

令和2年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質の  
ヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発  
(H30-化学-指定-005)

分担研究報告書

化学物質の体内動態予測システムの基盤整備と IATA への適用に関する研究

研究分担者 石田 誠一 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長  
研究協力者 吉田 喜久雄 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 研究員  
研究協力者 松本 さおり 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 研究員  
研究協力者 山田 隆志 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 室長

研究要旨

化学物質の有害性は、標的部位への到達量や反応性代謝物の生成量等に依存するため、量-反応評価での体内動態の考慮が重要である。本年度は、エチル *tert*-ブチルエーテル (ETBE) を検討物質として、昨年度に作成したモデルパラメータ・データベース (DB) のデータを基に回帰式を得て、ETBE のモデルパラメータの値とそれらの不確かさを推定した。これらの推定値を用いて ETBE のヒト血中濃度を Monte Carlo-PBPK モデルで 95%信頼区間とともに推定し、測定値と比較するとともに、推定された内部曝露指標 ( $C_{max}$ 、AUC) の感度と不確実性を解析した。測定値は全て推定血中濃度の信頼区間内に入ったが、2 倍程度過大推定であった。一方、曝露後の血中半減期は、測定値とほぼ同レベルであった。また、感度と不確実性の分析結果から、推定値を用いて PBPK モデルで計算された内部曝露指標の信頼性は  $C_{max}$  で高、AUC で中程度と判定された。以上の結果から、*in silico* 推定法は、生理学的薬物動力学 (PBPK) モデルパラメータ補充に利用可能と示唆された。また、OECD で整備中のガイダンスのケーススタディで検討された 10 物質のラット血中濃度を PBPK モデルで計算の結果、ケーススタディでの報告値と良い一致が見られ、*in vitro* 試験の最低影響濃度から *in vitro-in vivo* 外挿した各物質の経口用量も、ほぼ再現できた。Monte Carlo 法による定量的な信頼性評価は、*in vitro-in vivo* 外挿 (IVIVE) における PBPK モデルによる”reverse dosimetry”導入の妥当性の判定を容易にすると考えられた。

A. 研究目的

有害性情報がない化学物質の健康リスク評価の実施が大きな課題となっている。また、動物福祉の観点から動物毒性試験削減

の流れも着実に進んでいる。

定量的構造活性相関 (QSAR) やカテゴリーアプローチが、動物試験を行わずに、短期間で多物質について推定できる代替法とし

て有害性評価での活用が検討されている。

化学物質の有害性は、その標的器官・組織への化学物質の到達用量や反応性代謝物の生成量等に大きく依存するため、同一カテゴリーの物質であっても無影響量 (NOEL) 等の有害性指標を推定する際には体内動態を考慮することが重要である。

本研究は、その体内動態を PBPK モデルで推定し、得られる標的組織中濃度およびその最大値 ( $C_{max}$ ) や濃度時間曲線下面積 (AUC) 等の内部曝露指標 (internal dose metrics) をカテゴリーアプローチで考慮することで、より適切な量-反応評価を可能にすることを目指す。

本年度は、PBPK モデルに必要なパラメータ (血液/空気および組織/血液の間の分配係数、代謝に関する  $V_{max}$  と  $K_m$ ) の *in silico* 推定値を用いてヒトでの化学物質の動態を推定し、既報の情報と比較して、*in silico* パラメータ推定法の有用性を評価した。

検討対象物質には、含酸素ガソリン添加剤である ETBE を選定し、昨年度に作成した PBPK モデルパラメータ DB から ETBE と同一カテゴリーの物質を抽出するなどして、ヒトに対するパラメータ値と物性値や構造情報との回帰式を得た。これらの相関式で推定された ETBE の分配係数と代謝パラメータの値を用い PBPK モデルによりヒトでの血中濃度-時間プロファイルを推定し、測定値と比較した。さらに、モデルで推定された内部曝露指標 ( $C_{max}$ 、AUC) の感度と不確実性を解析した。

また、OECD で整備中のガイダンスのケーススタディに採用された *in silico* 体内動態推定モデルに関する検討も行った。

## B. 研究方法

### B.1. ETBE のモデルパラメータ値の推定

ETBE と同様に、分子間相互作用として van der Waals 力と双極子-双極子相互作用が主に寄与する脂肪族系の含酸素物質を PBPK モデルパラメータ DB から抽出した。その中でヒトの分配係数値が DB にある物質に対して、血液/空気 ( $P_{ba}$ )、肝臓/血液 ( $P_{lb}$ )、脂肪/血液 ( $P_{fb}$ )、高血流組織/血液 ( $P_{rb}$ )、低血流組織 ( $P_{sb}$ ) の各分配係数の対数値とヘンリー則定数 (Henry) またはオクタノール/水分配係数 ( $\log D, pH7.4$ ) の間の線型回帰式を得た。そして、ETBE の Henry と  $\log D$  の値を線型回帰式に代入し、ETBE の各分配係数の値をそれらの 95%信頼区間とともに推定した。

