に必要なアセト乳酸合成酵素 (ALS) を阻害することにより、除草効果を発揮する¹⁶⁻¹⁸⁾。しかし、SU 剤が広く使用されるようになったため、SU 剤に対して抵抗性を有する雑草の出現が問題となってきた¹⁹⁾。抵抗性雑草は、ALS の変異により生じると報告されている²⁰⁻²¹⁾。

プロピリスルフロンは、住友化学株式会社により創製された水稻用 SU 剤であり、SU 剤抵抗性雑草にも除草効果を示す²²⁻²³⁾。プロピリスルフロンの安全性評価として実施された毒性試験から、プロピリスルフロンの毒性は低く、安全性の高い化合物であることが明らかにになっている²³⁾。

SU 剤の代謝反応として SU 結合の開裂、水酸化、脱メチル化およびグルクロン酸抱合が報告されているが、プロピリスルフロンは従来の SU 剤と比較して顕著に水溶解度が低く、特徴的な代謝パターンとなる可能性が考えられた²⁴⁾。第 1 章では、プロピリスルフロンの *in vivo* 代謝研究を行い、¹⁴C 排泄率、血中 ¹⁴C 濃度、組織中 ¹⁴C 濃度、代謝物、*in vitro* 血漿タンパク結合率について検討した。

実験方法

化合物

プロピリスルフロンのプロピル基の 1 位の炭素を ^{14}C 標識した $[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ プロピリスルフロンの、およびピリミジン環の 5 位の炭素を ^{14}C 標識した $[\text{pm-}^{14}\text{C}]$ プロピリスルフロンの比放射能は、2.15 GBq/mmol および 2.04 GBq/mmol であった (Figure 1)。標識体の放射化学的純度は TLC により分析し、99.1% および 98.3% 以上であった。非標識体のプロピリスルフロンの純度は、100% であった。合成代謝物標品 (PISN、PHDU、PIHU、ACPS、ADPM、ADPM-OH および PDMU) は代謝物の同定に用いた (Figure 2)。他の試薬は特に記述がない限り、特級以上を用いた。

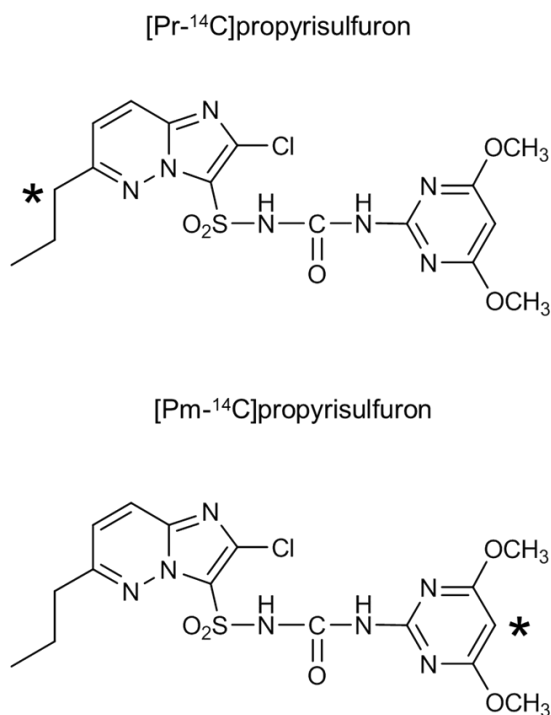


Figure 1. Chemical structures of $[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ propyrisulfuron and $[\text{pm-}^{14}\text{C}]$ propyrisulfuron. * represents the position of ^{14}C .

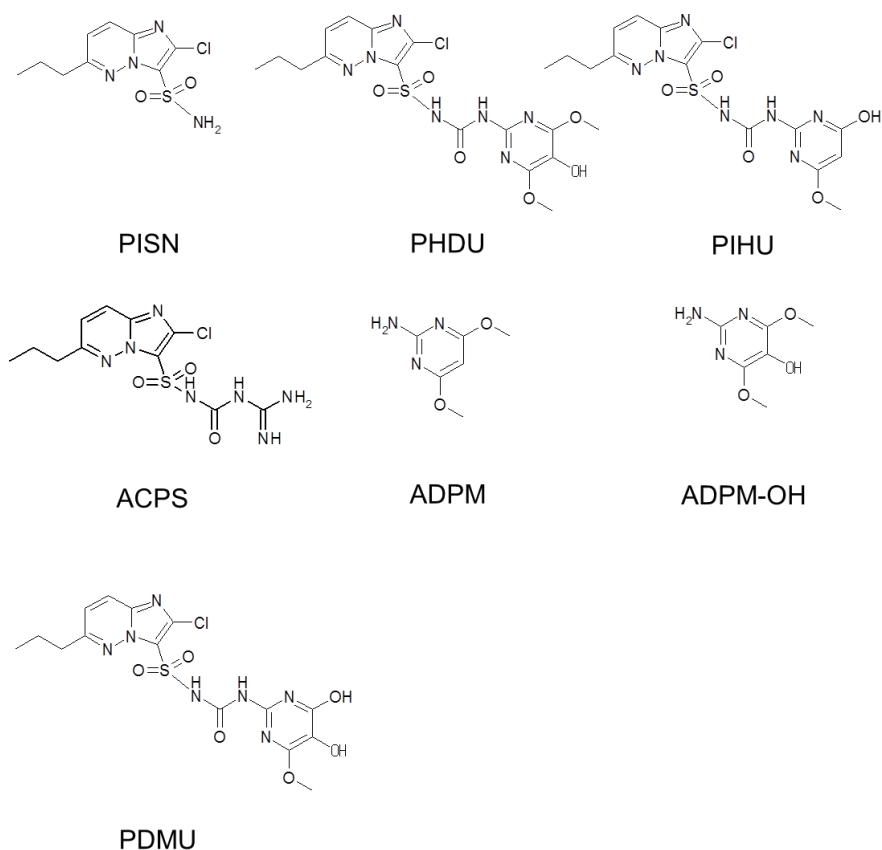


Figure 2. Chemical structures of PISN, PHDU, PIHU, ACPS, ADPM, ADPM-OH and PDMU.

TLC

分析にはシリカゲル 60F₂₅₄TLC プレート (20×20 cm、0.25mm 厚、Merck) を用いた。展開条件は、クロロホルム/アセトン/ギ酸/水、40:40:10:5 (v/v/v/v) およびクロロホルム/メタノール、9:1 (v/v) の 2 条件とした。TLC プレート上の放射性化合物を imaging plate (富士フイルム) に室温で密着させ、fluorescent image analyzer (FLA-5000、富士フイルム) を用いたオートラジオグラフィーにより検出した。

HPLC

HPLC 装置 (ポンプ : L-7100 もしくは L-6300、UV 検出器 : L-7400 もしくは L-4200、日

立)は RI 検出器 (Radiomatic 505TR RI detector、PerkinElmer) と接続して使用した。分析用カラムは、Atlantis dC18 column (4.6 mm I.D.×150 mm、Waters) を用いた。分析時の注入量は、サンプルの濃度に応じて 5–100 μ L とした。移動相はアセトニトリルおよび 0.1% トリフルオロ酢酸水を用い、5:95 (v/v) から 40 分で 30:70 (v/v) となるように分析した。

LC-MS

LC-MS 装置 (LC: Finnigan Surveyor、MS: LTQ XL、Thermo Fisher Scientific) は RI 検出器と接続して使用した。移動相の条件は、実験方法の HPLC に記載した条件と同様とした。ESI を質量分析におけるイオン化の方法として用い、代謝物のイオン化効率に応じて、ポジティブもしくはネガティブイオンモードで測定した。キャピラリーの温度は 200°C、電圧は 8 V、コリジョンエネルギーは 35% とした。

NMR

NMR 分光計として、Varian UNITY 400 plus (Agilent) を用いた。NMR 測定における溶媒は、重メタノールとした。

放射化学分析

尿、胆汁および抽出液等の放射能は、LSC (TRI-CARB 2500TR、PerkinElmer) により測定した。回収した糞は水でホモジナイズし、糞ホモジネートを燃焼後、LSC により放射能を測定した。血液および組織は、燃焼後、LSC により放射能を測定した。

実験動物

雄性および雌性 BrlHan:WIST@Jcl (GALAS) ラットは日本クレアから入手した。動物は次の条件で動物室にて飼育した：室温 (21~25°C)、湿度 (40~70%)、換気 (1 時間に 10

回以上)、12 時間周期の照明。化合物を投与する前の動物はエコネージ (290 mm×340 mm×170 mm、日本クレア)、投与後は代謝ケージにおいて飼育した。動物は固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業)、ろ過水道水を自由に摂取させた。全ての動物実験は、住友化学株式会社生物環境科学研究所動物実験倫理指針に従って行われた。

^{14}C 排泄実験

7 週齢の雌雄ラットに $[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ プロピリスルフロンを 5 および 1000 mg/kg、 $[\text{pm-}^{14}\text{C}]$ プロピリスルフロンを 5 mg/kg にて単回経口投与した。各投与群あたりの動物数は、雌雄 4 匹ずつとした。低用量 (5 mg/kg) は動物に毒性を与えない用量とし、高用量 (1000 mg/kg) は試験ガイドラインの上限用量とした。投与後、6、12 時間、1、2、3、4、5、6 および 7 日の尿、投与後、1、2、3、4、5、6 および 7 日の糞を回収した。呼気は低用量の投与後 1 日のみ、10% NaOH 水溶液 200 mL で呼気中の ^{14}C をトラップすることにより回収した。尿と糞を回収後の代謝ケージは水で洗い、その洗浄液も回収した。洗浄液中の ^{14}C は尿の回収率を含めた。

^{14}C 胆汁排泄実験

雌雄ラットの胆管に麻酔下でカニューレ (Becton Dickinson and Company) を挿入し、 $[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ プロピリスルフロンを 5 mg/kg にて単回経口投与した。動物数は、雌雄 4 匹ずつとした。投与後 1、2 および 3 日の尿、胆汁および糞を回収した。

^{14}C 血中濃度実験

雌雄ラットに $[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ プロピリスルフロンを 5 および 1000 mg/kg にて単回経口投与した。各投与群あたりの動物数は、雌雄 4 匹ずつとした。投与後、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72、120 および 168 時間の血液を尾静脈から採取した。血液の約 0.1g を全血試料として採

取し、残りを遠心分離（2000×g、5分、4℃）することにより、血漿を得た。半減期は、低用量において投与後 24–168 時間、高用量において投与後 48–168 時間の血漿中濃度を用いて、直線回帰により計算した。 AUC （0–168 時間）は、直線台形法により求めた。 AUC （0– ∞ ）は、 AUC （0–168 時間）および 168 時間から ∞ の面積との和で求めた。168 時間から ∞ の面積は、半減期算出に用いた回帰式にあてはめて算出した。

^{14}C 分布実験

雌雄ラットに $[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ プロピリスルフロンを 5 および 1000 mg/kg にて単回経口投与した。各投与群あたりの動物数は、雌雄 9 匹ずつとした。投与後 4、24 および 72 時間後に麻酔下で腹部大動脈より全採血し、安楽死させた。各時点あたりの動物数は、雌雄 3 匹ずつとした。なお、投与後 168 時間の測定には、 ^{14}C 排泄実験の動物をそのまま用いた。安楽死後、放射能測定のため組織を摘出した。

代謝物分析のための前処理

代謝物同定において MS および MSn スペクトルを測定する場合は、尿を固相抽出カートリッジ（OASIS HLB、Waters）により濃縮・精製した後、LC-MS に供した。糞ホモジネートまたは血漿は、約 4 倍量（v/w）の 50%アセトニトリル水溶液（v/v）を加えて 20 分間振とうし、5 分間の超音波処理に供した後、遠心分離により上清と残渣に分離した（2 回実施）。次に、同量のアセトニトリルを用いて同様に振とう、超音波処理、遠心し、上清と残渣に分画した（2 回実施）。得られた 4 回分の上清を一つに合わせて糞および血漿抽出液とし、その一部を窒素気流でほぼ濃縮乾燥した後にアセトンで再溶解し、分析試料とした。組織（肝臓および腎臓）は、同量（v/w）の水を加え、氷冷下でホモジナイズし、得られた組織ホモジネートを糞ホモジネートと同様に処理し、分析試料とした。

代謝物同定

測定試料中の代謝物および未変化体は、HPLC によるクロマトグラフィーおよび LC-MS により同定した。いずれの標品とも一致しない代謝物については、酵素または酸加水分解によって生成する分解物と標品の HPLC によるクロマトグラフィー、MS および MS n スペクトル、単離精製物の NMR スペクトル等の結果に基づいて構造を同定または推定した。酵素加水分解においては、分析試料に 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) と加水分解酵素 (β -glucuronidase/aryl sulfatase, from *Helix pomatia*, Merck) を加えて 37°C で 3 時間振とうした。反応液に等量のアセトニトリルを加えて反応を停止させた後、遠心分離 (15000 rpm、5 分間) に供し、得られた上清を分析試料とした。酸加水分解においては、分析試料に 2N 塩酸溶液を加えて 50°C で 6 時間振とうした。反応液に約 2 倍量の 1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて中和し、分析試料とした。

代謝物定量

尿、胆汁、および前処理した糞および組織の各分析試料中の代謝物を、実験方法の HPLC に記載した条件で定量した。得られた結果から、試料中における各代謝物の割合 (% of dose もしくは % in sample) を算出した。

in vitro 血漿タンパク結合率測定

血漿タンパク結合率の測定に使用する遠心型タンパク結合試験器 (セントリフリー、Amicon) の限外ろ過膜に対する、[pr- 14 C]プロピリスルフロンの透過性を検討した。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に、[pr- 14 C]プロピリスルフロンのアセトニトリル溶液 (3 および 30 ppm) を添加し、その 1 mL を遠心型タンパク結合試験器に入れて遠心 (1000 \times g、20°C、5 分間) し、下記の式により [pr- 14 C]プロピリスルフロンの膜透過率を算出した。

膜透過率[%] = (濾液中 14 C 濃度 \div 濾過前緩衝液中 14 C 濃度) \times 100

また、 $[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ プロピリスルフロンのアセトニトリル溶液を 3 および 30 ppm となるように血漿に添加し、その 1 mL を遠心型タンパク結合試験器に加えた。これを $1000\times g$ 、 20°C で 10 分間遠心し、下記の式により血漿タンパク結合率を算出した。なお、血漿タンパク結合率測定で設定したプロピリスルフロンの濃度は、 ^{14}C 血中濃度実験により得られた最高血中濃度およびその 1/10 とした。

タンパク結合率[%] = $\{1 - (\text{濾液中 } ^{14}\text{C} \text{ 濃度} \div (\text{膜透過率} \div 100)) \div \text{濾過前血漿中 } ^{14}\text{C} \text{ 濃度}\} \times 100$

結果

^{14}C 排泄

[pr- ^{14}C]プロピリスルフロンのラットに単回経口投与後 7 日間の尿、糞、および呼気中への ^{14}C 排泄プロファイルは、Figure 3 に示した。5 mg/kg 投与時の両標識体の尿および糞中への ^{14}C 排泄は同等であり、雄性ラットにおける投与後 1 日の尿および糞中累積排泄率は 9.5–11.8% および 25.6–36.3% であり、投与後 7 日の尿および糞中累積排泄率は 16.7–17.9% および 80.9–82.3% であった。一方、雌性ラットにおける投与後 1 日の尿および糞中累積排泄率は 13.5–15.5% および 14.8–21.7% であり、投与後 7 日の尿および糞中累積排泄率は 29.3–29.8% および 64.6–69.4% であった。以上から、 ^{14}C の主要排泄経路は雌雄ともに糞中であつた。また、呼気中への排泄は認められなかった。後述の通り、胆汁中に排泄された ^{14}C 中に未変化体は認められず、未吸収のプロピリスルフロンは糞中に排泄されたため、 ^{14}C の体内吸収率は、[総 ^{14}C 回収率 – 糞中未変化体排泄量]より、88.0–93.7% と算出された。

1000 mg/kg 投与時の雄性ラットにおける投与後 7 日の尿および糞中累積排泄率は 5.7% および 97.4% であった。一方、雌性ラットにおける投与後 7 日の尿および糞中累積排泄率は 11.2% および 89.2% であった。以上から、主要排泄経路は雌雄ともに糞中であつた。また ^{14}C の体内吸収率は、21.3–23.2% と算出された。

胆管カニュレーション済みのラットに [pr- ^{14}C]プロピリスルフロンを 5 mg/kg にて単回経口投与後 3 日間の尿、糞、および胆汁中への ^{14}C 排泄率を測定した。雄性ラットにおける投与後 1 日の尿、糞および胆汁中累積排泄率は 2.9、0.1 および 12.4% であり、投与後 3 日の尿、糞および胆汁中累積排泄率は 18.5、11.6 および 37.6% であった。一方、雌性ラットにおける投与後 1 日の尿、糞および胆汁中累積排泄率は 1.4、0.1 および 3.2% であり、投与後 3 日の尿、糞および胆汁中累積排泄率は 21.9、9.3 および 33.5% であった。以上から、雌雄ともに

胆汁排泄が主要な排泄経路であった。

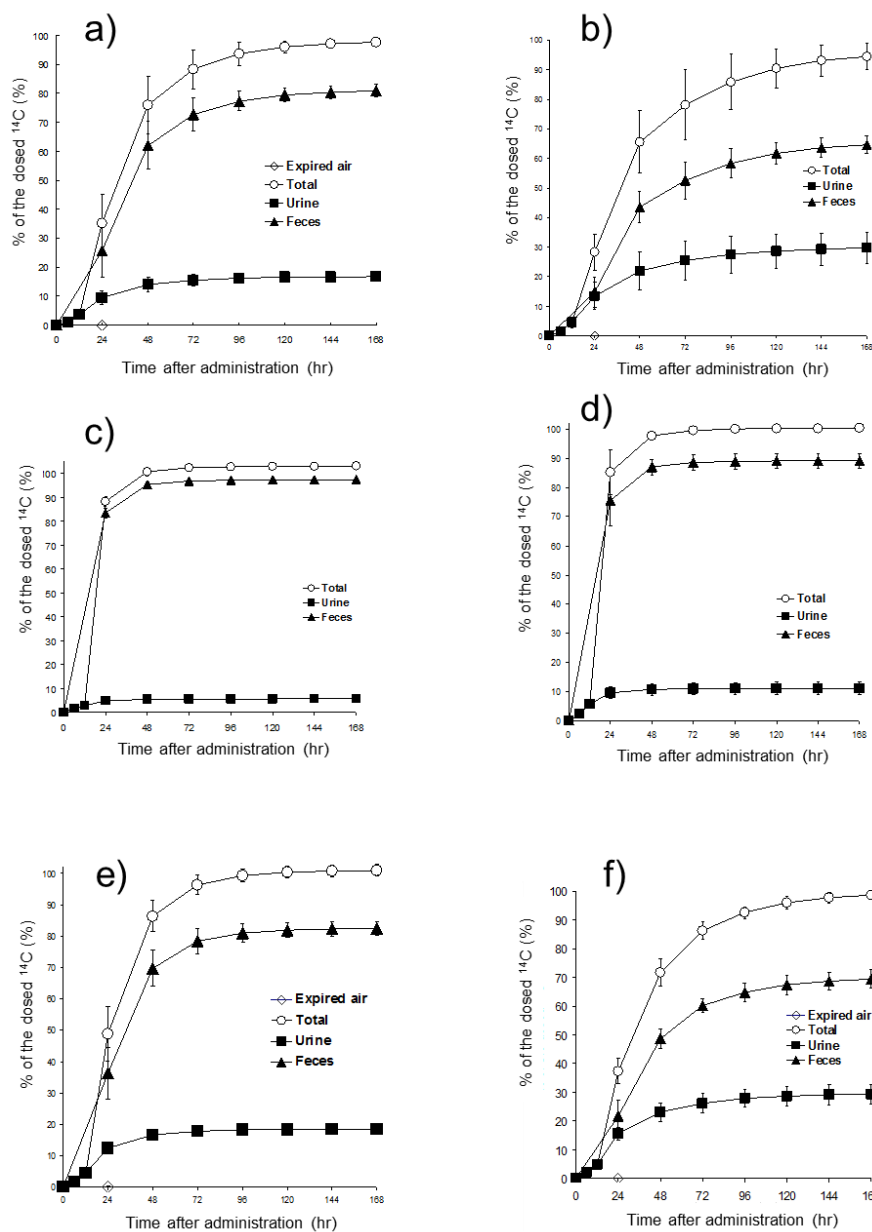


Figure 3. Cumulative ^{14}C excretion after a single oral administration of [$\text{pr-}^{14}\text{C}$] propyrisulfuron (a-d) and [$\text{pm-}^{14}\text{C}$] propyrisulfuron (e-f) in male and female rats at doses of 5 and 1000 mg/kg : a) male, 5 mg/kg; b) female, 5 mg/kg; c) male, 1000 mg/kg; d) female, 1000 mg/kg; e) male, 5 mg/kg; f) female, 5mg/kg. Points and bars represent the mean values and standard deviations for data from four animals.