ヒトの代謝パラメータ ( $V_{max}$  と  $K_m$ ) もモデルパラメータ DB から同様に抽出したが、値が利用可能な物質が少なかったため、脂肪族と芳香族の炭化水素、ハロゲン化炭化水素およびエーテル結合を有する物質をまとめて、それらの  $V_{max}$ 、 $K_m$  と分子構造フラグメントの数の間の重回帰分析で分子構造フラグメントの寄与率を求めた。

$$\log M = \sum_i C_i \cdot f_i$$

ここで、 $M$  は  $V_{max}$  または  $K_m$ 、 $C_i$  と  $f_i$  は、分子構造フラグメントの寄与率と出現数である。分子構造フラグメントは、ベンゼン環、ベンゼン環水素、炭素-炭素二重結合、二重結合炭素に結合する水素、メチル基、メチレン基、メチン基、4級炭素、フッ素、塩素、臭素およびエーテル基とした。ETBE の各分子構造フラグメント出現数を重回帰式に代入し、ETBE の  $V_{max}$  と  $K_m$  の値とそれらの 95%信頼区間を推定した。

## B.2. PBPK モデルによる体内動態の推定

ETBE のヒトでの体内動態推定のため、肺、肝臓、脂肪、高血流組織、低血流組織、消化管、動脈血および静脈血の各コンパートメントから成る Ramsey & Andersen 型の PBPK モデル (図 1) を作成した (モデルの予測能は、Marchand et al. (2015)でのトルエンと *m*-キシレンのヒト吸入曝露試験と Clewell et al. (2001)での *iso*-プロパノールのヒト投与試験の結果で確認)。さらに、モデルパラメータ推定値の不確かさも含めて定量的に解析するために、Monte Carlo 法でシミュレーションを行った。シミュレーションでは、Nihlén, et al. (1998)によるヒト曝露試験での測定血中濃度と比較するために、5、25、50 ppm の ETBE を 2 時間、軽い運動 (50 W) 中に曝露し、その後 4 時間運動しない状態での血中 ETBE 濃度を推定した。Monte Carlo シミュレーションでは、分配係数と代謝パラメータの全ての値の確率密度関数を対数正規分布、計算の繰り返しを 1000 回とし、濃度-時間プロファイルの中央値と 95 パーセント信頼限界値を得た。そして、Nihlén らの測定値と比較し、推定結果の妥当性を評価した。

さらに、肝臓、腎臓、副腎、卵巣/精巣、脂肪、高血流組織、低血流組織および血液の 8 コンパートメントから成るラット経口曝露用 PBPK モデル (図 2) を作成し、Acetaminophen、Bisphenol A、17  $\alpha$ -Ethinylestradiol 等 10 物質のラット血中最大濃度を計算し、OECD でのケーススタディ (Fabian et al, 2019)で使用された *in silico* 体内動態推定モデルによる計算結果と比較した。その際、モデルパラメータ、吸収速度定数等はケーススタディと同じ手法で推定した。

## B.3. 感度および不確実性の解析

量-反応評価で使用される内部曝露指標の  $C_{max}$  や AUC に及ぼす各分配係数と代謝パラメータの感度と不確実性の影響を、WHO (2010)の文書に従って判定するために、感度比と不確実性の指標を計算した。感度比の絶対値が 0.5 以上の場合、感度は高い、0.2~0.5 の場合は中程度、0.2 未満の場合は低いと判定した。また、不確実性の指標が 2 より大きい場合、不確実性が高い、0.3 から 2 の間の場合は中程度、0.3 以下の場合は低いと判定した。さらに、感度と不確実性の両判定結果から、PBPK モデルにより推定された  $C_{max}$  や AUC の信頼性を評価した。

(倫理面への配慮) 本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

## C. 研究結果

### C.1. ETBE のモデルパラメータ値の推定

ETBE と同じ分子間相互作用カテゴリーの 28 物質のヒトの  $P_{ba}$  の対数値と Henry の対数値の間の直線回帰式の補正済み決定係数は 0.88 であった (図 3)。一方、ヒトの  $P_{lb}$ 、 $P_{fb}$ 、 $P_{rb}$ 、 $P_{sb}$  の各分配係数の対数値と  $\log D$ 、pH7.4 の間の直線回帰式の補正済み決定係数はそれぞれ 0.65、0.82、0.60 および 0.64 であった。ETBE の Henry (166 Pa-m<sup>3</sup>/mol) と  $\log D$  (1.479)の値はいずれも、各線型回帰式の適用範囲内の値であった。これらの値から推定された  $P_{ba}$ 、 $P_{lb}$ 、 $P_{fb}$ 、 $P_{rb}$ 、 $P_{sb}$  値はそれぞれ、16、1.4、18、1.4 および 1.5 であり、Nihlén et al. (1999)によるヒトでの測定値や推定値の 0.6~1.5 倍の値であった。

一方、 $V_{max}$  および  $K_m$  と構造フラグメント数の間の重回帰式の補正済み決定係数はそれ

ぞれ、0.80 と 0.60 であった。重回帰分析で得られた構造フラグメントの寄与率と ETBE での構造フラグメントの出現数から、 $V_{\max}$  と  $K_m$  はそれぞれ、 $29.6 \mu\text{mol/hr/kg}$  および  $10.7 \mu\text{M}$  と推定された。これらの値はラット PBPK モデル (Borghoff et al., 2016) で使用された  $V_{\max}$  ( $499 \mu\text{mol/hr/kg}$ ) および  $K_m$  ( $1248 \mu\text{M}$ ) に比べるとかなり小さい値であった。

### C.2. PBPK モデルによる体内動態の推定

ETBE の血中濃度推定値の 95%信頼区間は、曝露期間中では推定中央値の 1/2~2 倍程度であったが、曝露終了 240 分後では 95%信頼区間は中央値の 1/5~5 倍程度であった。Nihlén et al. (1998) の測定値はいずれの曝露濃度でも、95%信頼区間内であったが、血中濃度は全体的に 2 倍程度過大推定の傾向にあった。また、曝露後の推定血中濃度は 2 相性で消失し、算出された半減期は、Nihlén et al. (1998) が報告している第 2 相と第 3 相の半減期の値とほぼ同じレベルであった。

OECD のケーススタディで報告された 10 物質のラット血中濃度を作成した PBPK モデルで計算し、比較した結果、ケーススタディの値と良く一致した。さらに、モデルで推定された投与量と血中濃度の関係を基に内分泌かく乱関連の *in vitro* の試験の最低影響濃度から外挿した各物質の *in vivo* の経口用量も、ケーススタディの値とほぼ一致した。

### C.3. 感度および不確実性の解析

50 ppm の ETBE 吸入曝露に対して推定された  $C_{\max}$  と AUC の分配係数と代謝パラメータによる不確実性とこれらのパラメータに対する感度の分析した結果、 $P_{ba}$  の  $C_{\max}$  へ

の感度は高かったが、他の分配係数と代謝パラメータへの  $C_{\max}$  の感度は低いと判定された。また、全ての分配係数と代謝パラメータによる  $C_{\max}$  の不確実性も低いと判定された。一方、AUC の感度は、 $P_{ba}$  に対して高く、 $V_{\max}$  に対して中程度、他の分配係数と  $K_m$  に対しては低いと判定された。また、AUC に対する不確実性は  $P_{ba}$ 、 $V_{\max}$ 、 $K_m$  では中程度で、他のパラメータでは低いと判定された。以上の感度および不確実性の分析結果から、*in silico* 法で推定されたパラメータ値を用いて PBPK モデルで計算された ETBE の  $C_{\max}$  の信頼性は高、AUC の信頼性は中程度と判定された。

### D. 考察

*In silico* 法で推定された分配係数と代謝パラメータを用いて計算された ETBE のヒト血中濃度-時間プロファイルと曝露後の血中濃度の半減期は、測定値と大きく異ならず、*in silico* 推定法が、PBPK モデルパラメータの補完に利用できる可能性を示した。

パラメータ推定値が濃度-時間プロファイルや内部曝露指標に及ぼす感度と不確実性を定量的に評価することで、より精緻化が必要なパラメータの有無や種類を明確にすることができる。今回の ETBE では、濃度と AUC は  $P_{ba}$  に対して高感度と判定された。このような場合には可能であれば、他の推定法も併用する等して、値の妥当性を重み付けることが有効と思われる。今回推定した  $P_{ba}$  値は、Nihlén et al. (1999) の測定値に比べて 1.3 倍高く、測定値よりも高い血中濃度を推定した要因の 1 つと考えられる。