^{14}C 血中濃度

ラットに $[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ プロピリスルフロンを 5 mg/kg および 1000 mg/kg にて単回経口投与後の血液および血漿中 ^{14}C 濃度推移を、Figure 4 に示した。また、算出した薬物動態パラメータを、Table 1 にまとめた。5 mg/kg 投与時において、雌雄ともに投与後 12 時間で最高血漿中濃度 (C_{max}) に到達した (雄性ラット: 32.0 ± 0.95 ppm、雌性ラット: 32.5 ± 1.50 ppm)。その後血漿中の ^{14}C は、雄性および雌性ラットにおいて半減期 ($t_{1/2}$) が 23.3 および 27.1 時間にて消失した。また、血液/血漿の ^{14}C 濃度比は、いずれの時点においてもほぼ同様であり、雄性および雌性ラットで 0.52–0.61 および 0.49–0.62 であった。1000 mg/kg 投与時においては、雌雄ともに投与後 4 時間で C_{max} に到達した (雄性ラット: 786.2 ± 68.01 ppm、雌性ラット: 887.2 ± 140.12 ppm)。その後血漿中の ^{14}C は、雄性および雌性ラットにおいて $t_{1/2}$ が 31.7 および 32.1 時間にて消失した。また、血液/血漿の ^{14}C 濃度比は、いずれの時点においてもほぼ同様であり、雄性および雌性ラットで 0.53–0.64 および 0.52–0.63 であった。

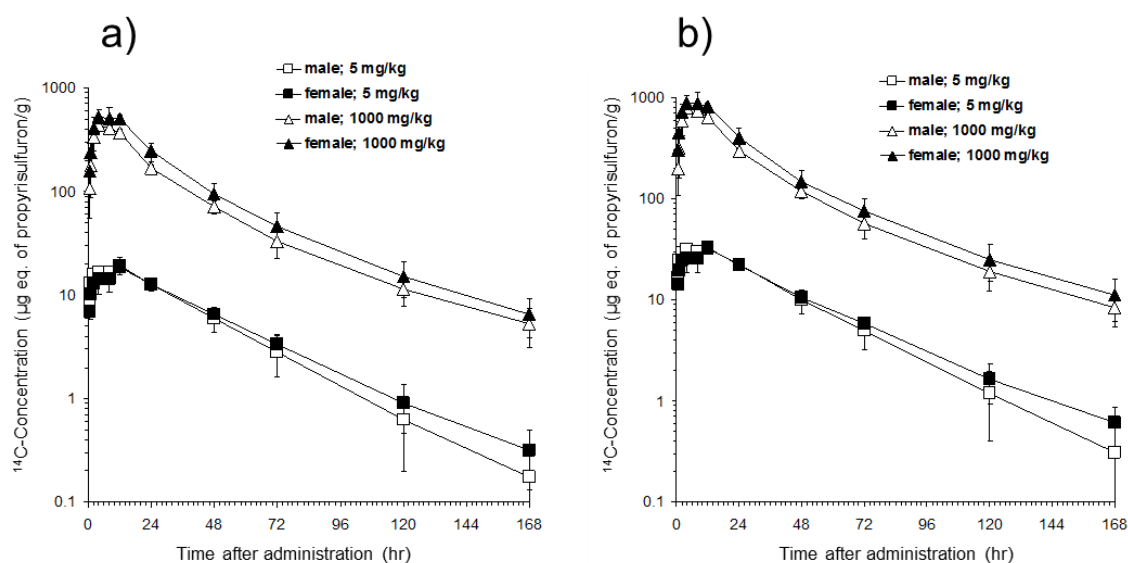


Figure 4. ^{14}C concentration in blood and plasma after a single oral administration of $[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ propyrisulfuron in male and female rats at doses of 5 and 1000 mg/kg: a) blood; b) plasma. Points and bars represent the mean values and standard deviations for data from three animals.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of ^{14}C in plasma after a single oral administration of $[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ propyrisulfuron at 5 and 1000 mg/kg in male and female rats.

		5 mg/kg		1000 mg/kg	
		male	female	male	female
T_{max} (hr)		12	12	4	4
C_{max} (µg eq. of propyrisulfuron/g)		32.0±	32.5±	786.2±	887.2±
		0.95	1.50	68.01	140.12
$t_{1/2}$ (hr)		23.3	27.1	31.7	32.1
AUC (µg eq. of propyrisulfuron·hr/g)	(0–168hr)	1424	1452	22954	29281
	(0–∞)	1434	1473	23302	29751

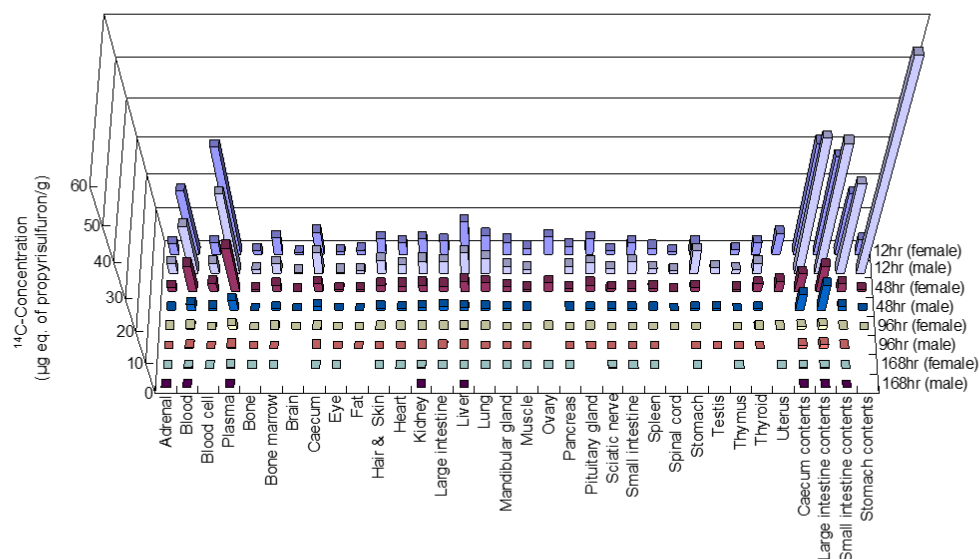
¹⁴C 組織分布

雌雄ラットに [pr-¹⁴C]プロピリスルフロンを 5 mg/kg にて単回経口投与後の組織中 ¹⁴C 濃度を、Figure 5 に示した。大腸とその内容物を除く全ての組織は、投与後 4 時間で最高濃度に到達し、その後減少した。消化管やその内容物を除き、血漿中 ¹⁴C 濃度 (23.47–30.67 ppm) より高濃度の組織は認められなかった。さらに、組織/血漿濃度比は、投与後 12、48 および 96 時間のいずれにおいてもほぼ同様であり、組織中の ¹⁴C は血漿と同様の速度で消失した。

雌雄ラットに [pr-¹⁴C]プロピリスルフロンを 1000 mg/kg にて単回経口投与後の組織中 ¹⁴C 濃度を、Figure 5 に示した。全ての組織は投与後 4 時間で最高濃度に到達し、その後減少した。消化管やその内容物を除き、血漿中 ¹⁴C 濃度 (204.2–255.8 ppm) より高濃度の組織は認められなかった。さらに、組織/血漿濃度比は、投与後 4 および 24 時間のいずれにおいてもほぼ同様であり、組織中の ¹⁴C は血漿と同様の速度で消失した。

雌雄ラットに [pm-¹⁴C]プロピリスルフロンを 5 mg/kg にて単回経口投与後 168 時間の組織中 ¹⁴C 濃度は、雄性ラットにて腎臓 (0.11 ppm)、血球 (0.06 ppm)、血液 (0.05 ppm) および血漿 (0.04 ppm)、雌性ラットにて血漿 (0.39 ppm)、血液 (0.26 ppm) および大腸内容物 (0.24 ppm) が比較的高かった (Figure 6)。

a)



b)

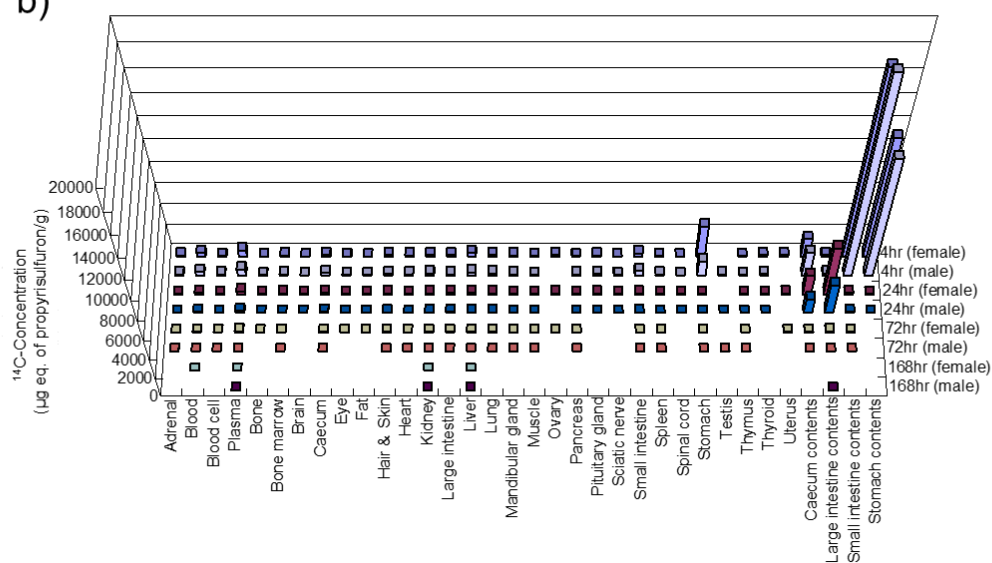


Figure 5. ^{14}C levels in tissues of male and female rats after a single oral administration of $[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ propyrisulfuron in male and female rats at doses of 5 and 1000 mg/kg: a) 5 mg/kg, b) 1000 mg/kg. Bar charts represent the mean values for data from three animals.

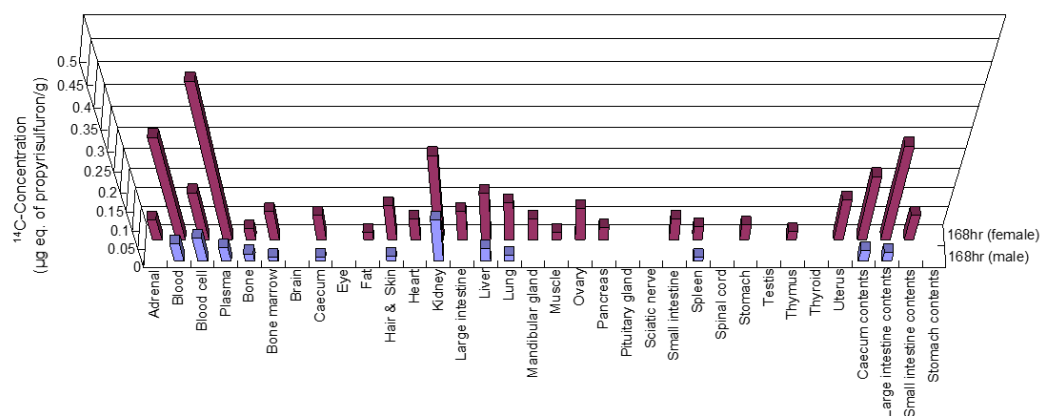


Figure 6. ^{14}C levels in tissues of male and female rats after a single oral administration of $[\text{pm-}^{14}\text{C}]$ propyrisulfuron in male and female rats at a dose of 5 mg/kg. Bar charts represent the mean values for data from three animals.

尿および糞中における代謝物同定

$[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ プロピリスルフロンのおよび $[\text{pm-}^{14}\text{C}]$ プロピリスルフロンをラットに単回経口投与後の尿および糞抽出液を、HPLC により分析した。検出された ^{14}C ピークは、HPLC の溶出時間に応じて昇順に Mn ($n=1-17$) と名付けた。尿および糞抽出液の代表的な HPLC クロマトグラムを Figure 7 に、各代謝物の溶出時間を Table 2 に示した。

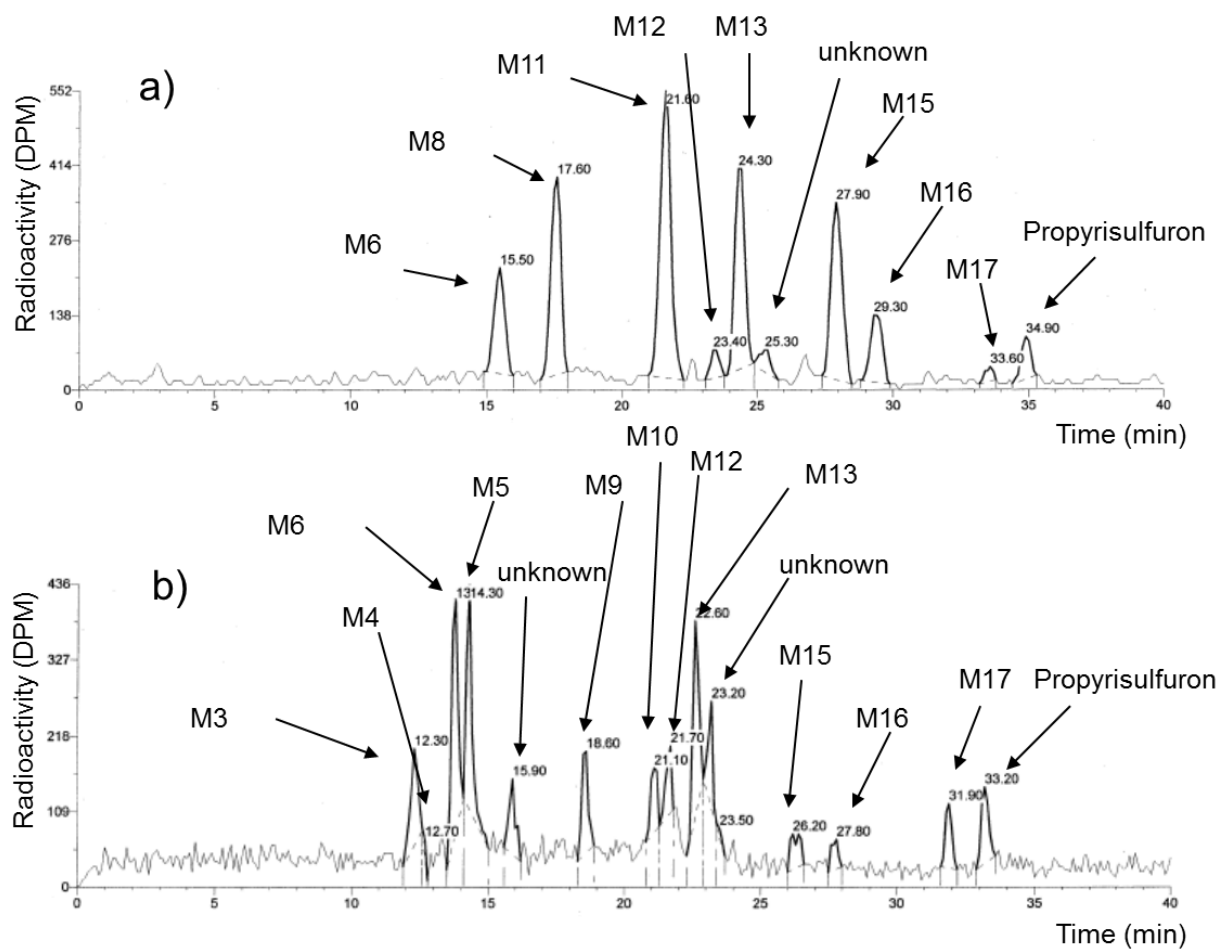


Figure 7. Typical HPLC chromatograms of pooled urine and fecal extracts. a) HPLC chromatograms of pooled urine 2 days after administration of [pr-¹⁴C] propyrisulfuron at a dose of 5 mg/kg in male rats. b) HPLC chromatograms of pooled fecal extracts 2 days after administration of [pr-¹⁴C] propyrisulfuron at a dose of 5 mg/kg in female rats.

Table 2. HPLC retention times of metabolites and mass differences between metabolites and propyrisulfuron.

¹⁴ C-Peaks	Metabolites	Retention time (min)	Mass differences between metabolites and propyrisulfuron
M1	ADPM–OH–Sul	5.4	–204
M2	ADPM	8.5	–300
M3	CHOA	12.3	+4
M4	CHAA	12.7	-24
M5	MPHO	14.3	+18
M6	ACPS	15.5	–96
M7	CHAD	15.9	–40
M8	PISN–OH	17.6	–165
M9	CMOA	18.6	+18
M10	PDMU	21.1	+2
M11	PHDU–GlucA	21.6	+192
M12	PISN	23.4	-181
M13	PIHU	24.3	–14
M14	MPDU–GlucA	25.4	+192
M15	PHDU	27.9	+16
M16	HPDU	29.3	+16
M17	MPDU	33.6	+16
Parent	Propyrisulfuron	34.9	0

(1) プロピリスルフロンの

尿および糞抽出液とプロピリスルフロンの非標識体を HPLC コクロマトグラフィーにより分析し、これらのサンプル中にプロピリスルフロンの溶出時間が一致する化合物を確認した (Table 2)。さらに、尿および糞抽出液の LC-MS 分析において、擬分子イオン $[M+H]^+$ が m/z 456、それを前駆イオンとした MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 196/261 と観測され、プロピリスルフロンの非標識体の MS/MS スペクトルのフラグメントパターンと同一であることが示唆された (Figure 8)。

(2) ACPS [M6]、PIHU [M13]、PHDU [M15]、PISN [M12]、PDMU [M10]、ADPM [M2]

尿および糞抽出液と代謝物標品 (ACPS、PIHU、PHDU、PISN、PDMU および ADPM) を HPLC コクロマトグラフィーにより分析し、これらのサンプル中に代謝物標品と溶出時間が一致する代謝物を確認した (Table 2)。さらに、尿および糞抽出液の LC-MS 分析において、MS/MS スペクトルにおけるフラグメントパターンが代謝物標品のそれと同一であることが示唆された (Table 3)。ただし、ADPM に関しては、イオン化効率が低かったため、サンプル中の MS/MS フラグメントパターンを得ることができなかった。

(3) PISN-OH [M8]

尿の LC-MS 分析において、M8 の擬分子イオン $[M+H]^+$ は m/z 291、それを前駆イオンとした MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 273 と観測された (Figure 8)。M8 は、 $[pm-^{14}C]$ プロピリスルフロンの投与したラットのサンプルにおいては検出されなかったため、PISN (分子量 274) のモノ水酸化体と推定した。そこで、M8 を TLC により単離精製し、 1H NMR を測定したところ、次の結果が得られた。 1H NMR (CD_3OD , δ in ppm) 8.08 (1H, d, $J=9.2$ Hz)、7.62 (1H, d, $J=9.6$ Hz)、1.82–1.94 (2H, m)、1.01 (3H, t, $J=7.4$ Hz)。 1H NMR において、イミダゾピリダジン環の C-4 および C-5 のプロトン、

プロピル基末端の 3 個のプロトン、プロピル基 C-2 の 2 個のプロトンが観測された。加えて、プロピル基 C-1 の 2 個のプロトンが水の位置 (4.8 ppm) に観測され、プロピリスルフロンの同プロトン (2.69 ppm) と比べ、低磁場シフトしていることが明らかになった。以上から、M8 を PISN-OH と同定した。

(4) PHDU-GlucA [M11]

M11 を尿から HPLC により単離し、 β -glucuronidase/aryl sulfatase により酵素加水分解を行った。反応液を HPLC にて分析したところ、M11 のピークが消失し、新たな代謝物ピーク (溶出時間 27.40 min) が検出され、代謝物標品の PHDU と同様の溶出時間であることが明らかになった。LC-MS 分析において、M11 の擬分子イオン $[M+H]^+$ は m/z 648、それを前駆イオンとした MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 472 (= 648-176 [グルクロン酸]) と観測された。以上から、M11 を PHDU のグルクロン酸抱合体、PHDU-GlucA と同定した。

(5) HPDU [M16]

尿の LC-MS 分析において、M16 の擬分子イオン $[M+H]^+$ は m/z 472、それを前駆イオンとした MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 212 (= 196+16) 、MS/MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 154 (= 212-Pr-OH [モノ水酸化プロピル基]+1) と観測された (Figure 8) 。M16 を HPLC により単離し、塩酸溶液により加水分解したところ、アミド結合が開裂し、ADPM および PISN-OH が生成した。以上から、M16 を HPDU と同定した。

(6) MPDU [M17]

尿の LC-MS 分析において、M17 の擬分子イオン $[M+H]^+$ は m/z 472、それを前駆イオン

とした MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 212 (= 196+16)、MS/MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 170 (= 212-Pr [プロピル基] +1) と観測された (Figure 8)。つまり、M17 はプロピリスルフロンのイミダゾピリダジン環が水酸化された代謝物と推定された。M17 を HPLC により単離し、塩酸溶液により加水分解したところ、ADPM および PISN よりわずかに高極性の代謝物が生成した。以上から、M17 を MPDU と推定した。

(7) CMOA [M9]

糞抽出液の LC-MS 分析において、M9 の擬分子イオン $[M+H]^+$ は m/z 474、それを前駆イオンとした MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 128/156/174/196/275/301 と観測された (Figure 8)。つまり、プロピリスルフロンの比、分子量が 18 多い代謝物と考えられた。ジメトキシアミノ-ピリミジン環というプロピリスルフロンの共通した構造を有する、SU 剤ハロスルフロンの植物における代謝において、未変化体より分子量が 18 大きく、カルボキシル基を有する代謝物について報告されている²⁵⁾。ハロスルフロンの代謝では、ピリミジン環 C-5 が水酸化され (プロピリスルフロンの PHDU)、また、ピリミジン環のメチル基が脱メチル化する (プロピリスルフロンの PIHU)。それから、プロピリスルフロンの PDMU のようなカテコール体の生成を経て、ピリミジン環が開裂し、ハロスルフロンのメチルより分子量が 18 大きい、カルボキシル基を有する開環体が生成する。

代謝物標品 PDMU の LC-MS 分析において、擬分子イオン $[M+H]^+$ は m/z 474 が観測され、これは PDMU の分解物と考えられた。また、この分解物の溶出時間は M9 と同様であったことから、M9 を CMOA と同定した。

(8) MPHO [M5]

糞抽出液の LC-MS 分析において、M5 の擬分子イオン $[M+H]^+$ は m/z 474、 $[M-H]^-$ は m/z 472 と観測され、CMOA と同様にプロピリルスルフロンの分子量が 18 大きい代謝物と考えられた。 $[M+H]^+$ を前駆イオンとした MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 194/301 と観測されたことから、CMOA と同様にイミダゾピリダジン環部分の構造が保持されていることが示唆された。また、 $[M-H]^-$ を前駆イオンとした MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 155/172/299/369/412 と観測された (Figure 8)。カテコール体から開裂代謝物が生成する機構として、CMOA で認められた N-3 と C-4 の間での開裂に加え、N-1 と C-6 の間での開裂が推定された²⁵⁾。

代謝物標品 PDMU の LC-MS 分析において、擬分子イオン $[M+H]^+$ は m/z 474 が観測され、これは PDMU の分解物と考えられた。また、この分解物の溶出時間は M5 と同様であったことから、M5 を MPHO と同定した。

(9) CHOA [M3]

M3 を糞抽出液から HPLC により単離し、代謝物標品との HPLC コクロマトグラフィーを行ったところ、M3 の分解物として PISN が検出された。つまり、M3 はイミダゾピリダジン環とスルホンアミド部分を保持していることが示唆された。なお、HPLC における M3 の分解は、移動相に含まれるトリフルオロ酢酸 (0.1%、v/v) の効果と考えられた。LC-MS 分析において、M3 の擬分子イオン $[M+H]^+$ は m/z 460、 $[M-H]^-$ は m/z 458、 $[M+H]^+$ を前駆イオンとした MS/MS スペクトルにおいてフラグメントピークが m/z 301/414 と観測された (Figure 8)。以上から、M3 を CHOA と推定した。

(10)CHAD [M7]

糞抽出液の LC-MS 分析において、M7 の擬分子イオン $[M+H]^+$ は m/z 416、それを前駆イオンとした MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 196/275/301 と観測された (Figure 8)。M7 は $[pm-^{14}C]$ プロピリスルフロンの投与時においても検出されたことから、ピリミジン環の C-5 (^{14}C 標識位置) が保持されていると考えられた。以上から、M7 を CHAD と推定した。

(11)CHAA [M4]

糞抽出液の LC-MS 分析において、M4 の擬分子イオン $[M+H]^+$ は m/z 432、 $[M-H]^-$ は m/z 430 と観測された。また、 $[M-H]^-$ を前駆イオンとした MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 358/273 と観測された (Figure 8)。M4 は $[pm-^{14}C]$ プロピリスルフロンの投与時においても検出されたことから、ピリミジン環の C-5 (^{14}C 標識位置) が保持されていると考えられた。また、M4 の分子量から、MPHO から ACPS へのピリミジン環開裂反応の中間体の可能性が示唆された。この中間体の一つとして同定された CHAD は、アルデヒド基を有していることから、M4 は CHAD のアルデヒド基がカルボキシル基へ酸化された代謝物と考えられた。以上から、M4 を CHAA と推定した。

(12)ADPM-OH-Sul [M1]

尿の LC-MS 分析において、M1 の擬分子イオン $[M-H]^-$ は m/z 250、それを前駆イオンとした MS/MS スペクトルにおいて、フラグメントピークが m/z 155/170 と観測された (Figure 8)。M1 は $[pm-^{14}C]$ プロピリスルフロンの投与時においてのみ検出されたことから、ピリミジン環に由来する代謝物と考えられた。プロピリスルフロンのようにジメトキシピリミジン環を有する SU 剤であるベンスルフロンのメチルにおいて、代謝物として ADPM が生成し、その後、ADPM の C-5 が水酸化することが報告されている²⁵⁾。以上から、M1 を ADPM-

OH-Sul と推定した。

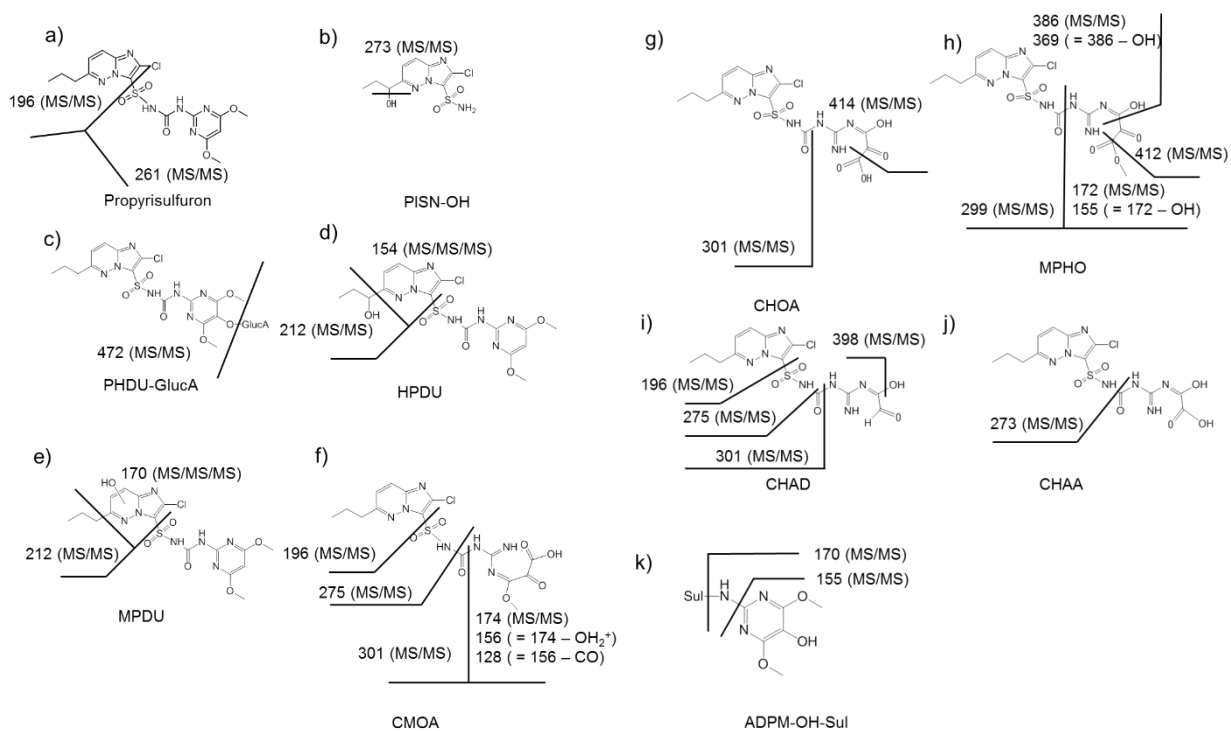


Figure 8. Proposed fragmentation of metabolites on LC-MS/MS or MS/MS/MS measurements.

Table 3. Fragment patterns of MS/MS spectrum of authentic metabolite standards (ACPS, PIHU, PHDU, PISN and PDMU).

Metabolites	$[M+H]^+$ (m/z)	MS^2 (m/z)
ACPS	360	196/275
PIHU	442	196/275
PHDU	472	196/277
PISN	275	216
PDMU	458	196/275

胆汁中における代謝物同定

胆管カニュレーション済みのラットに $[pr-^{14}C]$ プロピリスルフロンを 5 mg/kg にて単回経口投与後の胆汁を、HPLC により分析した。

(1) PHDU–GlucA [M11]

M11 を胆汁から HPLC により単離し、 β -glucuronidase/aryl sulfatase により酵素加水分解を行った。反応液を HPLC にて分析したところ、M11 のピークが消失し、新たな代謝物ピーク（溶出時間 28.40 min）が検出され、代謝物標品の PHDU と同様の溶出時間であった。胆汁の加水分解の際に、 β -glucuronidase の阻害剤 D-saccharic acid 1, 4-lactone 添加すると、M11 の分解は阻害された。以上から、M11 を PHDU のグルクロン酸抱合体、PHDU–GlucA と同定した。

(2) PIHU [M13]

胆汁と代謝物標品を HPLC コクロマトグラフィーにより分析し、M13 を PIHU と同定し

た。

(3) MPDU-GlucA [M14]

M14 を胆汁から HPLC により単離し、 β -glucuronidase/aryl sulfatase により酵素加水分解を行った。反応液を HPLC にて分析したところ、新たな代謝物ピーク (溶出時間 32.20 min) が検出された。胆汁の加水分解の際に、 β -glucuronidase の阻害剤 D-saccharic acid 1, 4-lactone 添加すると、M14 の分解は阻害された。糞抽出液から HPLC により MPDU を単離し、M14 の酵素加水分解物と HPLC コクロマトグラフィーを行ったところ、溶出時間が一致した。以上から、M14 を MPDU のグルクロン酸抱合体、MPDU-GlucA と同定した。

[pr-¹⁴C]プロピリスルフロンの尿および糞中の代謝物定量

[pr-¹⁴C]プロピリスルフロンの尿および糞中の代謝物を定量するため、HPLC 測定を行い、Table 4 にまとめた。尿においては、プロピリスルフロンの 9 種の代謝物が検出された。プロピリスルフロンは僅かに検出され、投与 ¹⁴C 量の 0.3–4.1% であった。主要代謝物である PHDU-GlucA、PHDU、PIHU および PISN-OH、2.1–3.7、1.0–8.9、0.6–7.6 および 1.0–2.5% 認められた。また、その他に ACPS、HPDU、PISN および MPDU が、0.4–1.4、0.4–1.4、0.2–0.3 および 0.1–0.4% 認められた。PIHU および PHDU は雄性ラットより雌性ラットにおいて多く検出されたが、その他の代謝物に関しては雌雄でほぼ同様であった。一方糞においては、プロピリスルフロンの 16 種の代謝物が検出された。プロピリスルフロンは、7.1–79.9% 認められた。なお、1000 mg/kg 投与時において、糞中に検出された ¹⁴C はほとんどプロピリスルフロンのみであった。主要代謝物である ACPS、MPHO、PIHU、PISN および PHDU は、0.2–9.2、N.D.–9.5、N.D.–7.8、N.D.–6.4 および 1.0–6.2% 認められた。また、その他に MPDU、CMOA、CHOA、CHAD、HPDU、PDMU および CHAA が、1.9–2.8、N.D.–4.8、N.D.–4.2、N.D.–2.5、N.D.–2.4、N.D.–2.7 および N.D.–0.6% 認められた。

[$\text{pm-}^{14}\text{C}$]プロピリスルフロンの尿および糞中の代謝物定量

[$\text{pm-}^{14}\text{C}$]プロピリスルフロンの尿および糞中代謝物の定量結果を、Table 4 にまとめた。尿においては、プロピリスルフロンの 7 種の代謝物が検出された。プロピリスルフロンは僅かに検出され、0.1–2.3%認められた。主要代謝物である PHDU–GlucA、PHDU、PIHU および PISN–OH は、5.7–6.5、2.9–7.6、3.2–6.4 および 1.0–2.5%認められた。また、その他に ADPM–OH–Sul、MPDU および HPDU が、0.9–1.4、0.1 および 1.0–1.2%認められた。PIHU および PHDU は雄性ラットより雌性ラットにおいて多く検出されたが、その他の代謝物に関しては雌雄でほぼ同様であった。一方糞においては、プロピリスルフロンの 17 種の代謝物が検出された。プロピリスルフロンは、6.4–9.7%検出された。主要代謝物である MPHO、PIHU および PHDU は、9.6–12.7、N.D.–9.5 および 4.2–5.6%検出された。また、その他に CMOA、CHOA、CHAD、HPDU、MPDU、PDMU および CHAA が、4.6–4.8、4.6–4.8、2.6–3.0、2.4–3.7、3.4–4.2、3.5–4.0 および N.D.–0.1%検出された。

Table 4. Amount (% of dose) of metabolites in urine and feces within 4 or 5 days after a single oral administration of [pr-¹⁴C]propyrisulfuron at 5 or 1000 mg/kg in male and female rats. N.D. and - represent not detected and not analyzed, respectively.

Metabolite	% of dose					
	[pr- ¹⁴ C]propyrisulfuron				[pm- ¹⁴ C]propyrisulfuron	
	5 mg/kg		1000 mg/kg		5 mg/kg	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Urine						
ACPS	1.3	1.5	0.4	0.6	N.D.	N.D.
PISN-OH	2.6	2.2	1.0	1.7	N.D.	N.D.
PHDU-GlucA	3.8	2.1	2.1	2.6	6.5	5.7
PISN	0.2	0.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PIHU	2.6	7.6	0.6	1.8	3.2	6.4
PHDU	3.7	8.9	1.0	3.0	2.9	7.6
HPDU	1.1	1.4	0.4	0.7	1.0	1.2
MPDU	0.1	0.4	N.D.	0.1	0.1	0.1
Propyrisulfuron	0.5	4.1	N.D.	0.3	0.1	2.3
ADPM-OH-Sul	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.4	0.9
unidentified metabolites	0.2	0.3	N.D.	N.D.	2.6	3.5
Total	16.2	28.7	5.5	10.8	17.8	27.8
Feces						
ACPS	9.2	7.8	0.2	0.3	N.D.	N.D.
PISN	6.4	4.9	0.3	N.D.	N.D.	N.D.
PIHU	7.0	7.8	N.D.	N.D.	5.8	6.8
PHDU	6.2	2.5	9.0	1.9	5.6	4.2
HPDU	2.4	1.1	N.D.	N.D.	3.7	2.4
MPDU	2.2	2.1	2.8	1.9	4.2	3.4
Propyrisulfuron	10.1	7.1	79.9	79.2	9.7	6.4
CHOA	4.2	2.9	N.D.	N.D.	4.8	4.6
CHAA	<0.1	0.6	N.D.	N.D.	0.1	N.D.
MPHO	9.5	7.0	0.4	N.D.	12.7	9.6
CHAD	2.5	2.4	N.D.	N.D.	3.0	2.6
CMOA	4.8	4.1	N.D.	N.D.	4.8	4.6
PDMU	1.9	2.7	N.D.	N.D.	3.5	4.0
ADPM	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.3	0.4
unidentified metabolites	4.8	4.4	N.D.	N.D.	9.8	10.2
Subtotal	71.3	57.3	92.7	85.3	69.0	59.3
Unextractable (alkali-extractable)	2.7	-	-	-	4.6	3.1
Unextractable (Residue)	3.3	-	-	-	4.8	4.9
Subtotal (unextractable)	6.0	4.3	2.6	1.8	9.3	8.0
Total	77.3	61.7	95.3	87.1	78.3	67.3

胆汁排泄実験における尿、糞および胆汁中の代謝物定量

胆汁排泄実験における尿、糞および胆汁中代謝物の定量結果を、Table 5 にまとめた。雌雄ラットの胆汁中に 3 つの共通する代謝物が検出された。胆汁中 ^{14}C の大部分が PHDU-GlucA であり、27.9–31.4%認められた。さらに、MPDU-GlucA および PIHU が、2.2–3.7 および 2.5–3.4%認められた。尿においては、プロピリスルフロンの 7 種の代謝物が検出された。プロピリスルフロンは僅かに検出され、N.D.–2.3%認められた。主要代謝物である PHDU-GlucA および PIHU は、1.3–7.0 および 3.6–5.8 %認められた。また、その他に PISN-OH、ACPS、PISN および HPDU が、1.2–1.5、0.5–1.2、0.5–1.5 および N.D.–0.4 %認められた。糞においては、プロピリスルフロンのみ 9.2–11.4%認められた。これらの結果から、体内に吸収されたプロピリスルフロンの多くは、PHDU-GlucA に代謝されて胆汁中に排泄されることが示された。また、未吸収のプロピリスルフロンは代謝を受けず糞中に排泄されることから、 ^{14}C 排泄実験において糞中に認められた代謝物は、胆汁排泄により十二指腸内へ移行した代謝物に由来すると考えられた。

Table 5. Amount (% of dose) of metabolites in urine, feces and bile within 3 days after a single oral administration of [pr-¹⁴C]propyrisulfuron at 5 mg/kg to bile duct-cannulated male rats. N.D. and - represent not detected and not analyzed, respectively.

Metabolite	% of dose					
	[pr- ¹⁴ C]propyrisulfuron					
	5 mg/kg					
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
	Urine		Bile		Feces	
ACPS	1.2	0.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PISN-OH	1.5	1.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PHDU-GlucA	7.0	1.3	31.4	27.9	N.D.	N.D.
PISN	0.5	1.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PIHU	3.6	5.8	2.5	3.4	N.D.	N.D.
PHDU	4.3	9.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
HPDU	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MPDU	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Propyrisulfuron	N.D.	2.3	N.D.	N.D.	11.4	9.2
MPDU-GlucA	N.D.	N.D.	3.7	2.2	N.D.	N.D.
unidentified metabolites	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Subtotal (unextractable)	-	-	-	-	0.2	0.2
Total	18.5	21.9	37.6	33.5	11.6	9.3

血漿、肝臓および腎臓中の代謝物定量

雌雄ラットに [pr-¹⁴C]プロピリスルフロンを 5 mg/kg にて投与後 12、48 および 96 時間の血漿中 ¹⁴C のほとんどがプロピリスルフロンのであった (>99.9%)。肝臓中 ¹⁴C に関しても、大部分がプロピリスルフロンのであったが (>88.8%)、投与後 12 時間の肝臓中代謝物としては、PISN および PIHU が 4.1 および 4.8%認められた。投与後 12 および 48 時間の腎臓中 ¹⁴C の大部分がプロピリスルフロンのであったが (>88.0%)、投与後 96 時間においては非抽出性

^{14}C が 23.3–27.5%認められた。

雌雄ラットに $[\text{pr-}^{14}\text{C}]$ プロピリスルフロンを 1000 mg/kg にて投与後 4、24 および 72 時間の血漿、肝臓および腎臓中 ^{14}C の大部分がプロピリスルフロンであり、82.4–100、86.2–100 および 89.6–100.0%認められ、5 mg/kg 投与時と同様であった。代謝物としては PISN がわずかに検出され、血漿、肝臓および腎臓中 ^{14}C において、N.D.–17.7、N.D.–11.7 および N.D.–6.0%であった。

胆汁排泄実験における尿、糞および胆汁中の代謝物定量

3 および 30 ppm において、雄性ラット血漿タンパクに対する結合率はそれぞれ 99.1 および 98.8%であった。また、雌性ラット血漿タンパクに対しても、高いタンパク結合率 (99.3% および 99.1%) であったことから、プロピリスルフロンの大部分が血漿タンパクに結合していることが示された。

考察

新規 SU 剤プロピリスルフロンの安全性評価に重要である、ラットにおける詳細な代謝および体内動態について検討した。他の SU 剤と比較して、プロピリスルフロンは特徴的な体内動態を示した。一般的に、アミドスルフロン等の SU 剤は未変化体のまま尿中に排泄されることが多い²⁴⁾。一方、プロピリスルフロンの ^{14}C 主要排泄経路は、尿ではなく胆汁であった。プロピリスルフロンの水溶解度が他の SU 剤と比べ低く (0.98 mg/L)、この違いが特異的な体内動態の原因と推定した²³⁾。

雌雄ラットにプロピリスルフロンを投与後の血漿中 ^{14}C 濃度は、消化管やその内容物を除き、組織中 ^{14}C 濃度よりも高かった。化合物の組織への分配係数は、タンパク結合と $\log P$ により決定される²⁶⁾。プロピリスルフロンの血漿タンパク結合率は、雌雄ラットにおいてともに非常に高く、また、 $\log P$ は 2.9 であったことから、プロピリスルフロンの組織への分配係数は比較的低いと考えられた²³⁾。

血中のプロピリスルフロンの大部分が血漿中タンパクに結合して存在しており、血漿、腎臓および肝臓中の ^{14}C は、ほとんどプロピリスルフロンであった。また、プロピリスルフロンが排泄物中において検出された量はわずかであり、ほとんどが代謝物であったことから、体外への排泄には代謝を受けることが必要であり、代謝物は速やかに体外へ排泄されることが考えられた (Table 4)。

一般的に、血漿タンパク非結合型の化合物が代謝を受ける²⁷⁾。結合サイトが飽和するまで、結合型と非結合型の比率は濃度によらず一定であり、非結合型が代謝を受けると、結合型の一部が非結合型になる。プロピリスルフロンの場合、体内において大部分は結合型で血漿中に分布し、一部の非結合型が代謝を受けた後、速やかに体外へと排泄され、続いて一部の結合型が非結合型となり同様に代謝を受けると考えられた。このような反応が繰り返されることにより、プロピリスルフロンは体内から消失すると推定した。

前述のように、プロピリスルフロンの主要排泄経路は尿ではなく胆汁であった。一般的に、腸管循環が生じると、血中濃度が維持されることにより、化合物の毒性が強まる可能性ある²⁸⁾。プロピリスルフロンの場合、投与した ^{14}C の 33.5–37.6%が胆汁中へ排泄されることから、代謝物が腸管循環する可能性について考察した。まず、血漿中の ^{14}C 濃度は投与後 4–12 時間で C_{\max} に到達し、その後急速に減少した。また、 ^{14}C 胆汁排泄実験における尿中排泄率 (18.5–21.9%) は、 ^{14}C 排泄実験における尿中排泄率 (16.7–29.8%) とほぼ同様であった。さらに、 ^{14}C 胆汁排泄実験における尿中代謝物は、 ^{14}C 排泄実験における代謝物とほぼ同様であった。これらの結果より、胆汁中の抱合体は小腸で加水分解を受け、再吸収されずに直接糞中へ排泄されるため、代謝物が腸管循環する可能性は低いと考えられた。

5 mg/kg と 1000 mg/kg 投与時の ^{14}C 排泄パターンに、違いが認められた。雄性ラットにおいて 5 mg/kg 投与時の投与後 1 日における尿および糞中への排泄率は、9.5–11.8 および 25.6–36.3%であった。一方、1000 mg/kg 投与時の投与後 1 日における尿および糞中への排泄率は、4.9 および 83.4%であった。また、1000 mg/kg 投与時の糞中代謝物はほとんどプロピリスルフロンであり、5 mg/kg と 1000 mg/kg における血漿中の AUC 比は、約 20 と算出された。これらの結果より、プロピリスルフロンの低い水溶解度のため、1000 mg/kg 投与時において吸収が飽和している可能性が考えられた²⁹⁾。

プロピリスルフロンのラットにおける推定代謝経路は、1. ピリミジン環の 5 位、プロピル基の 1 位、およびイミダゾピリダジン環における水酸化による PHDU、HPDU および MPDU の生成、それに続くグルクロン酸抱合化による PHDU–GluA、HPDU–GlucA および MPDU–GlucA の生成、2. ピリミジン環メトキシ基のモノ脱メチル化による PIHU の生成、3. PHDU のモノ脱メチル化および PIHU の水酸化による PDMU の生成、4. PDMU ピリミジン環の酸化的開環による MPHO と CMOA の生成、5. MPHO のメチルエステル部分の加水分解、脱炭酸および酸化を経由した ACPS の生成、6. スルホニル尿素結合の開裂に伴う PISN および ADPM の生成、それに続くモノ水酸化による PISN–OH および ADPM–OH の生成、

更に ADPM-OH の硫酸抱合化 (ADPM-OH-Sul) であった (Figure 9)。プロピリスルフロンの水溶解度は他の SU 剤と比べ低いですが、代謝パターンに違いは認められなかった。

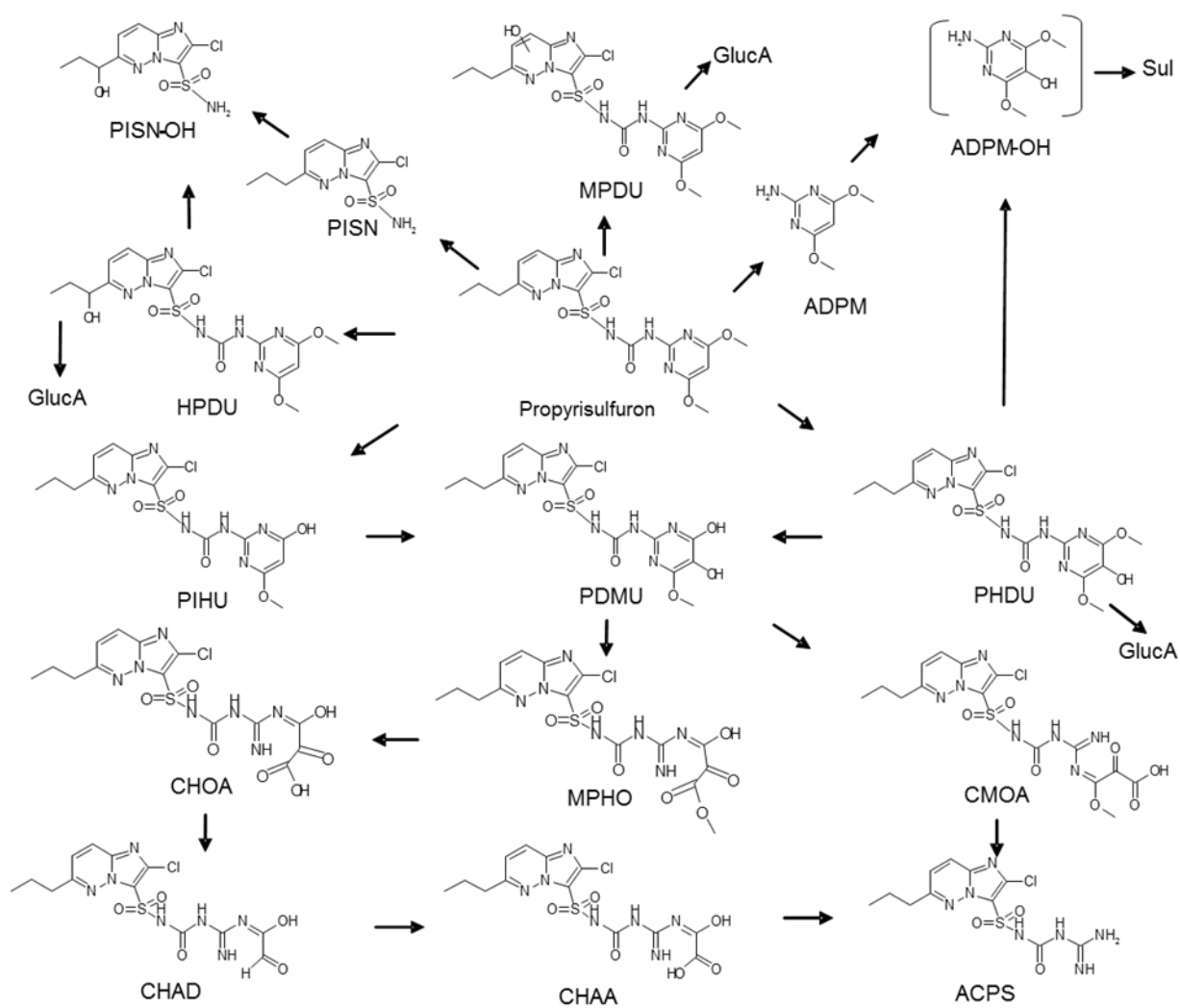


Figure 9. Proposed metabolic pathway of propyrisulfuron in rats.