$V_{\max}$  と  $K_m$  の推定値の不確かさは、分配係数に比べて 1 桁大きかったが、濃度-時間

プロフィール等には不確実性はそのまま伝播されることはなく、累積の内部曝露指標である AUC で、 $V_{max}$  と  $K_m$  の不確かさが若干累積され、不確かさは中程度と判定された。このような不確かさと感度の状況は、分配係数の場合と同様に、物質ごとに異なると考えられるので、*in silico* 法による補完時には、不確かさと感度を定量的解析し、PBPK モデルを使用する目的に合った信頼性を有することを確認することが重要であろう。また、 $V_{max}$  と  $K_m$  の推定に、構造フラグメントを用いた Free-Wilson 法を適用できる可能性があると思われる結果を得たが、*in vivo* の  $V_{max}$  と  $K_m$  は既報値が少なく、今後も大幅な増加は期待できないため、これらのパラメータ値の補完には、*in vitro* 試験等の別のアプローチがより有効と思われる。

PBPK モデルは、吸入曝露濃度や経口摂取量からヒトや実験動物での内部曝露指標を推定する”forward dosimetry”だけでなく、*in vitro* 試験濃度を *in vivo* 投与等価量に変換する”reverse dosimetry”にも適用可能なことを示唆している。これにより、PBPK モデルは今後ますます一般化学物質の有害性情報の補完においても重要な位置を占めると考えられる。

## E. 結論

体内動態予測システムの基盤整備では、PBPK モデルが”forward dosimetry”および”reverse dosimetry”に有用であることを示した。これらの推定には、PBPK モデルのパラメータの欠損値を適切かつに迅速に推定できるか否かが重要となる。QSAR やカテゴリーアプローチは有望な *in silico* 推定法ではあるが、推定に伴う不確かさが PBPK モデル

計算の結果まで伝播される懸念もある。しかし、PBPK モデルによる体内動態の推定に Monte Carlo シミュレーションを組み込むことにより、*in silico*-PBPK 法による体内動態推定の信頼性評価が可能であることが示唆された。このような定量的な信頼性評価は、IVIVE における PBPK モデルによる”reverse dosimetry”導入の妥当性の判定を容易にすると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 環境化学物質の生理学的薬物動力学 (PBPK) モデリングで使用されるパラメータの構造特異的な特性の評価, 吉田 喜久雄, 明関 由里子, 松本 さおり, 石田 誠一, 山田 隆志, 第47回日本毒性学会学術大会 (2020年6月 Online)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