小括

新規 SU 剤プロピリスルフロンのラットにおける *in vivo* 代謝研究を行い、他の SU 剤と異なる排泄パターンであることが示された。これは、プロピリスルフロンの水溶解度が他の SU 剤と比べ低いためと考えられた。また、プロピリスルフロンの血漿タンパク結合率が高いため、組織中 ^{14}C 濃度は血漿より低く、体内への蓄積性は認められなかった。

プロピリスルフロンのラットにおける代謝物を主要代謝物から微量代謝物に至るまで複数同定し、他の SU 剤と同様の代謝を受けることを明らかにした。尿、糞および胆汁中に検出された ^{14}C の多くは代謝物であったが、血漿中の ^{14}C はほとんどプロピリスルフロンであったことから、水溶性の高い代謝物として体内から消失することが示唆された。以上のようなプロピリスルフロンの代謝に関する特性が、哺乳動物における高い安全性に貢献していると考えられた。

ヒトと動物の代謝には種差がある場合があり、動物の微量代謝物がヒトの主要代謝物である可能性も考えられるため、ラットの代謝研究においては主要代謝物から微量代謝物に至るまで可能な限り多数の代謝物の構造を決定しておくことが望ましい。第 1 章では、プロピリスルフロンのラットにおける代謝研究を題材として、機器分析を駆使することにより多数の代謝物の構造を決定しており、この手法は他の農薬においても応用できると考えられる。

第2章 ペルメトリンのヒトおよびラットにおける *in vitro* 代謝研究

ペルメトリンは作物保護や疾患拡大予防のため、古くから使用されているピレスロイド系殺虫剤である (Figure 10)³⁰⁾。ピレスロイド系殺虫剤の哺乳動物における詳細な代謝や毒性については、研究が進んでいる³¹⁻³³⁾。

近年、ピレスロイドのヒトに対する暴露を評価するため、バイオモニタリング研究が行われている。この研究では、ピレスロイドそのものは高い脂溶性のため尿中に排泄されないため、尿中代謝物がマーカーとして使用されている。ペルメトリンにおいては、代謝物の PBacid がマーカーとして使用されている³⁴⁻³⁵⁾。PBacid は多くのピレスロイドに共通する代謝物の一つで、ピレスロイドが加水分解し、その後、酸化された代謝物である。そして、PBacid やその抱合体は尿中に排泄される。したがって、ヒトにおける PBacid の代謝についての研究は、バイオモニタリングを実施する上で重要である。

ヒトにおける *in vitro* 代謝研究において、ペルメトリンはカルボキシルエステラーゼ 1 (hCE-1) やカルボキシルエステラーゼ 2 (hCE-2) により加水分解され PBalc となり、その後、アルコールデヒドロゲナーゼやアルデヒドデヒドロゲナーゼにより、PBacid に酸化されることが報告されている³⁶⁻³⁸⁾。PBacid は動物においてフリー体、グルクロン酸抱合体およびグリシン抱合体として尿中に排泄される³¹⁾。また、PBalc は 4'-OH-PBalc に水酸化される。さらに、ヒトにおけるペルメトリンの酸化に関与する CYP 分子種は、CYP1A1、CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9 および CYP2C19 と同定されている³⁹⁾。しかし、PBalc の 4'-水酸化や PBacid のグルクロン酸抱合に関与する CYP や UGT 分子種、また、ペルメトリンのヒトとラットにおける比較代謝に関しての報告はない。

第2章では、ペルメトリンのヒトとラットにおける代謝プロファイル (経路および速度) を比較するため、ラットおよびヒトの肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝を行った。また、PBalc の 4'-水酸化に関与するヒト CYP 分子種を同定した。さらに、ヒトにおける PBacid

のグルクロン酸抱合について調べ、抱合に関わる UGT 分子種を同定した。

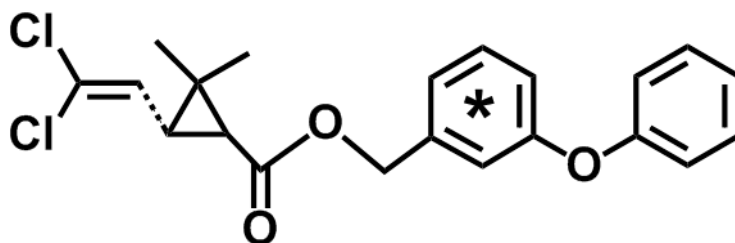


Figure 10. Chemical structure of *trans*-[phenoxyphenyl-¹⁴C]permethrin.

実験方法

化合物

trans-[phenoxyphenyl-¹⁴C]ペルメトリンおよび[phenoxyphenyl-¹⁴C]PBalc の比放射能は、4.44 GBq/mmol であった。標識体を実験に使用する前には、TLC（展開溶媒：ヘキサン/ジエチルエーテル、5:1 (v/v)）および HPLC（移動相：アセトニトリル：0.1% トリフルオロ酢酸水、20:80 (v/v)）により精製した。標識体の放射化学的純度は TLC により分析し、放射化学的純度は 100% であった。合成代謝物標品（PBalc、PBacid、4'-OH-PBalc および 4'-OH-PBacid）は、代謝物の同定に用いた。他の試薬は特に記述がない限り、特級以上を用いた。

HPLC

HPLC 装置（ポンプ：L-6200、UV 検出器：L-4000、日立）は RI 検出器（Radiomatic 610TR RI detector、PerkinElmer）と接続して使用した。分析用カラムは、Atlantis dC18 column（4.6 mm I.D.×150 mm、Waters）を用いた。移動相はアセトニトリルおよび 0.1% 酢酸水を用い、流速は 1 mL/min とし、グラジエント条件を Table 6 に示した。また、ペルメトリンや代謝物の溶出時間を Table 7 にまとめた。

Table 6. Gradient program used in HPLC analyses.

Time (min)	0	5	5.1	20	35	40
Acetonitrile (%)	5	5	35	35	100	100

Table 7. HPLC retention times of permethrin and authentic standards

Metabolite	Retention time (min)
4'-OH-PBalc	14.9
4'-OH-PBacid	17.4
PBalc	26.9
PBacid	28.3
<i>trans</i> -permethrin	37.3

TLC

分析にはシリカゲル 60F₂₅₄TLC プレート (20×20 cm、0.25mm 厚、Merck) を用いた。代謝サンプルの展開条件は、酢酸エチル/アセトン/ギ酸/水、4:1:1:1 (v/v/v/v) とした。TLC プレート上の放射性化合物を imaging plate (富士フイルム) に室温で密着させ、fluorescent image analyzer (FLA-5000、富士フイルム) を用いたオートラジオグラフィーにより検出した。

酵素類の調製および準備

雌雄 Crj:CD (SD) ラット (チャールスリバー) の肝臓を採取し、重量を測定後、3 倍量の 0.05 M トリス緩衝液 (pH 7.4) を加え、ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした。肝臓ホモジネートをトリス緩衝液で 50 mL に希釈し、10000×g で 20 分間遠心し、上清を回収した。その後、上清を 105000×g で 45 分間遠心し、沈殿をミクロソーム画分として回収した。プールされたヒトの肝ミクロソームは、KAC より購入した。ヒトの組み換え CYP および UGT は、BD Biosciences より購入した。

ヒト、雄性ラットおよび雌性ラットの肝ミクロソームを用いたペルメトリンおよび PBalc の *in vitro* 代謝

trans-[phenoxyphenyl- ^{14}C]ペルメトリン (2.7–98 μM) もしくは [phenoxyphenyl- ^{14}C]PBalc (2.7–98 μM) を 3 mM NADPH の存在下および非存在下において、ヒト、雄性ラットおよび雌性ラットの肝ミクロソーム (終濃度 1 mg/mL) と 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 37°C、60 分間インキュベートした。インキュベート後、アセトニトリルを添加することにより反応を停止し、10 分間氷上で静置後、10000 $\times g$ で 5 分間遠心することにより上清を回収し、HPLC 分析に供した。

ヒトの組み換え CYP を用いた PBalc の *in vitro* 代謝

[phenoxyphenyl- ^{14}C]PBalc (9.0 μM) を 3 mM NADPH の存在下において、ヒトの組み換え CYP (1A2、2A6、2B6、2C19、2C8、2C9、2D6、2E1 および 3A4) と 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 37°C、60 分間インキュベートした。コントロールとして、CYP を除いて同様の実験を行った。インキュベート後、アセトニトリルを添加することにより反応を停止し、10 分間氷上で静置後、10000 $\times g$ で 5 分間遠心することにより上清を回収し、HPLC 分析に供した。

PBacid に対するグルクロン酸抱合活性

[Glucuronyl- ^{14}C]UDP-glucuronic acid (3 μM) を 100 μM PBacid の存在下および非存在下で、ヒトおよび雌性ラット肝ミクロソーム (終濃度 1 mg/mL) と 100 mM トリス緩衝液 (pH 7.4) 中で 37°C、30 分間インキュベートした。インキュベート後、アセトニトリルを添加することにより反応を停止し、10 分間氷上で静置後、10000 $\times g$ で 5 分間遠心することにより上清を回収し、TLC 分析に供した。

ヒトの組み換え UGT を用いた PBalc の *in vitro* 代謝

[Glucuronyl-¹⁴C]UDP-glucuronic acid (3 μ M) を 100 μ M PBacid の存在下および非存在下で、ヒトの組み換え UGT (1A1、1A3、1A4、1A6、1A7、1A8、1A9、1A10、2B4、2B7、2B15 および 2B17) と 100 mM トリス緩衝液 (pH 7.4) 中で 37°C、30 分間インキュベートした。インキュベート後、アセトニトリルを添加することにより反応を停止し、10 分間氷上で静置後、10000 $\times g$ で 5 分間遠心することにより上清を回収し、TLC 分析に供した。

結果および考察

ペルメトリンの比較代謝

trans-[phenoxyphenyl-¹⁴C]ペルメトリン (2.7、4.5、17、46 および 98 μM) を、ヒト、雄性ラットおよび雌性ラットの肝ミクロソームとインキュベートした。いずれのインキュベーションにおいても、PBalc、PBacid および 4'-OH-PBalc が検出され、*trans*-ペルメトリンの加水分解により生じる PBalc が主要代謝物であった (Figure 11)。4'-OH-PBacid はヒトの肝ミクロソームにおいて検出されなかったが、ヒトとラットの肝ミクロソームで生成した代謝物はほぼ同一であった。また、各代謝物の生成速度に関しても、ヒトとラットで同様であった (Figure 11)。 *trans*-ペルメトリンはヒトおよびラットの肝ミクロソームとの *in vitro* 代謝において、水酸化よりも優位に加水分解されたことから、速やかな加水分解がヒトおよびラットにおける *trans*-ペルメトリンの主要代謝経路と考えられた。

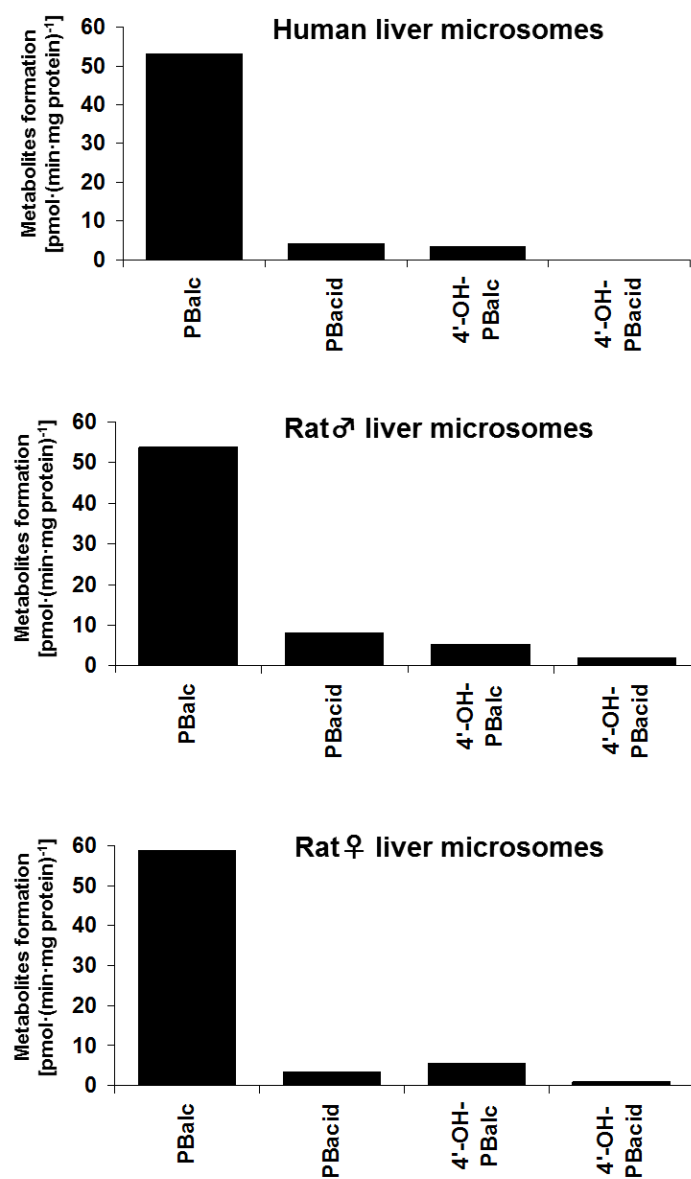


Figure 11. Rates of metabolite formation of *trans*-permethrin with human, male rat, and female rat microsomes. The PBalc, PBacid, 4'-OH-PBalc, and 4'-OH-PBacid formed were determined using HPLC.

PBalc の酸化に関与するヒト CYP 分子種の同定

trans-[phenoxyphenyl-¹⁴C]ペルメトリンのヒトおよびラットの肝ミクロソームとの *in vitro* 代謝において、PBalc が主要代謝物として検出され、PBalc はその後、PBacid、4'-OH-PBalc および 4'-OH-PBacid へ代謝されることが考えられた。つまり、*in vivo* において 4'-OH-PBalc は *trans*-ペルメトリンの水酸化、加水分解の経路ではなく、*trans*-ペルメトリンの加水分解による PBalc の生成、PBalc の水酸化により生成する可能性が示唆された³¹⁾。したがって、PBalc の 4'位の水酸化に関与するヒト CYP 分子種を同定することは、ペルメトリンのヒトにおける代謝を理解する上で重要と考えられた。

[phenoxyphenyl-¹⁴C]PBalc をヒトの組み換え CYP とインキュベートした。CYP2E1、CYP2C19 および CYP2D6 が代謝に関与しており、CYP2E1 が主要 CYP 分子種であると推定した (Figure 12)。興味深いことに、PBalc の 4'位の水酸化に関与するヒト CYP 分子種 (CYP2E1、CYP2C19 および CYP2D6) と、*trans*-ペルメトリンの代謝に関与するヒト CYP 分子種 (CYP1A1、CYP1A2、CYP2C8、CYP2C9 および CYP2C19) はわずかに異なっていた³⁹⁾。

[phenoxyphenyl-¹⁴C]PBalc とヒトの組み換え CYP の代謝反応に関して、速度論的解析を行った。Table 8 に CYP2E1、CYP2C19 および CYP2D6 の速度論的パラメータを示す。 K_m は CYP2C19 > CYP2D6 > CYP2E1 であり、 V_{max} は CYP2C19 > CYP2E1 > CYP2D6 の順であった。また、CYP2E1 が最も高い固有クリアランスを示した (V_{max}/K_m 値)。速度論的解析結果と肝臓中の CYP2E1 の発現量を合わせて考えると、CYP2E1 が PBalc の 4'位の水酸化における最も主要な CYP 分子種と考えられた⁴⁰⁾。

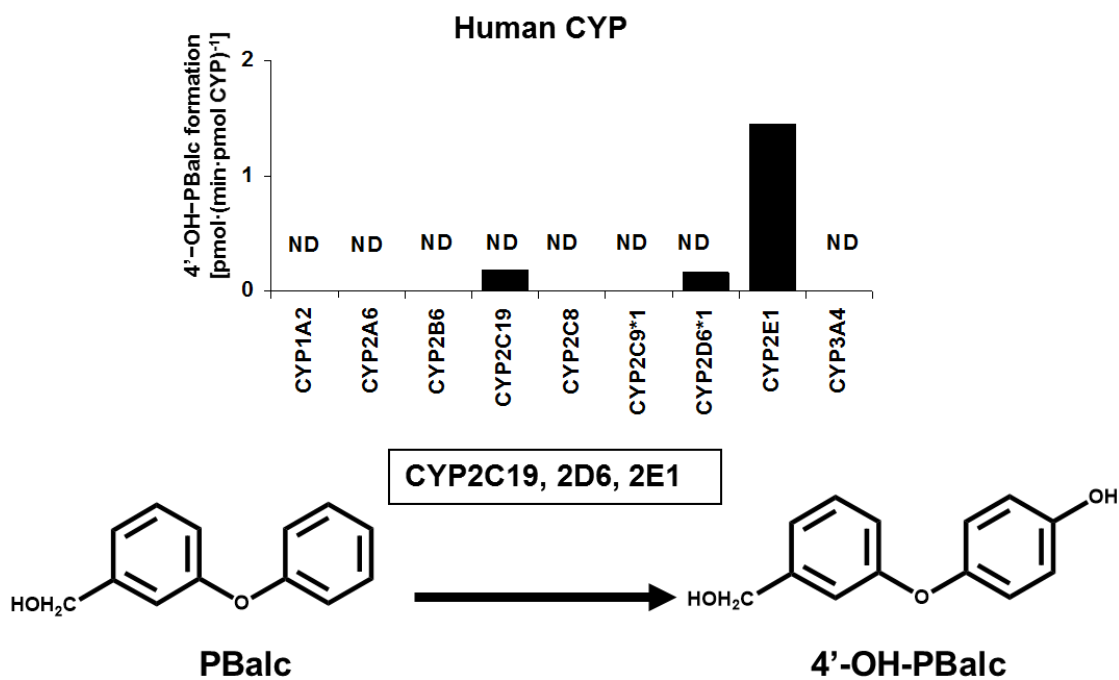


Figure 12. Rates of [phenoxyphenyl-¹⁴C]4'-OH-PBalc formation with baculovirus-insect cell-expressed human CYPs from [phenoxyphenyl-¹⁴C]PBalc. The formed 4'-OH-PBalc was determined using HPLC.

Table 8. Kinetic parameters for 4'-OH-PBalc formation by recombinant CYP enzymes.

	CYP2E1	CYP2D6	CYP2C19
K_m [μM]	24	29	272
V_{max} [pmol·(min·pmol CYP) ⁻¹]	3.6	1.3	11.2
V_{max}/K_m [μl·(min·pmol CYP) ⁻¹]	0.150	0.046	0.041

PBacid に対するグルクロン酸抱合活性

ラットにおける *in vivo* 代謝において、PBacid のグルクロン酸抱合体が尿中の主要代謝物の一つであると報告されている³¹⁾。加えて、ヒトにおけるピレスロイドの暴露を調べるため、尿中の PBacid やグルクロン酸抱合体の濃度が調べられている³⁴⁻³⁵⁾。しかし、ヒトとラットにおける PBacid のグルクロン酸抱合活性の種差についての報告はない。そこで、ヒトおよびラットの肝ミクロソームを用いて PBacid のグルクロン酸抱合活性を調べたところ、種差は認められなかった (Figure 13)。また、PBacid のグルクロン酸抱合に関与するヒト UGT 分子種に関して同定を試みたところ、UGT1A9 により抱合されることが明らかとなった (Figure 14)。UGT1A9 には UGT1A9^{33Thr}、UGT1A9^{167Ala} および UGT1A9^{183Gly} という 3 種の変異型が知られているが、これらを保有しているヒトは非常に少ないと報告されている⁴¹⁾。また、プロポフォール代謝における UGT1A9^{256Asn} および UGT1A9^{483Asp} といった、変異型が及ぼす影響についても研究されている⁴²⁾。プロポフォールは麻酔薬として用いられ、UGT1A9 によるグルクロン酸抱合により体内から排泄される。UGT1A9^{256Asn} のプロポフォールに対するグルクロン酸抱合活性は、野生型と比べ比較的低かったことから、UGT1A9^{256Asn} を保有する患者にプロポフォールを使用する際には注意する必要がある⁴²⁾。これらの研究は、UGT1A9 の遺伝的多型により代謝の遅いヒトが存在する可能性を示唆している。しかし、仮に UGT1A9 の遺伝的多型により PBacid のグルクロン酸抱合速度が遅くなったとしても、PBacid はフリー体として、また 4'-OH-PBacid やグリシン抱合体等として体外へ排泄されるため、影響は小さいと考えられる。

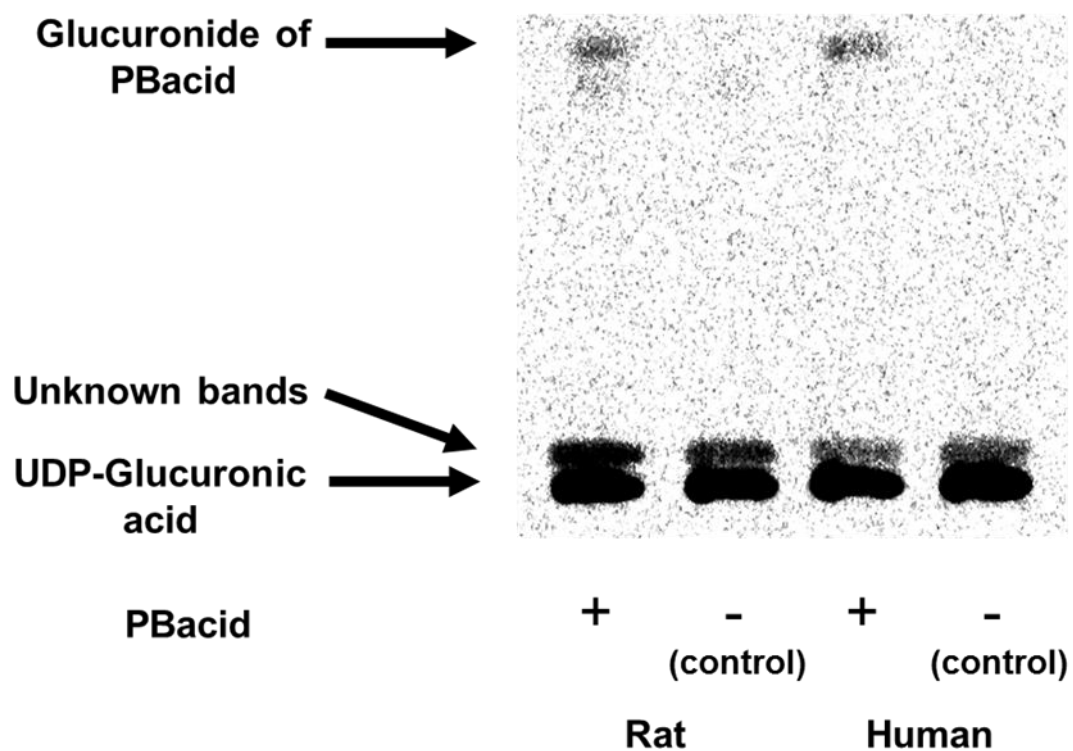


Figure 13. TLC autoradiogram of *in vitro* glucuronidation of PBacid in human, male rat, and female rat liver microsomal incubations.

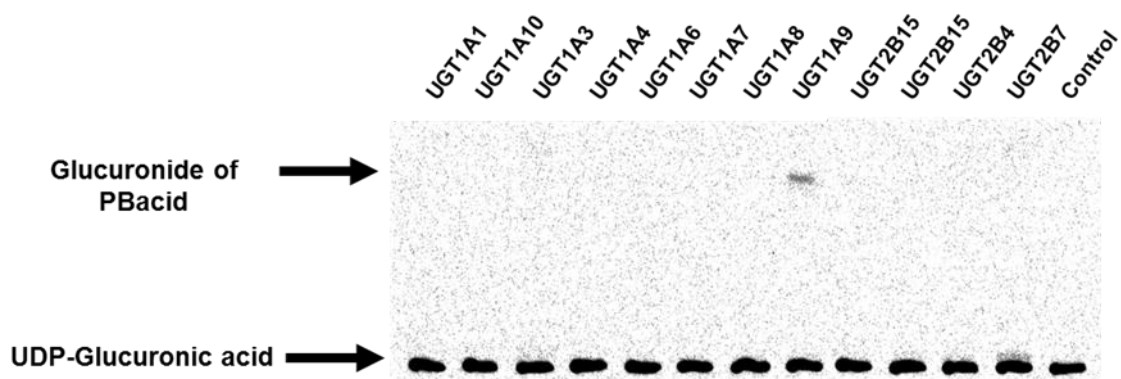


Figure 14. TLC autoradiogram of *in vitro* glucuronidation of PBacid in human UGTs incubations.

バイオモニタリング

PBacid はピレスロイドの多くに共通の代謝物のため、バイオモニタリングにおけるマーカーとして使用されており、多くの検出方法が開発されている^{34,43)}。具体的には、GM-MS によるヒトの尿中 PBacid の分析法や、免疫学的測定による PBacid のグリシン抱合体の分析法等が報告されている。ラットにおける *in vivo* 代謝研究において、ラットの尿中に PBacid フリー体、PBacid のグルクロン酸抱合体、PBacid のグリシン抱合体および 4'-OH-PBacid の硫酸抱合体が、10、14.9、4.4 および 42.8% 検出されている³¹⁾。PBacid のグルクロン酸抱合は UGT1A9 により触媒されることを示したが、UGT1A9 には遺伝的多型が知られている⁴¹⁻⁴²⁾。遺伝的多型により PBacid が効果的にグルクロン酸抱合されないときには、通常より多くのグリシン抱合体が排泄されるかもしれない。その場合、ピレスロイドの暴露を正確に評価するためには、PBacid のフリー体およびグリシン抱合体等の各種抱合体の総量を定量することが必要になると考えられる。

さらに、より正確にペルメトリンのバイオモニタリングを行うためには、尿中の 4'-OH-PBacid の硫酸抱合体を定量することも必要かもしれない。PBalc はヒトとラットの肝ミクロソームにおいて等しく生成し、PBalc は多くの CYP (CYP2E1、CYP2D6 および CYP2C19) により、4'-OH-PBalc に水酸化されることを明らかにした。PBacid と 4'-OH-PBacid の2つの代謝物をバイオモニタリングのマーカーに使用することで、より正確な評価が可能になるであろう。

小括

ヒトおよびラットの肝ミクロソームを用いた、*trans*-ペルメトリンの *in vitro* 代謝について検討した。ヒトおよびラットにおいて、*trans*-ペルメトリンの主要代謝経路はエステル結合の加水分解による PBalc の生成であり、4'-OH-PBacid がヒトで検出されなかったことを除いて、代謝物に種差は認められなかった。また、*in vivo* において 4'-OH-PBalc は *trans*-ペルメトリンの水酸化、加水分解の経路ではなく、*trans*-ペルメトリンの加水分解による PBalc の生成、PBalc の水酸化により生成する可能性が示唆された。さらに、PBalc の 4'位の水酸化に関与するヒト CYP 分子種を CYP2E1、CYP2D6 および CYP2C19 と同定した。ヒト CYP 分子種の中には、遺伝的多型が知られている分子種もあり、遺伝的多型により代謝が遅くなる場合、予期せぬ副作用が生じる化合物が知られている⁴⁴⁻⁴⁵⁾。しかし、PBalc は多くの分子種により代謝されることから、遺伝的多型による影響は少ないと考えられた。

ヒトおよびラットにおける、PBacid のグルクロン酸抱合活性およびグルクロン酸抱合を触媒するヒト UGT 分子種についても検討した。PBacid のグルクロン酸抱合活性に、種差は認められなかった。また、PBacid のグルクロン酸抱合に関わる UGT 分子種は、UGT1A9 であった。UGT1A9 には変異体があり、いくつかの変異体においては活性が低いことが知られている⁴¹⁻⁴²⁾。つまり、PBacid のグルクロン酸抱合活性が低いヒトにおいて、ペルメトリンの暴露を正確に見積もるためには、PBacid の代謝プロファイルが変わる可能性を考慮したほうが望ましいと考えられた。

ヒトと動物の代謝には種差がある場合があるため、種差を明確化することが重要である。第 2 章では、代謝において最も重要な組織であるヒト肝臓由来の試料（肝ミクロソーム）および代謝に関わる様々な酵素を用いて、殺虫剤ペルメトリンのヒトにおける詳細な代謝を初めて明らかにした。農薬においてヒトにおける詳細な代謝が解析された例は少なく、今後、第 2 章で示した手法を他の農薬に応用し、種差を解明していくことが必要と考える。

第3章 フルミオキサジンのヒトおよびラットにおける PBPK モデル研究

フルミオキサジンは、広葉雑草等に対し除草活性を有する N-フェニルイミド系除草剤であり、その除草メカニズムは、ポルフィリンの生合成阻害である⁴⁶⁾。一方、フルミオキサジンの毒性に関して、ラットとウサギで種差があることが明らかになっている。妊娠ラットにフルミオキサジンを 30 mg/kg にて経口投与すると、母体に毒性は現れないが、胎児に死亡例が認められた。一方、妊娠ウサギにおいては、フルミオキサジンを 3000 mg/kg にて経口投与しても母体、胎児ともに毒性が認められなかった⁴⁷⁾。ポルフィリンの生合成阻害、特にプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (PPO) の阻害が、ラットにおける催奇形性の要因として考えられており、ラット、ヒトおよびウサギの中で、最も PPO 阻害活性が強いのはラットであった⁴⁸⁾。

フルミオキサジンの ¹⁴C 標識体 (¹⁴C-フルミオキサジン) を用いたラットにおける *in vivo* 代謝研究により、投与された ¹⁴C-フルミオキサジンは尿および糞中に、13-43 および 56-85% 排泄されることが示されている⁴⁹⁻⁵⁰⁾。また、NMR や MS により 7 種の代謝物について同定されており、推定代謝経路は、1. シクロヘキサン環の水酸化、2. イミド結合の開裂、3. アミド結合の開裂、4. アミノ基のアセチル化、5. テトラヒドロフタルイミド環への亜硫酸の付加である。

PBPK モデルは、ヒトにおける代謝を予測するための有用なツールである。PBPK モデルを利用した多数の研究が行われており、それらの研究ではまず、ラット等の代謝に関するデータを基に、ラットにおける PBPK モデルを構築し、動物とヒトで種差のある代謝速度のパラメータ等を変更することにより、ヒトにおけるモデルを構築している⁵¹⁻⁵²⁾。

催奇形性メカニズムの解明において、フルミオキサジンの胎児中濃度を調べることは重要である。ラットとウサギの胎児中濃度を比較すると、ラットの濃度が高いことが明らかになっているが、ヒトに関しては実測値を得ることができない⁴⁸⁾。また、妊娠ラット、マ

ウスおよびウサギにおける除草剤の **PBPK** モデルについては研究されているが、ヒトにおける同様の研究は行われていない⁵³⁻⁵⁴⁾。

第 3 章では、フルミオキサジンの胎児における濃度を推定するため、妊娠ラットおよびヒトの **PBPK** モデルを構築した。

実験方法

化合物

フルミオキサジンのフェニル基を ^{14}C 標識した [phenyl- $\text{U-}^{14}\text{C}$]フルミオキサジン (^{14}C -フルミオキサジン) の比放射能は、4.00 GBq/mmol であった (Figure 15)。標識体の放射化学的純度は、98.6%であった。非標識体のフルミオキサジンの純度は、99.4%であった。他の試薬は特に記述がない限り、特級以上を用いた。

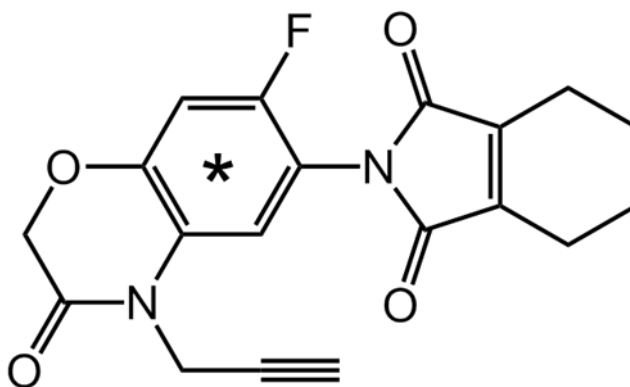


Figure 15. Chemical structure of [phenyl- $\text{U-}^{14}\text{C}$]flumioxazin. * represents the position of ^{14}C .

ヒトおよび雌性ラットの肝ミクロソームを用いたフルミオキサジンの *in vitro* 代謝

^{14}C -フルミオキサジン (5.6–100 μM) を 3 mM NADPH において、ヒトおよび雌性ラットの肝ミクロソーム (終濃度 1 mg/mL) と 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 37°C、20 分間インキュベートした。コントロール実験として、ミクロソームを添加せずに同様の実験を行った。インキュベート後、アセトニトリルを添加することにより反応を停止し、10 分間氷上で静置後、10000 $\times g$ で 5 分間遠心することにより上清を回収し、上清に対し 10% の酢酸を加え、TLC 分析に供した。

実験動物

動物実験は、住友化学株式会社生物環境科学研究所動物実験倫理指針に従って行われた。胆管カニュレーション済みの雌性 Sprague-Dawley (CrI:CD (SD)) ラットは、日本チャールスリバーから入手した。動物は次の条件で動物室にて飼育した：室温 (21~25°C)、湿度 (40~70%)、換気 (1 時間に 10 回以上)、12 時間周期の照明。動物は固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業)、ろ過水道水を自由に摂取させた。

¹⁴C 胆汁排泄実験

胆管カニュレーション済みの雌性ラット 3 匹に、¹⁴C-フルミオキサジン を 1000 mg/kg にて単回経口投与した。投与後、24、48 および 72 時間の胆汁、尿および糞を回収した。胆汁、尿および糞を回収後の代謝ケージは水で洗い、その洗浄液も回収した。洗浄液中の ¹⁴C は尿の回収率に含めた。投与後 72 時間に安楽死させ、消化管内容物を回収し、その他の組織はカーカスとした。吸収率は尿、胆汁およびカーカス中の ¹⁴C を合計することにより算出した。

放射化学分析

尿、胆汁の放射能は、LSC (TRI-CARB 2500TR、PerkinElmer) により測定した。回収した糞は水でホモジナイズし、糞ホモジネートを燃焼後、LSC により放射能を測定した。消化管内容物は、燃焼後、LSC により放射能を測定した。

TLC

分析にはシリカゲル 60F₂₅₄TLC プレート (20×20 cm、0.25mm 厚、Merck) を用いた。展開条件は、クロロホルム/トルエン/エタノール/酢酸、18:2:2:1 (v/v/v/v) およびトルエン/酢酸エチル/酢酸、3:6:1 (v/v/v) の 2 条件を ¹⁴C-フルミオキサジンの純度測定に用いた。また、トルエン/酢酸エチル/酢酸、50:50:1 (v/v/v) の条件を *in vitro* 代謝の分析に用いた。TLC プ

レート上の放射性化合物を imaging plate (富士フイルム) に室温で密着させ、fluorescent image analyzer (FLA-5000、富士フイルム) を用いたオートラジオグラフィーにより検出した。

妊娠ラットにおけるフルミオキサジンの *in vivo* 代謝

妊娠ラットにおけるフルミオキサジンの血液、肝臓、胎児中濃度等のデータは、妊娠ラットに ^{14}C -フルミオキサジンを 30 mg/kg にて単回経口投与して行われた、*in vivo* 代謝実験の報告書から引用した⁴⁸⁾。

妊娠ラットにおける PBPK モデル

PBPK モデルの構築は、acslXtreme (version 3.0.1.6、The AEgis Technologies Group) を用いて行った。PBPK モデルの構造を、Figure 16 に示す。モデルを構成する各コンパートメントの式およびモデルの構造は、Godin 等のモデルに基づき作成した⁵²⁾。しかし、Godin 等のモデルには胎盤および胎児のコンパートメントが含まれていないため、妊娠動物を用いた川本等のモデルも参照した⁵⁵⁾。

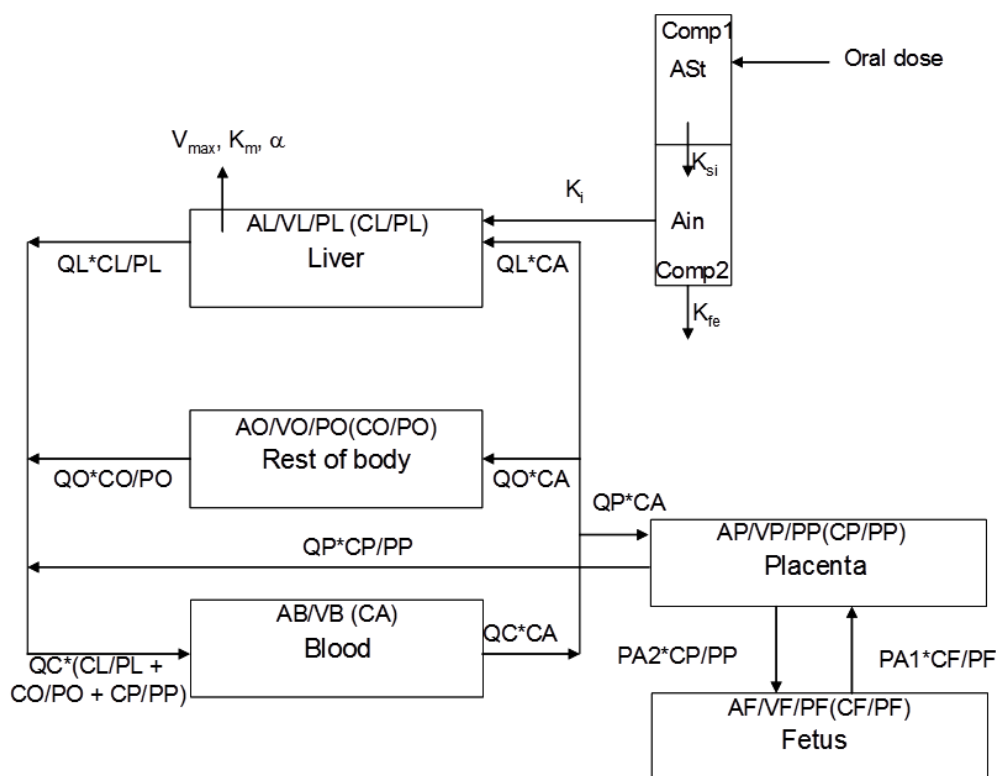


Figure 16. The PBPK model structure developed in this study.

妊娠ラットにおける生理学的パラメータ

PBPK モデルに使用した妊娠ラットの生理学的パラメータは、文献から引用した⁵⁶⁻⁵⁷⁾。なお、我々の研究所にて行われた *in vivo* 代謝実験と同様に、妊娠 12 日目のパラメータをモデルに適用した。

妊娠ラットにおける化合物特異的パラメータ

各組織における分配係数 (P_i) の初期値は、Poulin 等が提唱する *in silico* の手法により算出することにした²⁶⁾。 P_i の算出に必要な $\log P$ および血漿タンパク非結合率に関しては、ADMET Predictor (Simulations Plus) により予測した ($\log P = 1.353$ 、血漿タンパク非結合率 = 0.151)。 $\log P$ および血漿タンパク非結合率を用いて、肝臓および筋肉（筋肉の値をその

他組織、胎盤および胎児における分配係数と仮定した) の P_t を計算したところ、0.72 および 0.57 であった。胃排出速度定数 (K_{si}) および排泄速度定数 (K_{fe}) の初期値は、文献から引用した⁵²⁾。ラットにフルミオキサジンを 30 mg/kg 投与したときの吸収率は 50 % であったため、消化管吸収速度定数 (K_i) の初期値を K_{fe} に等しいとした⁴⁸⁾。 K_m および V_{max} は、*in vitro* 代謝実験の結果を適用した。また、 V_{max} に関しては次の文献値を用いて、ラット 1 kg 当たりの代謝速度に換算した：44.8 mg (ラット肝ミクロソームタンパク量) /40 g (ラット肝重量) /1 kg (ラット体重)⁵⁸⁾。*in vitro* と *in vivo* の代謝速度に関するスケーリングファクター (α) の初期値は、1 とした。胎児から胎盤への拡散係数 ($PA1$) および胎盤から胎児への拡散係数 ($PA2$) の初期値は、文献から引用した⁵⁵⁾。 P_t 、 K_{si} 、 K_{fe} 、 α 、 $PA1$ および $PA2$ のパラメータを妊娠ラットにおける 30 mg/kg 単回投与時のデータ (フルミオキサジンの血液、肝臓および胎児中濃度) にフィッティングさせることにより、最適化を行った。胎盤の P_t に関しては、フルミオキサジンの胎盤中濃度の実測値が得られていないため、その他組織の P_t に等しいと仮定した。

妊娠ラットにおける PBPK モデルのヒトへの外挿

妊娠 2 か月はヒトにおける器官形成期のため、2 か月時の生理学的パラメータを PBPK モデル作成に用いることとし、文献から引用した⁵⁹⁾。 P_t 、 K_{si} 、 K_{fe} 、 α 、 $PA1$ および $PA2$ のパラメータは妊娠ラットと等しいとしたが、 K_i に関しては 1000 mg/kg 投与時の吸収率が 12 % であることから、 4.98×10^{-3} に変更した。 K_m および V_{max} は、*in vitro* 代謝実験の結果を適用した。また、 V_{max} に関しては次の文献値を用いて、ヒト 1 kg 当たりの代謝速度に換算した：48.8 mg (ヒト肝ミクロソームタンパク量) /25.7 g (ヒト肝重量) /1 kg (ヒト体重)⁵⁸⁾。妊娠ラットおよびヒトにおける PBPK モデル構築に使用した全てのパラメータを、Table 9 に示す。

Table 9. Flumioxazin PBPK model parameters.