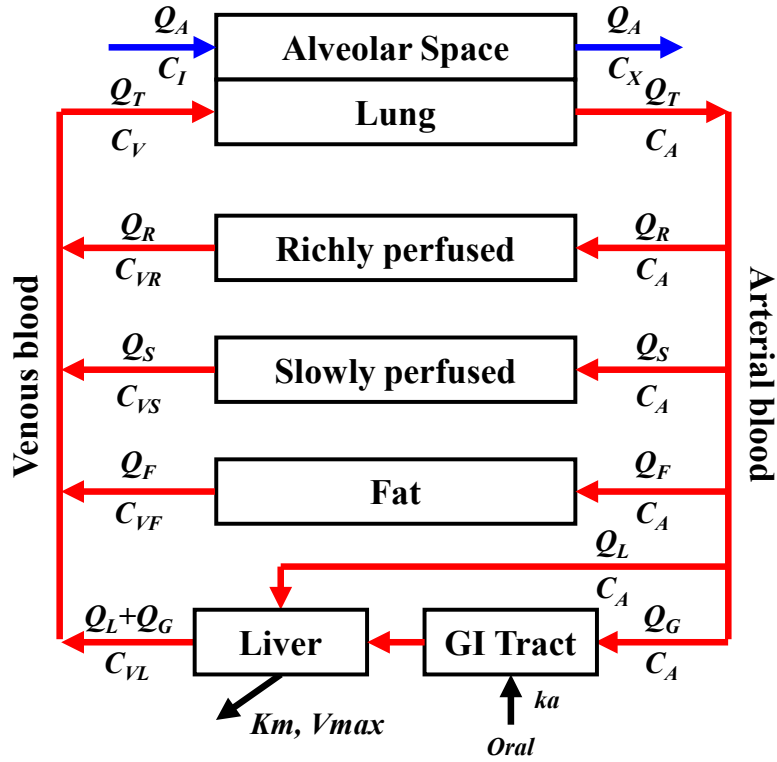


図1 ETBE の検討に使用した Ramsey & Andersen 型の PBPK モデルの構造

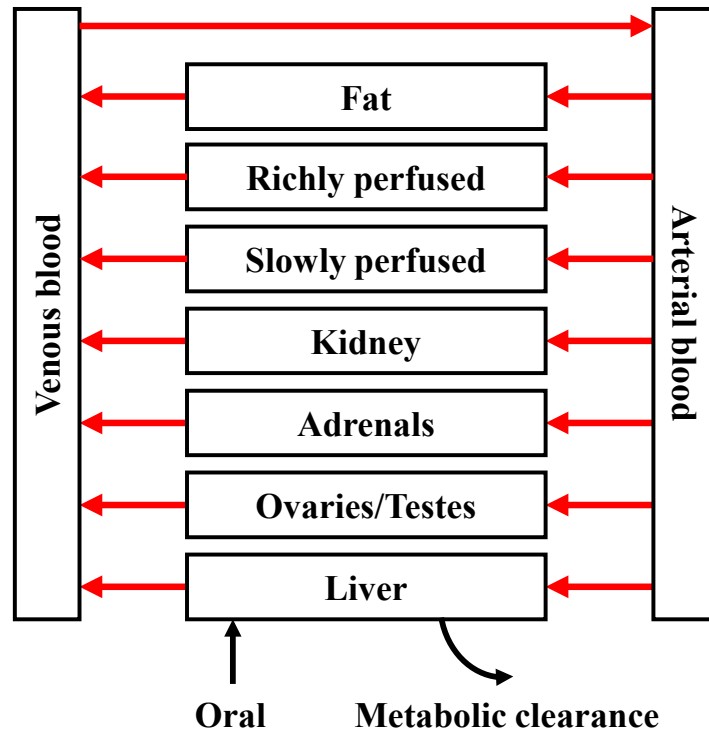


図2 OECD のケーススタディ検討用の PBPK モデルの構造

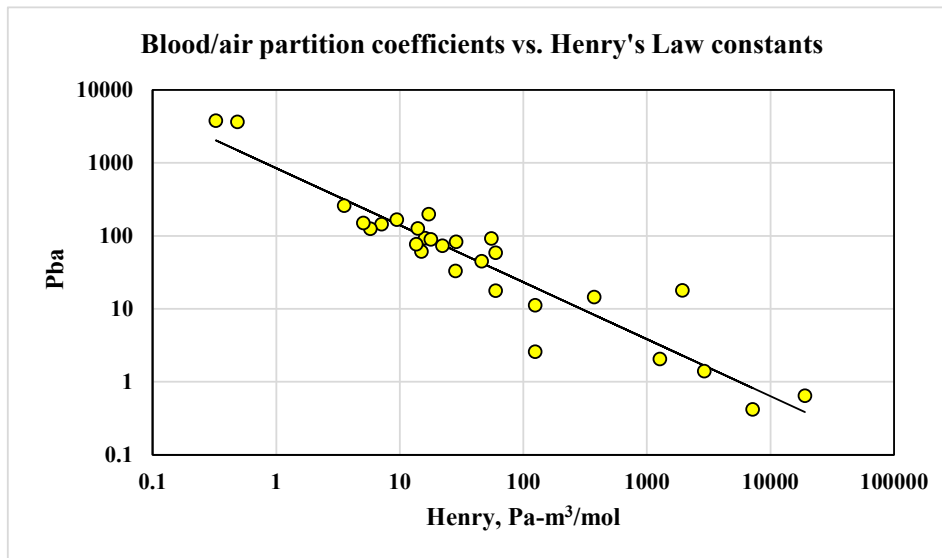


図3 血液/空気分配係数とヘンリー則定数の相関

表1 吸入曝露中および曝露後のヒトの血液と組織中での濃度変化の比較

Chemical	Dose, mg/kg	$C_{max}$ , $\mu\text{M}$		
		Measured <i>in vivo</i>	Calculated	
			Fabian et al.	This study
Acetaminophen	5	6.6 ± 1.9	6.8	6.7
	200	309 ± 169	272	267
Bisphenol A	10	0.2	7	6.8
	100	10	70	68
Caffeine	1	1.7 ± 0.8	3.9	3.8
17 $\alpha$ Ethynylestradiol	1	0.0034	0.0078	0.0077
Genistein	154	0.7 ± 0.1	40	41
	308	1.1 ± 0.2	80	82
	40	9.6 ± 0.024	10	10.6
Ketoconazole	10	6.2 ± 3.6	2.6	2.5
	10	2.9 ± 1.7	2.6	2.5