		Rat (pregnant, 12day)	Human (pregnant, 2months)
Body weight (kg)		0.32	60.55
Dose (mg/kg)		30	1000
Cardiac output			
	Total (QCC) [$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-0.75}$]	13.92	16.44
	To liver (QLC) [% QCC]	0.18	0.27
	To other tissues (QOC) [% QCC]	1-QLC-QPC	1-QLC-QPC
	To placenta (QPC) [% QCC]	1.97×10^{-3}	1.23×10^{-4}
Tissue volume			
	Blood (VBC) [%BW]	7.00×10^{-2}	7.30×10^{-2}
	Liver (VLC) [%BW]	3.00×10^{-2}	2.30×10^{-2}
	Other tissues (VOC) [%BW]	1-VBC-VLC-VPC-VFC	1-VBC-VLC-VPC-VFC
	Placenta (VPC) [%BW]	7.35×10^{-4}	1.66×10^{-4}
	Fetus (VFC) [%BW]	6.86×10^{-4}	9.09×10^{-5}
Pt (unitless)			
	Liver (PL)	35.0	35.0
	Other tissues (PO)	1.0	1.0
	Placenta (PP)	1.0	1.0
	Fetus (PF)	1.2	1.2
Stomach-intestine transfer rate constant (1/h)	K_{si}	3.1	3.1
Intestinal uptake rate constant (1/h)	K_i	3.6×10^{-2}	5.0×10^{-3}
Fecal excretion rate constant (1/h)	K_{fe}	3.6×10^{-2}	3.6×10^{-2}
Hepatic metabolic rate constant			
	V_{max} [$\text{mg}\cdot(\text{h}\cdot\text{kg})^{-1}$]	84.8	207.8
	K_m [mg/L]	34.8	202.4
Scaling factor (unit less)	α	5.0	5.0
Diffusion coefficient (L/h)			
Fetus to placenta	$PA1$	1.5×10^{-2}	1.5×10^{-2}
Placenta to fetus	$PA2$	1.0×10^{-2}	1.0×10^{-2}

感度解析

感度解析は、PBPK モデルに使用したパラメータを 0.1 % 変更することにより行った⁵²⁾。

ラットおよびヒトに 30 mg/kg および 1000 mg/kg 投与後 24 時間の血液および胎児中濃度を、感度解析の時点として選択した。正規化された感度係数 (NSC) を以下の式に従い計算した⁵²⁾。 m 、 ΔM 、 p および ΔP は予測値、予測値の変化、モデルのパラメータおよびパラメータの変化を示す。

$$NSC = \frac{\Delta M / m}{\Delta P / p}$$

誤差率解析

PBPK モデルにより計算した体内濃度の精度を確認するため、誤差率 (*Error ratio*) を以下の式に従い計算した。 y_{mi} 、 y_{ei} 、 $|x|$ および $\langle x \rangle$ は、計算値、実測値、絶対値および平均値を示す⁶⁰⁾。誤差率が 1 の場合、計算値と実測値が完全に一致しており、誤差率が 2 の場合、モデルは実測値を過大評価または過小評価していることを示す。

$$Error\ ratio = \exp[< | \log(\frac{y_{mi}}{y_{ei}}) | >]$$

結果

フルミオキサジンの *in vitro* 代謝

^{14}C -フルミオキサジン (5.6、20、50 および 100 μM) を、ヒトおよび雌性ラットの肝ミクロソームとインキュベートした。ヒトと雌性ラットで生成した代謝物に、違いは認められなかった (Figure 17)。コントロール実験において 1 種類の代謝物が検出されたが、これは加水分解により生成したものと推定した。

ヒトおよび雌性ラットの速度論的パラメータを、Table 10 に示す。 K_m および V_{max} はヒト > 雌性ラットの順であった。また、ヒトよりも雌性ラットの方が 2 倍程度高い固有クリアランス (V_{max}/K_m 値) を示したことから、フルミオキサジンはヒトよりも雌性ラットにおいてすみやかに代謝されることが示唆された。

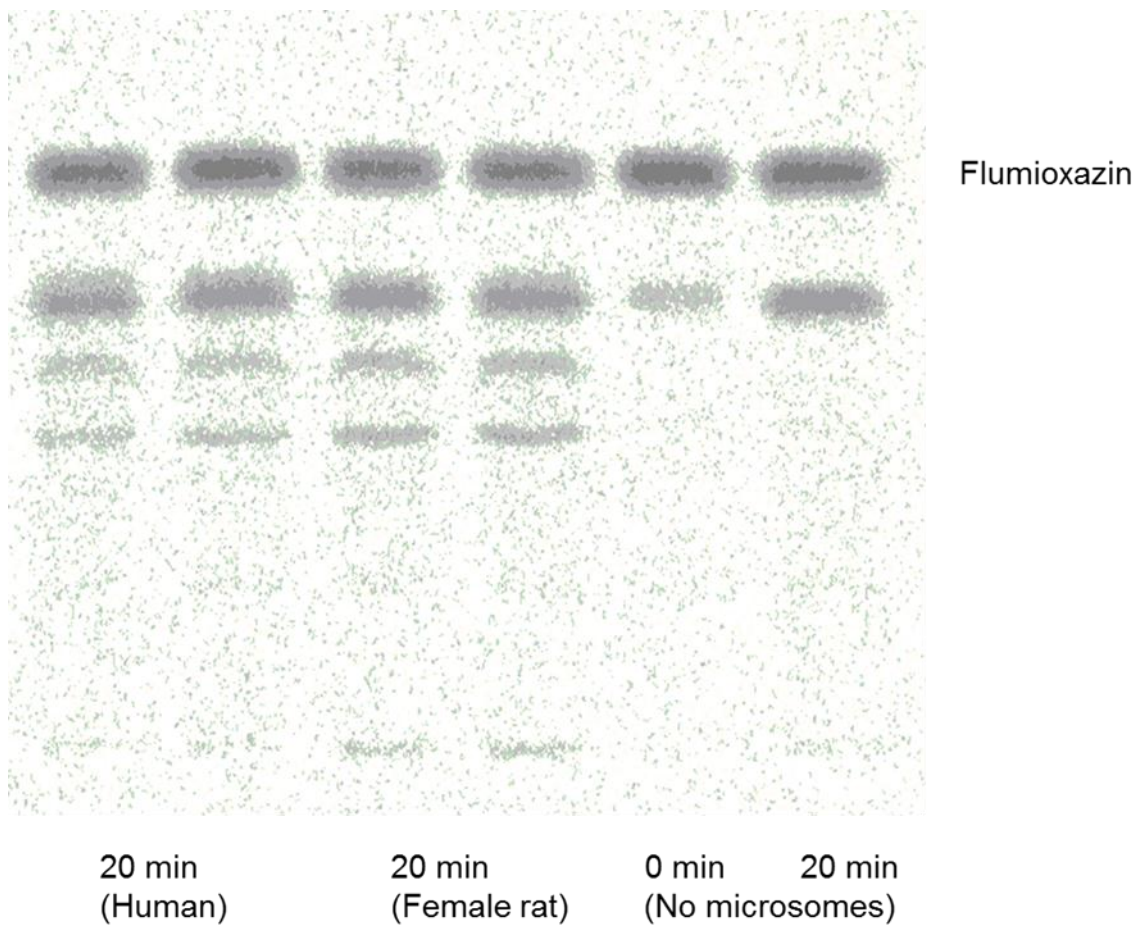


Figure 17. Typical TLC autoradiogram of the *in vitro* metabolism of flumioxazin.

Table 10. The kinetic parameters for [phenyl- ^{14}C]flumioxazin degradation in female rat and human liver microsomes.

	female rat	human
K_m [mg/L]	34.8	202.4
V_{max} [mg·(h·kg) $^{-1}$]	84.7	207.8
V_{max} / K_m [L·(h·kg) $^{-1}$]	2.4	1.0

胆汁排泄

胆管カニキュレーション済みのラットに ^{14}C -フルミオキサジン を 1000 mg/kg にて単回経口投与後 3 日間の尿、糞、および胆汁中への ^{14}C 排泄率、カーカスおよび消化管内容物中の ^{14}C 残留率を測定した。 ^{14}C 累積排泄率の結果を、Table 11 に示す。投与後 3 日の胆汁、尿および糞中累積排泄率は 5.2、6.8 および 84.7% であった。消化管内容物を除くカーカスおよび消化管内容物中の ^{14}C 残留率は、0.3 % および 0.6% であった。1000 mg/kg 投与時における雌性ラットの吸収率は、尿、胆汁およびカーカス中の ^{14}C を合計することにより、12.3% と算出した。

Table 11. Cumulative ^{14}C -excretion into the bile, urine and feces within 3 days after a single oral administration of [phenyl- $\text{U-}^{14}\text{C}$]flumioxazin at a dose of 1000 mg/kg to bile duct-cannulated rats.

Data represents the mean values \pm standard deviation of three rats. N.A. represents not analyzed.

Fraction	% of dosed ^{14}C								
	Time after administration								
	0-1day			0-2day			0-3day		
Bile	4.2	\pm	3.03	5.0	\pm	4.01	5.2	\pm	4.14
Urine	5.6	\pm	2.12	6.7	\pm	1.87	6.8	\pm	1.85
Carcass	N.A			N.A			0.3	\pm	0.20
Sub total	9.8	\pm	1.35	11.7	\pm	2.21	12.3	\pm	2.56
GIT contents	N.A			N.A			0.6	\pm	1.06
Feces	31.2	\pm	23.78	82.9	\pm	5.76	84.7	\pm	6.44
Total	41.0	\pm	23.32	94.6	\pm	5.83	97.6	\pm	7.56

妊娠ラットにおけるフルミオキサジン濃度のシミュレーション

妊娠ラットにフルミオキサジンを 30 mg/kg にて経口投与したときの血液、肝臓および胎児中フルミオキサジン濃度を、PBPK モデルにより計算した。血中濃度の実測値と計算値は、ほぼ一致していた (Figure 18)。また、肝臓中濃度は血中濃度よりも非常に高かったが、血中濃度と同様に実測値と計算値は、ほぼ一致していた (Figure 19)。肝臓における P_t は 35 であったことから、フルミオキサジンは他組織 ($P_t = 1$) よりも容易に肝臓に分布することが示唆された。さらに、胎児中濃度は血中濃度とほぼ同等であり、実測値と計算値は、ほぼ一致していた (Figure 20)。

血液、肝臓および胎児中濃度の誤差率を計算したところ、1.07、1.21 および 1.10 であったことから、ラットにおいて構築した PBPK モデルの定量性に問題のないことが明らかになった。つまり、ラットにおけるフルミオキサジンの代謝速度、組織分布、吸収および排泄に関するパラメータは、適切と考えられた。

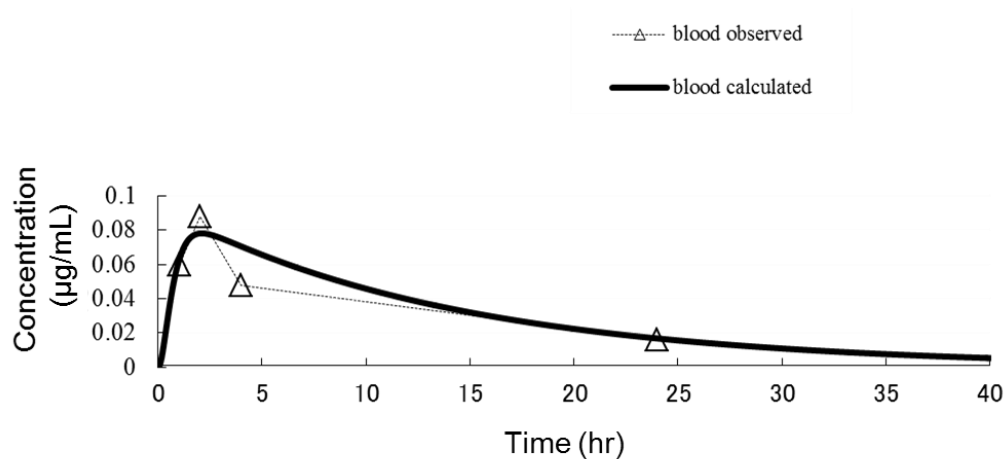


Figure 18. Flumioxazin concentration (observed and calculated) in the blood of pregnant rats orally dosed with flumioxazin at 30 mg/kg.

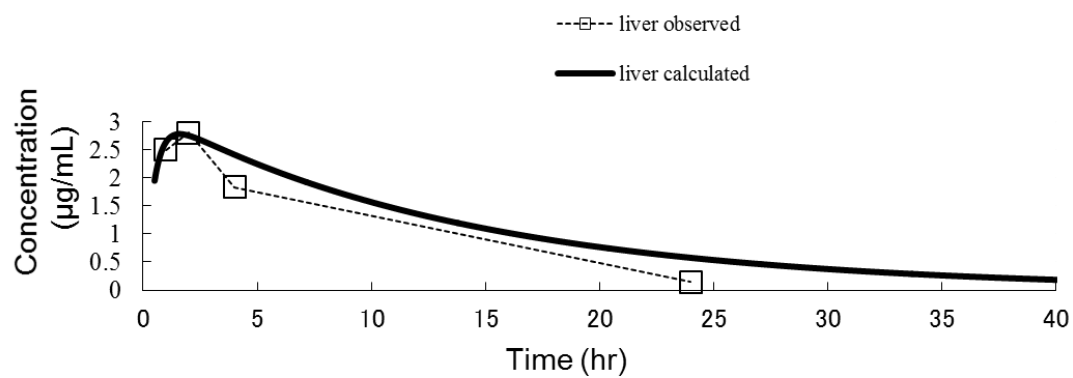


Figure 19. Flumioxazin concentration (observed and calculated) in the liver of pregnant rats orally dosed with flumioxazin at 30 mg/kg.

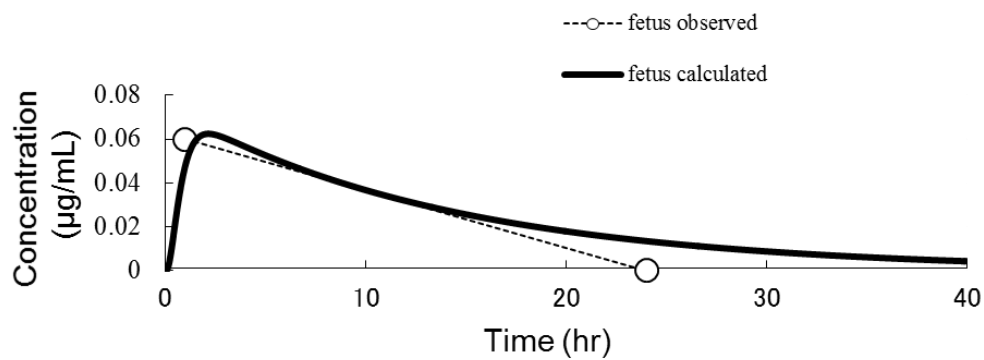


Figure 20. Flumioxazin concentration (observed and calculated) in the fetus of pregnant rats orally dosed with flumioxazin at 30 mg/kg.

ヒトにおけるモデリング

妊娠ラットにフルミオキサジン 30 mg/kg にて経口投与したときの PBPK モデルを、ヒトに外挿した。前述のように、1000 mg/kg 投与時の吸収率は 12%、*in vitro* 代謝実験より明らかとした K_m および V_{max} は 202.4 $\mu\text{g/mL}$ および 207.8 $\text{mg}\cdot(\text{h}\cdot\text{kg})^{-1}$ であった。生理学的パラメータは、文献を参考にした。以上のパラメータを妊娠ラットにおける PBPK モデルに組み込み、ヒトにフルミオキサジン 1000 mg/kg 投与したときの PBPK モデルを構築し、予測された血液および胎児の最高濃度は、0.86 $\mu\text{g/mL}$ (2.43 μM) および 0.68 $\mu\text{g/mL}$ (1.92 μM) であった (Figure 21)。

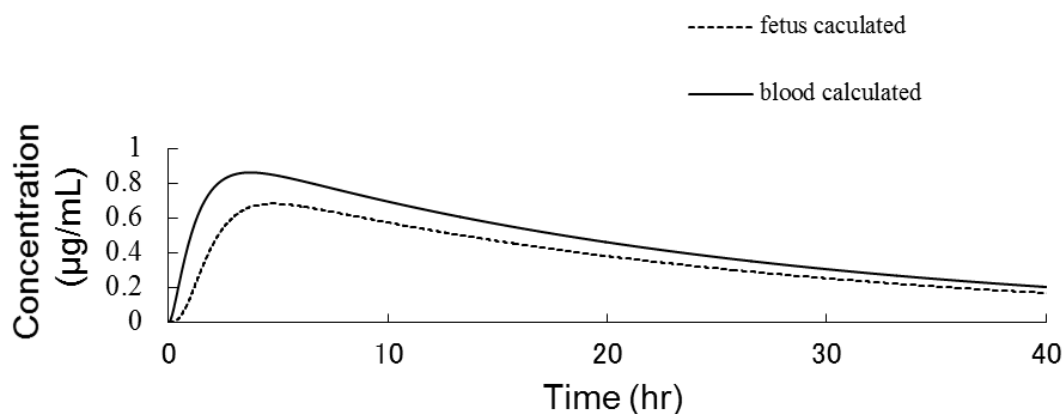


Figure 21. Calculated flumioxazin concentration in the blood and fetus of pregnant humans orally dosed with flumioxazin at 1000 mg/kg.

感度解析

ラットおよびヒトのモデルにおいて、 NSC が ± 0.1 以上のパラメータを、Table 12 に示す。両方のモデルにおいて、代謝に関わる V_{max} および K_m が敏感なパラメータであった。吸収に関わる K_i および K_{fe} も敏感なパラメータであったが、フルミオキサジンの胎児と胎盤の輸送

に関わる $PA1$ および $PA2$ は、胎児中濃度においてのみ重要であり、血中濃度においては敏感なパラメータではなかった。

Table 12. Calculated normalized sensitivity coefficients (NSC) of rats and humans models (only greater than ± 0.1).

Parameter	Blood concentration		Fetus concentration	
	Rat	Human	Rat	Human
V_{max}	-1.004	-1.006	-1.004	-1.006
K_{fe}	-0.303	-0.345	-0.303	-0.335
$PA1$	-	-	-0.937	-0.924
$PA2$	-	-	1.000	0.997
PF	-	-	0.999	0.984
K_i	0.696	0.962	0.696	0.963
K_m	0.997	0.990	0.997	0.990

考察

第3章の目的は、実験的に求めることが不可能であるヒトの血液および胎児中フルミオキサジン濃度を予測することである。まず、妊娠ラットにおいて予測性に優れた PBPK モデルの構築が、ヒトへの外挿において重要である。

妊娠ラットにフルミオキサジンを 30 mg/kg にて経口投与したときの肝臓中フルミオキサジン濃度は、血中濃度に比べて非常に高かった。実験方法で述べたように、 P_t はまず *in silico* の方法により算出し、30 mg/kg 経口投与時のデータ（血液、肝臓および胎児中フルミオキサジン濃度）にフィッティングすることで最適化を行った²⁶⁾。他の組織と異なり、*in silico* の方法により算出した肝臓の P_t (0.72) と、フィッティングにより最適化した P_t (35) に大きな違いが認められた。*in silico* の方法では、 $\log P$ と血漿タンパク非結合率を用いて P_t を予測するため、化合物の物理化学的性質のみが考慮されている²⁶⁾。しかし、フルミオキサジンの場合、肝臓への能動的な取り込みが起きている可能性がある⁵⁵⁾。ラットおよびヒトにおけるフルミオキサジンのトランスポーターに関する報告はないが、NTCP、OATPs、OATs、OCTs/OCTNs といったトランスポーターが、肝臓への能動的取り込みに関与していることが知られている⁶¹⁾。NTCP は胆汁酸の輸送に重要なトランスポーターであり、薬物輸送における役割については明らかではない。一般的に、OATPs/OATs および OCTs/OCTNs ファミリーは、アニオンおよびカチオン薬物の輸送に関与すると考えられている。しかし、パクリタキセルおよびドセタキセルは、フルミオキサジンと同様に疎水性のため生理的 pH において中性を示す化合物であるが、ヒトにおける OATP 8 の基質であり、肝臓へ取り込まれる⁶²⁾。より信頼性の高いモデルを構築するため、フルミオキサジンの肝取り込みに関与するトランスポーターの同定や、速度論的解析の実験を行うことが今後の課題と考える⁶³⁾。

化合物の胎盤透過は、脂溶性、血漿タンパク結合、分子量、イオン化およびトランスポーターによる輸送等により規定される⁶⁴⁻⁶⁵⁾。PBPK モデルにより計算した妊娠ラットにおけ

る胎児中のフルミオキサジン濃度は、血液と同様に速やかに最高濃度に到達し、その後減少した。フルミオキサジンが速やかに胎盤透過される要因は、明らかとなっていない。フルミオキサジンの脂溶性は比較的低いため、速やかな胎盤透過にはトランスポーターによる能動的輸送が関与しているかもしれないが、検証には胎盤透過におけるトランスポーターの同定が必要である。

妊娠ラットにおける PBPK モデルを構築後、ヒトの生理学的パラメータや代謝速度等の化合物特異的パラメータをモデルに適用することにより、ラットのモデルをヒトに外挿した。ヒトの肝ミクロソームを利用した *in vitro* 代謝実験は、ヒトにおける代謝クリアランスを調べる上で合理的な検討であるといえる。胎盤透過速度等の化合物特異的パラメータは、ヒトにおけるデータが得られないため、ラットの PBPK モデルにおいて使用したパラメータをそのまま適用した。したがって、ヒトの胎盤等の組織を用いて *in vitro* 実験を実施し、得られた実験結果をパラメータとして使用すれば、PBPK モデルの予測性がさらに向上する可能性がある。

ヒトおよびラットの *in vitro* 代謝実験により検出された代謝物を、フルミオキサジンのラットにおける *in vivo* 代謝実験の結果から、3-OH-flumioxazin および 4-OH-flumioxazin と推定した⁴⁹⁻⁵⁰⁾。これらの代謝物は、フルミオキサジンが水酸化されて生成することから、CYP の関与が考えられた。したがって、代謝に関与する CYP の同定は、ヒトにおけるフルミオキサジンの代謝の更なる理解に重要である。

ラットに ¹⁴C-フルミオキサジンを 1000 mg/kg にて投与した時の吸収率 (12%) は、1 mg/kg の時の吸収率 (80.4%) と比べ低かった。一方、投与後 1 日において投与した ¹⁴C の約 60% が体内、主に消化管に残留していたことから、フルミオキサジンは投与後すぐに糞中へ排泄されないことが示唆された。したがって、投与量を増やした時に吸収率が低下した要因として、フルミオキサジンの低い水溶解度 (1.79 mg/L) による、吸収の飽和が考えられた

²⁹⁾。

PBPK モデルにより予測された、ヒトにフルミオキサジン 1000 mg/kg にて投与したときの血液および胎児中の最高濃度は、0.86 µg/mL (2.43 µM) および 0.68 µg/mL (1.92 µM) であった。投与量の 1000 mg/kg は、動物実験のガイドラインにおける限界用量に基づき選択した。*in vitro* 代謝実験により得られた K_m (202.4 µg/mL) は、ヒトにフルミオキサジン 1000 mg/kg にて投与したときの濃度よりも高かったため、1000 mg/kg という高用量においてもヒトにおける代謝は飽和しないことが明らかになった。ヒトにフルミオキサジン 1000 mg/kg にて投与したときの血中および胎児中濃度は、妊娠ラットに 30 mg/kg にて投与した時の濃度を考慮すると比較的低かったが、これは吸収率が低く、高用量においても代謝が飽和しないことに起因すると考えられた。また、誤飲以外でヒトがフルミオキサジン 1000 mg/kg 摂取する可能性はなく、PBPK モデルにより予測されたヒトのフルミオキサジン濃度は、想定される最大値であると考えられた。しかし、感度解析により代謝や吸収に関する V_{max} 、 K_m 、 K_i 、 K_{fe} が敏感なパラメータであることが明らかとなったが、これらのパラメータの個人差により、濃度が変動する可能性がある。

第 3 章において明らかにしたヒトにおける血液および胎児中のフルミオキサジン濃度は、ヒトにおける催奇形性を調べるための *in vitro* 毒性実験を行う上で有用である。これらの実験により、ヒトにおいてフルミオキサジンの影響がないことが明らかになれば、フルミオキサジンはヒトにおいて催奇形性を引き起こさない化合物であると結論付けることができる。

小括

フルミオキサジンの妊娠ラットにおける PBPK モデルに基づいて、*in vitro* 代謝実験等から得られた代謝速度のパラメータや、文献から得られた生理学的パラメータを適用することにより、ヒトにおける PBPK モデルを構築した。PBPK モデルにより予測された、ヒトにフルミオキサジンを 1000 mg/kg にて投与したときの血液および胎児中の最高濃度は、0.86 $\mu\text{g/mL}$ (2.43 μM) および 0.68 $\mu\text{g/mL}$ (1.92 μM) であった。今回構築した PBPK モデルは比較的簡素であり、必要とするパラメータ数も少ないことから、他の除草剤をはじめとする農薬にも活用が可能であろう。PBPK モデルにより明らかとしたヒトの血液および胎児中におけるフルミオキサジン濃度は、ヒトにおける催奇形性を調べるための *in vitro* 毒性実験を実施する際の濃度設定に、特に有用になると考えられた。

第 3 章では N-フェニルイミド系除草剤フルミオキサジンを題材として、PBPK モデルによりヒトの血中濃度等を予測した。本研究により開発した PBPK モデルを、農薬の特徴に応じてカスタマイズすれば、多くの農薬のヒトにおける体内動態を予測できると考えられる。

第4章 化学物質のヒトにおける胎盤透過性予測のための QSAR 研究

医薬品や農薬等の化学物質の胎児に対する毒性評価において、その胎盤透過性を明らかにすることは重要である。多くの薬物に関して、胎盤透過に関する研究が行われている。

一方、倫理的な観点から、ヒトの胎盤透過性を実験的に調べることは困難であるため、簡便な胎盤透過性の予測が望まれており、*in vitro* や *ex vivo* の手法が開発されている⁶⁶⁾。*in vitro* の手法では、ヒトの胎盤から得られた BeWo、Jar および JEG といった細胞株が胎盤のモデルとして使用されている⁶⁷⁾。また、*ex vivo* の手法では、ヒトの胎盤を灌流させ、化合物の透過が調べられており、多くの研究において有用性に関して検証されているが、ヒトの胎盤の入手が困難という欠点がある^{66, 68)}。

QSAR は化学物質の生物活性を予測するための有用なツールである。 $\log P$ や分子量といった記述子が QSAR 式の構築に必要であり、これらの記述子は実験、計算、ソフトウェアを用いた予測等により算出できる。QSAR は代謝の研究分野において、バイオアベイラビリティ、ヒト結腸癌由来細胞 (Caco-2) 透過性、代謝物の構造予測等に利用されている⁶⁹⁻⁷¹⁾。胎盤透過の QSAR 研究としては、*ex vivo* の胎盤透過に関するデータを用いた QSAR 式が報告されているが、主に臨床研究 (*in vivo*) から得られた臍帯血-母体血濃度比 (F/M 値) を利用した研究は報告例がない⁷²⁻⁷³⁾。

第4章では、*in vivo* の F/M 値を用いた、化学物質のヒトにおける胎盤透過性予測のための QSAR 研究について述べる。

実験方法

データセット

55 化合物の F/M 値をデータセットとして用いた⁷⁴⁻⁸⁹⁾。 F/M 値は文献の値をそのまま使用したが、11 化合物 (carnitine、chlordane、chlorpyrifos、DDE、diazinon、dicloran、HCB、heptachlor epoxide、nonachlor、oxychlordane、phthalimide) に関しては文献に F/M 値が記載されていないため、化合物の母体血および臍帯血中濃度から計算した。

記述子

化合物の記述子は、PaDEL-descriptor (version2.18、National University of Singapore) により計算した⁹⁰⁾。化合物の分子量や脂溶性は、膜透過において重要であると報告されているため、記述子として分子量 (MW) と $XLogP$ を選択した⁷²⁻⁷³⁾。さらに、化合物の極性に関わる以下の記述子も選択した：sum of the atomic polarizabilities ($Apol$)、autocorrelation of a topological structure (ATS)、ATS weighted by charges ($ATSc1$ 、 $ATSc2$ 、 $ATSc3$ 、 $ATSc4$ 、 $ATSc5$)、ATS weighted by polarizability ($ATSp1$ 、 $ATSp2$ 、 $ATSp3$ 、 $ATSp4$ 、 $ATSp5$)、sum of the absolute value of the difference between atomic polarizabilities of all bonded atoms in the molecule ($Bpol$)、aximum E-state of hydrogen atom (H_{max})、maximum E-state (G_{max})、minimum E-state of hydrogen atom (H_{min})、minimum E-state (G_{min})、Global topological charge index ($GlobalTopoChargeIndex$)、combined dipolarity/polarizability ($MLFER_S$)、topological polar surface area ($TopoPSA$)⁹¹⁻⁹⁵⁾。各記述子間の相関係数が 0.7 以上の場合、多重共線性を回避するため、片方の記述子を除外した。最終的に、 $ATSc3$ 、 $ATSc4$ 、 $ATSp1$ 、 H_{max} 、 G_{max} 、 H_{min} 、 $GlobalTopoChargeIndex$ 、 $TopoPSA$ 、 MW および $XLogP$ を QSAR 式の構築に使用した。

QSAR 式の構築

乱数を発生させることにより、データセットをトレーニングセット (75 %) とテストセット (25 %) に分割した。R programming language (version 3.1.0) を用いて、トレーニングセットの重回帰分析を行った。QSAR 式の構築に使用した記述子は、赤池情報量規準 (AIC) を基準とした変数減少法により絞り込みを行い、記述子の p 値が 0.05 を下回るものを選択した⁹⁶⁾。

QSAR 式の交差検証として、一個抜き交差検証 (Leave-one-out Cross-Validation) を行い、交差検証した決定係数 (Q^2) を指標とした⁹⁷⁾。また、QSAR 式の予測性を評価する上で最も優れた手法である外部検証を行い、外部検証の決定係数 (R^2_{pred}) を指標とした⁹⁷⁾。

結果および考察

重回帰分析

AIC を基準とした変数減少法と p 値に基づき、3 種の記述子 (MW 、 $TopoPSA$ および H_{max}) をトレーニングセットの QSAR 式構築のため選択した。 MW および $TopoPSA$ は、分子量および化合物の極性面積を示す記述子であり、化合物の胎盤透過に関与することが知られている⁷²⁻⁷³⁾。一方、 H_{max} は化合物の水素原子における最も大きい E-state 値を示す記述子であり、化合物の電荷と相関している⁹⁸⁾。例えば、OH、NH₂、COOH 基の水素原子が H_{max} となる場合が多い。 H_{max} に関しては、化合物の胎盤透過に関与することを示す報告はない。

トレーニングセットの重回帰分析と交差検証を行った（式（1）、括弧内の数値は、95% 信頼限界）。また、各化合物の予測値と実測値を、Figure 22 および Table 13 に示す。

$$\text{Log}(F/M) = -0.00231(\pm 0.000581)MW + 0.00233(\pm 0.00160)TopoPSA$$

$$+ 0.382(\pm 0.285)H_{max} - 0.00363$$

$$n = 41, R_a^2 = 0.64, Q^2 = 0.63 \quad (1)$$

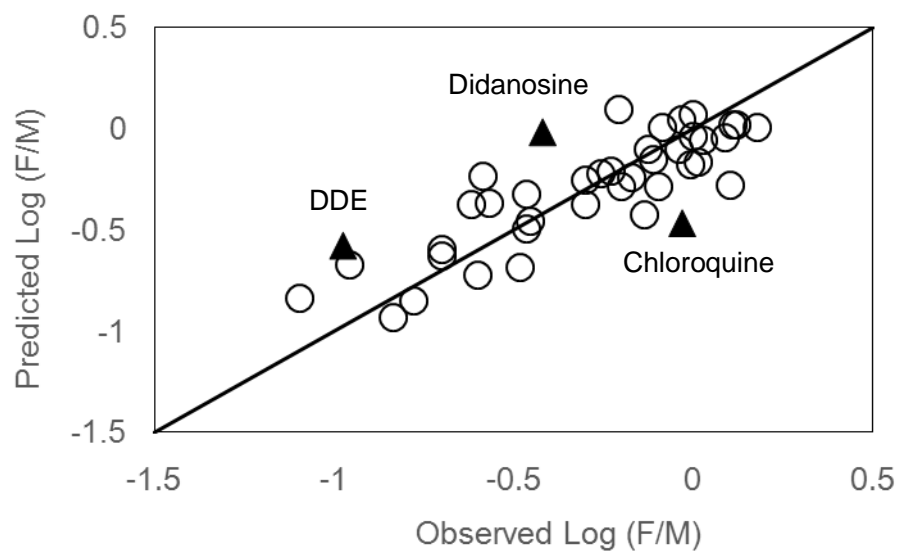


Figure 22. A plot of observed vs. predicted log (F/M) ratio of training sets. Solid triangles indicate outliers.

Table 13. Names, descriptors, and observed and predicted log (*F/M*) ratio of training sets.

Name	Hmax	TopoPSA	MW	observed log (<i>F/M</i>)	predicted log (<i>F/M</i>)	Reference
17-hydroxyprogesterone caproate	0.582	60.4	428	-0.70	-0.63	10
Abacavir	0.689	101.9	286	0.01	-0.16	11
Acebutolol	0.753	87.7	336	-0.10	-0.29	12
Buprenorphine	1.250	62.2	467	-0.46	-0.46	15
Carnitine	0.670	60.4	161	0.11	0.02	16
Cefoperazone	1.015	264.3	648	-0.46	-0.49	17
Chlordane	0.230	0.0	406	-0.78	-0.85	18
Chloroquine	0.544	28.2	319	-0.03	-0.47	17
Chlorpyrifos	1.154	82.5	349	-0.01	-0.18	19
Clindamycin	0.814	127.6	424	-0.30	-0.37	17
Clonazepam	0.841	84.6	315	-0.23	-0.21	17
DDE	0.407	0.0	316	-0.98	-0.58	18
Diazepam	0.791	32.7	284	0.10	-0.28	14
Dicloran	0.674	69.2	206	0.03	-0.06	19
Didanosine	0.849	88.7	236	-0.42	-0.02	11
Ethabutol	0.577	64.5	204	-0.12	-0.10	17
Etidocaine	0.637	32.3	276	-0.47	-0.32	21
Flecainide	1.391	59.6	414	-0.20	-0.29	17
Flupenthixol	1.339	52.0	434	-0.62	-0.37	17
HCB	0.150	0.0	282	-0.70	-0.60	18
Heptachlor epoxide	0.468	12.5	386	-0.48	-0.69	18
Indinavir	0.795	118.0	613	-1.10	-0.84	14
Isoniazid	0.675	68.0	137	-0.21	0.10	17
Lamivudine	0.819	113.5	229	-0.03	0.05	11
Lidocaine	0.637	32.3	234	-0.26	-0.23	17
Metronidazole	0.735	81.2	171	0.00	0.07	17
Mifepristone	0.595	40.5	429	-0.96	-0.67	17
Naloxone	0.890	70.0	327	-0.30	-0.26	17
Nelfinavir	0.768	127.2	567	-0.60	-0.72	23
Nevirapine	0.624	58.1	266	-0.17	-0.24	22
Nifedipine	1.039	107.8	346	-0.11	-0.15	24
Nonachlor	0.228	0.0	440	-0.84	-0.93	18
Phthalimide	0.635	46.2	147	-0.09	0.01	19
Piperacillin	1.052	181.7	517	-0.57	-0.37	17
Propranolol	0.707	41.5	259	-0.59	-0.23	14
Remifentanyl	0.701	76.2	376	-0.14	-0.43	25
Sotalol	1.019	86.8	272	0.00	-0.04	12
Stavudine	0.931	78.9	224	0.12	0.02	11
Ticarcillin	0.980	177.6	384	-0.04	-0.10	17
Valproic Acid	0.669	37.3	144	0.18	0.01	14
Zidovudine	0.945	91.2	267	0.09	-0.05	11

3 化合物（chloroquine、DDE および didanosine）に関して、標準化残差の絶対値が 2 以上であったため、外れ値とみなした。3 化合物除外後の QSAR 式を下記に示す（式（2）、括弧内の数値は、95%信頼限界）。

$$\begin{aligned}\text{Log}(F/M) = & -0.00238(\pm 0.00050)MW + 0.00238(\pm 0.00139)TopoPSA \\ & + 0.380(\pm 0.245)H_{max} + 0.0283 \\ n = 38, R_a^2 = 0.73, Q^2 = 0.71 \quad (2)\end{aligned}$$

各記述子の重要度を明確にするため、標準偏回帰係数を計算したところ、*MW*、*TopoPSA* および *H_{max}* において、-0.922、0.376 および 0.314 であった。つまり、ヒトの *F/M* 値を規定する要因として、分子量は化合物の極性を表す記述子より重要であることが示された。

QSAR 式において、記述子 *MW* の符号は負であったが、*ex vivo* 実験によって得られた QSAR 式のそれと同様であった⁷³⁾。つまり、*MW* が増加すると、*F/M* 値は低下するということを意味する。分子量の小さい化合物の方が、分子量の大きい化合物より容易に胎盤膜を透過できるため、*MW* が負となるのは合理的である⁷³⁾。一方、化合物の極性を表す記述子である *TopoPSA* および *H_{max}* の符号は正であったが、*ex vivo* 実験によって得られた QSAR 式のそれと反対であった。つまり *ex vivo* では、*TopoPSA* および *H_{max}* が減少すると、*F/M* 値は増加するのに対し、*in vivo* では *F/M* 値が低下するということを意味する。*ex vivo* の実験系において、*F/M* 値は化合物の膜透過の影響のみで決定される。したがって、極性の低い化合物ほど膜透過しやすいことから、極性を規定する記述子の符号は負となる。しかし、*in vivo* の実験系において、*F/M* 値は化合物の膜透過および血中脂質との相互作用という 2 つの影響により決定される。妊婦の血液には、新生児と比較して、数倍脂質が多いことが知られている⁹⁹⁾。つまり、極性の低い化合物ほど母体血中に存在しやすい。加えて、取り込み型トランスポーターの寄与も考えられる¹⁰⁰⁾。例えば、バルプロ酸の胎盤透過において、モノカルボン酸トランスポーター (MCT) が関与していることが報告されている¹⁰¹⁾。一般的に、バルプロ酸のように極性の高い化合物ほど、トランスポーターの基質になる可能性がある¹⁰²⁾。こ

これらの複合要因により、*in vivo* において極性を規定する記述子の符号は、*ex vivo* と異なると考えられた。

外部検証

QSAR 式検証用の 14 化合物のデータセットを用い、外部検証を行った (Figure 23、Table 14)。予測性の指標である R^2_{pred} が 0.51 であったことから、許容できる QSAR 式が構築されたと判断した⁹⁷⁾。

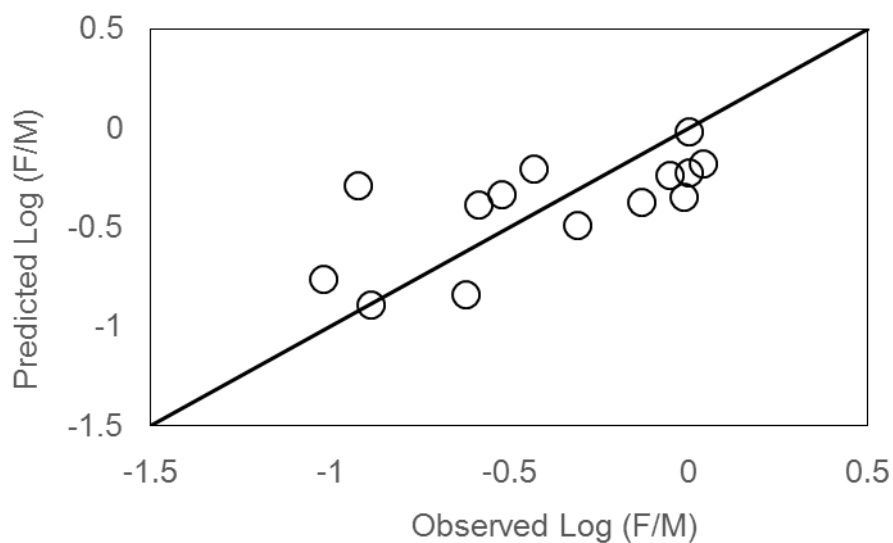


Figure 23. The plot of observed vs. predicted log (F/M) ratio of testing sets. Solid triangles indicate outliers.

Table 14. Names, descriptors, and observed and predicted log (F/M) ratio of testing sets.

Name	Hmax	TopoPSA	MW	observed log (F/M)	predicted log (F/M)	Reference
Atazanavir	0.910	171.2	704	-0.89	-0.90	13
Bupivacaine	0.637	32.3	288	-0.52	-0.34	14
Clonidine	0.492	36.4	229	-0.05	-0.24	17
Diazinon	1.173	95.4	304	0.00	-0.02	19
Disopyramide	0.662	59.2	339	-0.59	-0.39	17
Duloxetine	0.701	49.5	297	-0.92	-0.29	20
Indomethacin	0.820	68.5	357	-0.01	-0.35	17
Lopinavir	0.902	120	628	-0.62	-0.84	22
Metoprolol	0.691	50.7	267	0.00	-0.22	12
Midazolam	0.785	29.7	325	-0.13	-0.38	17
Norbuprenorphine	0.768	71.0	413	-0.31	-0.49	15
Oxprenolol	0.727	50.7	265	-0.43	-0.21	12
Oxychlorane	0.465	12.5	420	-1.02	-0.76	18
Procainamide	0.549	58.4	235	0.04	-0.18	17

小括

ヒトにおける化合物の胎盤透過を予測するため、文献から収集した 55 化合物の F/M 値を用いて QSAR 解析を試みた。まず、トレーニングセット (41 化合物) と記述子 (MW , $TopoPSA$ および H_{max}) による重回帰分析により、QSAR 式を構築した。次に、テストセット (14 化合物) により QSAR 式の予測性を検証したところ、問題のないことが明らかになった。ヒトにおける化合物の F/M 値を実験的に求めることは難しいため、本研究により開発した QSAR 式は、化合物の胎盤透過に関してリスクアセスメントを行う上で有用である。

第 4 章では農薬を含む化学物質の胎児における毒性評価に重要である、ヒトにおける胎盤透過性に関して QSAR 解析および検証を行い、予測性に問題のない QSAR 式を構築した。この QSAR 式を用いることにより、ヒトにおける農薬等の胎盤透過の簡便な予測が可能となる。

結論

農薬は我々の生活に必要な不可欠な化学物質であり、安全性の高い新規農薬の開発が望まれている。本研究では、安全性の高い農薬開発に貢献するため、直接ヒトへの投与により代謝実験ができない農薬について、動物における代謝をヒトに外挿する手法を確立することを目的とし、以下の4テーマに関して研究を行った。

第1章では、プロピリスルフロンのラットにおける *in vivo* 代謝について検討し、他の SU 剤と異なる排泄パターンであることを明らかにした。その理由として、プロピリスルフロンの水溶解度が、他の SU 剤と比べて低いことが考えられた。また、排泄物および組織中の代謝物を同定し、他の SU 剤と同様の代謝を受けることを示した。尿、糞および胆汁中に検出された ^{14}C の多くは代謝物であったが、血漿中ではほとんど未変化体であったため、投与されたプロピリスルフロンは水溶性の高い代謝物として、体外へ排泄されることが示された。さらに、主要代謝物から微量代謝物に至るまでの多数の代謝物の構造を、機器分析を駆使することにより決定した。

第2章では、ヒトおよびラットの肝ミクロソームを用いた *trans*-ペルメトリンの *in vitro* 代謝について検討し、ヒトおよびラットにおける *trans*-ペルメトリンの主要代謝経路はエステル結合の加水分解による PBalc の生成であり、検出された代謝物に種差は認められないことを明らかにした。また、PBalc の 4'位の水酸化に関与するヒト CYP 分子種は CYP2E1、CYP2D6 および CYP2C19 であり、PBalc は多くの分子種により代謝されることから、遺伝的多型による影響は少ないと考えられた。さらに、ヒトおよびラットにおける、PBacid のグルクロン酸抱合活性およびグルクロン酸抱合を触媒するヒト UGT 分子種についても検討したところ、種差は認められず、UGT 分子種は UGT1A9 であった。

第 3 章では、フルミオキサジンの妊娠ラットおよびヒトの PBPK モデルについて検討し、フルミオキサジンのヒトにおける体内濃度を予測した。PBPK モデルにより予測したヒトにフルミオキサジンを 1000 mg/kg 投与した時の血液および胎児中最高濃度は、0.86 µg/mL (2.43 µM) および 0.68 µg/mL (1.92 µM) であり、妊娠ラットにフルミオキサジンを 30 mg/kg 投与した時の体内濃度を考慮すると比較的低かったが、1000 mg/kg 投与した時のフルミオキサジンの体内吸収率は約 10 % と低く、代謝速度も速やかであることが、低濃度の要因と考えられた。

第 4 章では、文献から収集した 55 化合物の臍帯血-母体血濃度比 (F/M 値) を用いた QSAR 解析について検討し、ヒトにおける F/M 値の予測式を構築した。構築した予測式の予測性に関して外部検証を行ったところ、指標である R^2_{pred} 値が 0.51 であったことから、許容できる予測式が構築されたと判断した。

第 1 章では、除草剤プロピリスルフロンのラットにおける *in vivo* 代謝実験により、主要代謝物から微量代謝物に至るまで多数の代謝物の構造を決定した。農薬のヒトにおける主要代謝物がラットにおいては微量代謝物である可能性も考えられるため、ラットの *in vivo* 代謝実験において可能な限り多くの代謝物の構造情報を取得することは重要であり、第 1 章で示した試料の前処理法や機器分析法は、他の農薬においても適用可能な方法と考えられる。第 2 章では、殺虫剤ペルメトリンのヒトにおける詳細な代謝について、ヒトの肝ミクロソームや酵素を用いた *in vitro* 代謝実験により初めて明らかにした。農薬のヒトにおける代謝が詳細に解析された事例は少なく、第 2 章で示した実験手法により他の農薬においてもヒトにおける詳細な代謝の知見が得られることが期待される。第 3 章では、除草剤フルミオキサジンのヒトにおける体内濃度を明らかにするため、精緻な PBPK モデルを構築した。この PBPK モデルは比較的簡便であり、必要とするパラメータも多くないことから、他の農薬においても応用可能なモデルと考えられる。第 4 章では、これまで報告がなく、

簡便な予測式の構築が望まれていたヒトにおける化学物質の胎盤透過性に関して、予測性能の基準を満たす QSAR 式を構築した。この QSAR 式を用いることにより、農薬に限らず、様々な化学物質のヒトにおける胎盤透過性が予測できると考えられる。

安全性の高い農薬開発に貢献するため、直接ヒトへの投与により代謝実験ができない農薬について、動物における代謝をヒトに外挿する手法を確立することを目的として第 1 章～第 4 章で示した研究を行ったが、これらは独立したものではなく、それぞれが動物における代謝をヒトに外挿するうえで必要な技術であると考ええる。つまり、農薬に対してこれらの技術を複合的に適用することが代謝をヒトに外挿する際に有用であり、今後、多くの農薬に関して本手法が適用され、その結果が農薬のヒトにおける安全性評価に活用されることを期待したい。

謝辞

本論文の執筆にあたり、終始暖かくご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 情報・計量薬学分野 教授 高木 達也先生に心より感謝の意を表します。

本論文を審査していただき、適切なお助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 教授 那須 正夫先生ならびに教授 平田 収正先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始適切なお指導、ご鞭撻を賜りました元住友化学株式会社 生物環境科学研究所 上席研究員 十亀 祥久博士、住友化学株式会社 生物環境科学研究所 主席研究員 永堀 博久博士、住友化学株式会社 生物環境科学研究所 統括リーダー 味方 和樹博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多大なご協力を賜りました元住友化学株式会社 生物環境科学研究所 所長 金子 秀雄博士、住友化学株式会社 生物環境科学研究所 フェロー 磯部 直彦博士、住友化学株式会社 国際アグロ事業部登録部 部長 西岡 和彦博士、住友化学株式会社 生物環境科学研究所 主任研究員 松井 正義氏、住友化学株式会社 生物環境科学研究所 研究員 竹内 逸人氏に心より御礼申し上げます。

参考文献

1. http://www.jcpa.or.jp/qa/a6_13.html
2. http://www.jcpa.or.jp/qa/a5_08.html
3. 寺本 昭二. 農薬の安全性評価に係る毒性試験法ならびに最近の動向. *日本農薬学会誌*, **38**, 24-27 (2013).
4. National Research Council. *Intentional Human Dosing Studies for EPA Regulatory Purposes: Scientific and Ethical Issues*, National Academy of Sciences (2004).
5. Roffey SJ, Obach RS, Gedge JI, Smith DA. What is the objective of the mass balance study? A retrospective analysis of data in animal and human excretion studies employing radiolabeled drugs. *Drug. Metab. Rev.*, **39**, 17-43 (2007).
6. Lin JH, Lu AY. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol. Rev.*, **49**, 403-449 (1997).
7. Iwatsubo T, Hirota N, Ooie T, Suzuki H, Shimada N, Chiba K, Ishizaki T, Green CE, Tyson CA, Sugiyama Y. Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol. Ther.*, **73**, 147-171 (1997).
8. Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **189**, 233-246 (2003).
9. Sweeney LM, Gargas ML, Strother DE, Kedderis GL. Physiologically based pharmacokinetic model parameter estimation and sensitivity and variability analyses for acrylonitrile disposition in humans. *Toxicol. Sci.*, **71**, 27-40 (2003).
10. Liu R, Liu J, Tawa G, Wallqvist A. 2D SMARTCyp reactivity-based site of metabolism

- prediction for major drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. *J. Chem. Inf. Model.*, **52**, 1698-712 (2012).
11. Thiphom S, Prapamontol T, Chantara S, Mangklabruks A, Suphavitai C, Ahn KC, Gee SJ, Hammock BD. Determination of the pyrethroid insecticide metabolite 3-PBA in plasma and urine samples from farmer and consumer groups in northern Thailand. *J. Environ. Sci. Health B*, **49**, 15-22 (2014).
 12. Saari LL, Cotterman JC, Primiani MM. Mechanism of Sulfonylurea Herbicide Resistance in the Broadleaf Weed, *Kochia scoparia*. *Plant Physiol.*, **93**, 55-61 (1990).
 13. Brown HM. Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pestic. Sci.*, **29**, 263-281 (1990).
 14. Sarmah AK, Sabadie J. Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soils and aqueous solutions: a review. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6253-6265 (2002).
 15. Scrano L, Bufo SA, Perucci P, Meallier P, Mansour M. Photolysis and hydrolysis of rimsulfuron. *Pestic. Sci.*, **55**, 955-961 (1999).
 16. Chaleff RS, Mauvais CJ. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science*, **224**, 1443-1445 (1984).
 17. LaRossa RA, Schloss JV. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, **259**, 8753-8757 (1984).
 18. Ray TB. Site of action of chlorsulfuron. *Plant Physiol.*, **75**, 827-831 (1984).
 19. Délye C, Pernin F, Scarabel L. Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Plant Sci.*, **180**, 333-342 (2011).
 20. Tranel PJ, Wright TR. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned?

Weed Science, **50**, 700-712 (2002).

21. Tanaka Y, Koyama T. Properties of acetolactate synthase from sulfonylurea-resistant *Scirpus juncoides* Roxb. var. *ohwianus* T. Koyama. *Pest. Biochem. Physiol.*, **77**, 147-153 (2003).
22. Ikeda H, Yamato S, Kajiwarra Y, Nishiyama T, Tabuchi T, Tanaka Y. Evaluation of novel sulfonylurea derivatives with a fused heterocyclic moiety as paddy herbicides that control sulfonylurea-resistant weeds. *Weed. Biol. Manag.*, **11**, 167-174 (2011).
23. Ikeda H, Inaba J, Kajiwarra Y, Tanaka Y. Propyrisulfuron, a new herbicide for rice. *Pak. J. Weed. Sci. Res.*, **18**, 229-237 (2012).
24. Roberts T, Hutson DH, Lee PW, Nicholls PH, Plimmer JR. *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part1: Herbicides and Plant Growth Regulators*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1998).
25. Dubelman AM, Solsten TR, Fujiwara H, Mehresheikh A. Metabolism of halosulfuron-methyl by corn and wheat. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2314-2321 (1997).
26. Poulin P, Theil FP. Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. 1. Mechanism-based prediction of volume of distribution. *J. Pharm. Sci.*, **91**, 129-156 (2002).
27. Anagha AD, Krishna RI. Quick Review of Pharmacology (Ver 3.0). *Virtual Medical Books*, (2010).
28. Shepard TA, Lockwood GF, Aarons LJ, Abrahmas ID. Mean residence time for drugs subject to enterohepatic cycling. *J. Phamacokinet. Biopharm.*, **17**, 327-345 (1989).
29. Willmann S, Schmitt W, Keldenich J, et al. A physiological model for the estimation of the fraction dose absorbed in humans. *J. Med. Chem.*, **47**, 4022-4031 (2004).
30. Casida JE, Quistad GB. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.*, **43**, 1-16 (1999).

31. Gaughan, LC, Unai T, Casida JE. Permethrin Metabolism in Rats. *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 9-17 (1977).
32. Verschoyle RD, Barnes JM. Toxicity of natural and synthetic pyrethrins to rats. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **2**, 308-311 (1972).
33. 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).
34. Wang D, Kamijima M, Imai R, Suzuki T, Kameda Y, Asai K, Okamura A, Naito H, Ueyama J, Saito I, Nakajima T, Goto M, Shibata E, Kondo T, Takagi K, Takagi K, Wakusawa S. Biological monitoring of pyrethroid exposure of pest control workers in Japan. *J Occup Health.*, **49**, 509-514 (2007).
35. Barr DB, Olsson AO, Wong LY, Udunka S, Baker SE, Whitehead RD, Magsumbol MS, Williams BL, Needham LL. Urinary concentration of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S. population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Environ Health Perspect.*, **118**, 742-748 (2010).
36. Ross MK, Borazjani A, Edwards CC, Potter PM. Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochem Pharmacol.*, **71**, 657-669 (2006).
37. Yang D, Pearce RE, Wang X, Gaedigk R, Wan YJ, Yan B. Human carboxylesterases HCE1 and HCE2: Ontogenic expression, inter-individual variability and differential hydrolysis of oseltamivir, aspirin, deltamethrin and permethrin. *Biochem Pharmacol.*, **77**, 238-247 (2009).
38. Jonghoon C, Randy LR, Ernest H. In vitro human metabolism of permethrin: the role of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Pestic. Biochem. and Phys.*, **73**, 117-128 (2002).
39. Scollon EJ, Starr JM, Godin SJ, DeVito MJ, Hughes MF. In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome p450 isoforms. *Drug metab*

Dispos., **37**, 221-228 (2009).

40. Rodrigues AD. Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.*, **57**, 465-480 (1999).

41. Olson KC, Dellinger RW, Zhong Q, Sun D, Amin S, Spratt TE, Lazarus P. Functional characterization of low-prevalence missense polymorphisms in the UDP-glucuronosyltransferase 1A9 gene. *Drug metab Dispos.*, **37**, 1999-2007 (2009).

42. Takahashi H, Maruo Y, Mori A, Iwai M, Sato H, Takeuchi Y. Effect of D256N and Y483D on propofol glucuronidation by human uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransferase (UGT1A9). *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, **103**, 131-6 (2008).

43. Ahn KC, Kim HJ, McCoy MR, Gee SJ, Hammock BD. Immunoassays and Biosensors for Monitoring Environmental and Human Exposure to Pyrethroid Insecticides. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 2792-2802 (2011).

44. Bozina N, Bradamante V, Lovrić M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **60**, 217-242 (2009).

45. Rogers JF, Nafziger AN, Bertino JS Jr. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am. J. Med.*, **113**, 746-750 (2002).

46. Yoshida R, Sakaki M, Sato R, Haga T, Nagano E, Oshio H, Kamoshita K. S-53482-A new N-phenyl phthalimide herbicide. *Brighton Crop Prot. Conf. – Weeds*, 69-75 (1991).

47. Kawamura S, Kato T, Matsuo M, Sasaki M, Katsuda Y, Hoberman AM, 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 (1995).

48. Australia APVMA. Evaluation of the new active FLUMIOXAZIN in the product Pledge 500 WG Herbicide. (2003)
49. 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**, 305-12 (1999).
50. 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).
51. Crowell SR, Henderson WM, Kenneke JF, Fisher JW. Development and application of a physiologically based pharmacokinetic model for triadimefon and its metabolite triadimenol in rats and humans. *Toxicol Lett.*, **205**, 154-162 (2011).
52. Godin SJ, DeVito MJ, Hughes MF, Ross DG, Scollon EJ, Starr JM, Setzer RW, Conolly RB, Tornero-Velez R. Physiologically based pharmacokinetic modeling of deltamethrin: development of a rat and human diffusion-limited model. *Toxicol. Sci.*, **115**, 330-343 (2010).
53. Kim CS, Binienda Z, Sandberg JA. Construction of a physiologically based pharmacokinetic model for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dosimetry in the developing rabbit brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **136**, 250-259 (1996).
54. Lin Z, Fisher JW, Wang R, Ross MK, Filipov NM. Estimation of placental and lactational transfer and tissue distribution of atrazine and its main metabolites in rodent dams, fetuses, and

neonates with physiologically based pharmacokinetic modeling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **273**, 140-158 (2013).

55. Kawamoto Y, Matsuyama W, Wada M, Hishikawa J, Chan MP, Nakayama A, Morisawa S. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for bisphenol A in pregnant mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **224**, 182-191 (2007).

56. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol. Ind. Health*, **13**, 407-484 (1997).

57. O'Flaherty EJ, Scott W, Schreiner C, Beliles RP. A physiologically based kinetic model of rat and mouse gestation: disposition of a weak acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**, 245-256 (1992).

58. Naritomi Y, Terashita S, Kimura S, Suzuki A, Kagayama A, Sugiyama Y. Prediction of human hepatic clearance from *in vivo* animal experiments and *in vitro* metabolic studies with liver microsomes from animals and humans. *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 1316-1324 (2001).

59. Yoon M, Schroeter JD, Nong A, Taylor MD, Dorman DC, Andersen ME, Clewell HJ 3rd. Physiologically based pharmacokinetic modeling of fetal and neonatal manganese exposure in humans: describing manganese homeostasis during development. *Toxicol. Sci.*, **122**, 297-316 (2011).

60. Shankaran H, Adeshina F, Teeguarden JG. Physiologically-based pharmacokinetic model for Fentanyl in support of the development of Provisional Advisory Levels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **273**, 464-476 (2013).

61. Soars MG, Webborn PJ, Riley RJ. Impact of hepatic uptake transporters on pharmacokinetics and drug-drug interactions: use of assays and models for decision making in the pharmaceutical industry. *Mol. Pharm.*, **6**, 1662-1677 (2009).

62. Tanino T, Nawa A, Nakao M, Noda M, Fujiwara S, Iwaki M. Organic anion transporting polypeptide 2-mediated uptake of paclitaxel and 2'-ethylcarbonate-linked paclitaxel in freshly isolated rat hepatocytes. *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**, 1029-1035 (2009).
63. Watanabe T, Kusuhara H, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **328**, 652-662 (2009).
64. Prouillac C, Lecoœur S. The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1623-1635 (2010).
65. Vähäkangas K, Myllynen P. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br. J. Pharmacol.*, **158**, 665-678 (2009).
66. Myren M, Mose T, Mathiesen L, Knudsen LE. The human placenta--an alternative for studying foetal exposure. *Toxicol. In Vitro*, **21**, 1332-1340 (2007).
67. Vähäkangas K, Myllynen P. Experimental methods to study human transplacental exposure to genotoxic agents. *Mutat. Res.*, **608**, 129-135 (2006).
68. Grafmüller S, Manser P, Krug HF, Wick P, von Mandach U. Determination of the transport rate of xenobiotics and nanomaterials across the placenta using the ex vivo human placental perfusion model. *J. Vis. Exp.*, **76**, e50401 (2013).
69. Andrews CW, Bennett L, Yu LX. Predicting human oral bioavailability of a compound: development of a novel quantitative structure-bioavailability relationship. *Pharm. Res.*, **17**, 639-644 (2000).
70. Yamashita F, Wanchana S, Hashida M. Quantitative structure/property relationship analysis of Caco-2 permeability using a genetic algorithm-based partial least squares method. *J. Pharm. Sci.*, **91**,

2230-2239 (2002).

71. Smith PA, Sorich MJ, McKinnon RA, Miners JO. Pharmacophore and quantitative structure-activity relationship modeling: complementary approaches for the rationalization and prediction of UDP-glucuronosyltransferase 1A4 substrate selectivity. *J. Med. Chem.*, **46**, 1617-1626 (2003).

72. Hewitt M, Madden JC, Rowe PH, Cronin MT. Structure-based modelling in reproductive toxicology: (Q)SARs for the placental barrier. *SAR QSAR Environ. Res.*, **18**, 57-76 (2007).

73. Giaginis C, Zira A, Theocharis S, Tsantili-Kakoulidou A. Application of quantitative structure-activity relationships for modeling drug and chemical transport across the human placenta barrier: a multivariate data analysis approach. *J. Appl. Toxicol.*, **29**, 724-733 (2009).

74. Caritis SN, Sharma S, Venkataramanan R, Hankins GD, Miodovnik M, Hebert MF, Umans JG, Benedetti T, Mattison D, Zajicek A, Fischer D, Jackson A. Pharmacology and placental transport of 17-hydroxyprogesterone caproate in singleton gestation. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **207**, 398.e1-398.e8 (2012).

75. Chappuy H, Tréluyer JM, Jullien V, Dimet J, Rey E, Fouché M, Firtion G, Pons G, Mandelbrot L. Maternal-fetal transfer and amniotic fluid accumulation of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors in human immunodeficiency virus-infected pregnant women. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 4332-4336 (2004).

76. Sioufi A, Hillion D, Lumbroso P, Wainer R, Olivier-Martin M, Schoeller JP, Colussi D, Leroux F, Mangoni P. Oxprenolol placental transfer, plasma concentrations in newborns and passage into breast milk. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **18**, 453-456 (1984).

77. Ripamonti D, Cattaneo D, Maggiolo F, Airolidi M, Frigerio L, Bertuletti P, Ruggeri M, Suter F. Atazanavir plus low-dose ritonavir in pregnancy: pharmacokinetics and placental transfer. *AIDS*, **21**, 2409-2415 (2007).

78. Hutson, JR. Prediction of placental drug transfer using the human placental perfusion model. *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol.*, **18**, e533-543 (2011).
79. Gordon AL, Lopatko OV, Somogyi AA, Foster DJ, White JM. (R)- and (S)-methadone and buprenorphine concentration ratios in maternal and umbilical cord plasma following chronic maintenance dosing in pregnancy. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **70**, 895-902 (2010).
80. Winter SC, Linn LS, Helton E. Plasma carnitine concentrations in pregnancy, cord blood, and neonates and children. *Clin. Chim. Acta.*, **243**, 87-93 (1995).
81. Briggs GG, Freeman RK, Yaffe SJ. *Drugs in Pregnancy and Lactation*, 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers (2001).
82. Fukata H, Omori M, Osada H, Todaka E, Mori C. Necessity to measure PCBs and organochlorine pesticide concentrations in human umbilical cords for fetal exposure assessment. *Environ. Health Perspect.*, **113**, 297-303 (2005).
83. Whyatt RM, Barr DB, Camann DE, Kinney PL, Barr JR, Andrews HF, Hoepner LA, Garfinkel R, Hazi Y, Reyes A, Ramirez J, Cosme Y, Perera FP. Contemporary-use pesticides in personal air samples during pregnancy and blood samples at delivery among urban minority mothers and newborns. *Environ. Health Perspect.*, **111**, 749-756 (2003).
84. Boyce PM, Hackett LP, Ilett KF. Duloxetine transfer across the placenta during pregnancy and into milk during lactation. *Arch. Womens Ment. Health*, **14**, 169-172 (2011).
85. Morgan DJ, Cousins MJ, McQuillan D, Thomas J. Disposition and placental transfer of etidocaine in pregnancy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **12**, 359-365 (1977).
86. van Hoog S, Boer K, Nellen J, Scherpbier H, Godfried MH. Transplacental passage of nevirapine, nelfinavir and lopinavir. *Neth. J. Med.*, **70**, 102-103 (2012).
87. Hirt D, Urien S, Jullien V, Firtion G, Chappuy H, Rey E, Pons G, Mandelbrot L, Treluyer JM. Pharmacokinetic modelling of the placental transfer of nelfinavir and its M8 metabolite: a population

- study using 75 maternal-cord plasma samples. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **64**, 634-644 (2007).
88. Silberschmidt AL, Kühn-Velten WN, Juon AM, Zimmermann R, von Mandach U. Nifedipine concentration in maternal and umbilical cord blood after nifedipine gastrointestinal therapeutic system for tocolysis. *BJOG*, **115**, 480-485. (2008).
89. Ngan Kee WD, Khaw KS, Ma KC, Wong AS, Lee BB, Ng FF. Maternal and neonatal effects of remifentanyl at induction of general anesthesia for cesarean delivery: a randomized, double-blind, controlled trial. *Anesthesiology*, **104**, 14-20 (2006).
90. Yap CW. PaDEL-descriptor: an open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. *J. Comput. Chem.*, **32**, 1466-1474 (2011).
91. Galvez J, Garcia R, Salabert MT, Soler, R. Charge Indexes. New Topological Descriptors. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, **34**, 520-525 (1994).
92. Ertl P, Rohde B, Selzer P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem.*, **43**, 3714-3717 (2000).
93. Kier LB, Hall LH. An electrotopological-state index for atoms in molecules. *Pharm. Res.*, **7**, 801-807 (1990).
94. Platts JA, Butina D, Abraham MH, Hersey A. Estimation of Molecular Linear Free Energy Relation Descriptors Using a Group Contribution Approach. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **39**, 835-845 (1999).
95. Moreau G, Broto P. The autocorrelation of a topological structure: A new molecular descriptor. *Nouv. J. Chim.*, **4**, 359-360 (1980).
96. Hughesa AW, King ML. Model selection using AIC in the presence of one-sided information. *J. Statist. Plann. Infer.*, **115**, 397-411 (2003).
97. Roy PP, Paul S, Mitra I, Roy K. On Two Novel Parameters for Validation of Predictive QSAR

Models. *Molecules*, **14**, 1660-1701 (2009).

98. Votano JR, Parham M, Hall LH, Kier LB, Oloff S, Tropsha A, Xie Q, Tong W. Three new consensus QSAR models for the prediction of Ames genotoxicity. *Mutagenesis*, **19**, 365-377 (2004).

99. Peticca P, Raymond A, Gruslin A, Cousins M, Adetola E, Abujrad H, Mayne J, Ooi TC. Human Serum PCSK9 Is Elevated at Parturition in Comparison to Nonpregnant Subjects While Serum PCSK9 from Umbilical Cord Blood is Lower Compared to Maternal Blood. *ISRN Endocrinol.*, **2013**, 341632 (2013).

100. Rubinchik-Stern M, Eyal S. Drug Interactions at the Human Placenta: What is the Evidence? *Front. Pharmacol.*, **3**, 126 (2012).

101. Utoguchi N, Audus KL. Carrier-mediated transport of valproic acid in BeWo cells, a human trophoblast cell line. *Int. J. Pharm.*, **195**, 115-124 (2000).

102. Mishra NK, Chang J, Zhao PX. Prediction of Membrane Transport Proteins and Their Substrate Specificities Using Primary Sequence Information. *PLoS ONE*, **9**, e100278 (2014).