

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
*In silico*予測手法の高度化とNew Approach Methodologyの活用に基づく化学物質の統合的
ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究

令和4年度 分担研究報告書

***In vitro-in vivo*外挿（IVIVE）用の生理学的動力学（PBK）モデル構築のための
基盤整備に関する研究**

研究分担者	松本真理子	国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部	主任研究官
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	
研究協力者	馬野 高昭	国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部	
研究協力者	磯 貴子	国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部	
研究協力者	村田 康允	国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部	
研究協力者	広瀬 望	国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部	
研究協力者	小野 敦	国立大学法人岡山大学 学術研究院 医歯薬学域	
研究協力者	加来田博貴	国立大学法人岡山大学 学術研究院 医歯薬学域	
研究協力者	児玉 進	国立大学法人岡山大学 学術研究院 医歯薬学域	

研究要旨

欧米で活発に検討されている *in vitro-in vivo* 外挿（IVIVE）の実用性について検討した。この検討は多岐に亘るため、昨年度は、1) IVIVE に使用される PBK モデルの解析とそれらを用いた IVIVE 論文のトレース、2) IVIVE 用 PBK モデルに必要なパラメータ値の整備に関する調査、3) IVIVE の予備的な試行について検討した。本年度は、経口摂取後の化学物質が、血流により肝臓、脂肪、腎臓等のコンパートメントに輸送・分配されるとともに、肝代謝と腎排泄により消失すると想定した汎用マウス PBK モデルを作成し、bisphenol A 単回投与時のマウス血中濃度のモデル推定値が実験データと一致することを確認した。PBK モデルパラメータ値のうち腸管吸収に係るパラメータを得ることを目的として Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験及び PBK モデルに必要な代謝クリアランスに係るパラメータを得ることを目的としてマウス肝臓 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝安定性試験を実施した。細胞膜透過性試験では、指標化合物 1 物質及び被験物質 5 物質について透過係数（Papp）の算出を実施したが試験系の妥当性が確保できなかったため腸管吸収に関する有用なパラメータを得ることはできなかった。一方、代謝安定性試験では 1 物質のみであるが 4- α -cumylphenol の肝クリアランスについてのパラメータを得ることができた。さらに、4- α -cumylphenol の PBK モデルパラメータ値を *in vitro* および *in silico* 手法で決定し、*in vitro* アッセイ濃度と等価な *in vivo* 影響用量への換算係数をモデルで求めた。この換算係数を用い、エストロゲン受容体（ER）アゴニスト活性に関する *in vitro* アッセイの AC₅₀ 値や ACC 値から外挿した等価 *in vivo* 影響用量は、マウスの子宮肥大試験の NOEL や LOEL の値と大きな相違はなく *in vitro* アッセイデータの IVIVE は有用と思われた。次年度は、さらに検討物質を増やし、*in vitro* 測定や *in silico* 推定によりパラメータ値を整備して IVIVE を実施し、子宮肥大影響評価における IVIVE の実用性を検討する。

A. 研究目的

現在、多数の化学物質が安全性未評価のまま流通しており、それらのリスク管理は世界的な課題である。化学物質規制に関わる国際機関や諸外国の規制当局は、リスク評価の迅速化・効率化のために、*in silico* 手法等の利用促進を図っているが、ヒト健康リスク評価での利用は限定的である。定量的構造活性相関 (QSAR) は、ICHM7 ガイドラインに基づいた医薬品不純物の遺伝毒性評価で利用されるようになったが、化学物質規制での利用拡大には、高品質データセットの使用、モデル予測精度の更なる向上、予測結果の信頼性評価法等、手法の高度化が必要である。

また、動物福祉は国際的に大きな流れとなっており、動物試験の段階的削減は不可避である。有害性評価において、New Approach Methodology (NAM) は、*toxicokinetics* や *toxicodynamics* を包含する動物不使用の *in silico*, *in vitro* 等のアプローチを統合して利用することにより、ヒト健康リスク評価の信頼性の向上が期待されている。諸外国の規制当局は、新規動物試験を最小限に抑え、NAM の活用を促進するビジョンやロードマップを近年相次いで公表している。一方で、NAM データを活用した有害性評価の行政受け入れは未だ限定的で、ケーススタディで信頼性や規制上のニーズを満たし得ることの概念実証が求められる。さらに、NAM 受け入れ促進のため、その知識をリスク評価関係者が共有する必要がある。

本研究では、化学物質の体内動態を推定する生理学的動力学 (PBK) モデルを利用した *in vitro*-*in vivo* 外挿 (IVIVE) が欧米で活発に研究されていることを考慮し、この手法の実用性について検討する。

IVIVE は、*in vitro* アッセイ試験液中遊離

態濃度と等価な血中濃度の推定、PBK モデルによる等価血中濃度と投与量の関係の推定、さらに等価響量用量の推定を含み、実用性の評価には多岐に亘る検討が必要であり、昨年度は、使用される PBK モデルとそれらを用いた IVIVE 論文のトレース、モデルパラメータ値の整備に関する調査および IVIVE の予備的試行を行った。その結果、調査した PBK モデルは血中濃度を適切に推定できるが、モデルパラメータの中には *in vitro* 肝クリアランスのように、既存のオンラインデータベースや推定ツールの値と既報文献値の間に大きなバラツキが存在するものもあることが明らかになった。しかし、これらのデータベースや推定ツールの値で IVIVE の試行の結果、現状で IVIVE の試行は可能と判断された。

そこで、本年度は、エストロゲン受容体 (ER) アゴニスト活性に関する既報の *in vitro* アッセイの結果から IVIVE でアッセイ濃度と等価な *in vivo* 影響用量を推定し、国衛研が保有しているマウスの子宮肥大試験結果との比較を試み、内分泌かく乱影響評価への適用性を検討した。また、この検討に際しては、IVIVE に適用可能な汎用的なマウス PBK モデルを構築し、*in vitro* および *in silico* 手法で決定したパラメータ値を使用した。

B. 研究方法

昨年度に実施した調査および検討の結果と今年度に新たに得られた文献情報を基に、IVIVE に適用する汎用的なマウス PBK モデルを構築し、既報のマウス血中濃度の時間変化と比較することにより、モデルの検証を行った。さらに、*in vitro* および *in silico* の手法で整備したモデルパラメータ値を用いて、ER アゴニスト活性に関する *in vitro* アッ

セイの濃度を等価な*in vivo*影響用量に外挿するための換算係数をモデルで算出した。そして換算係数を用いて、*in vitro*アッセイのAC₅₀とACC値を等価な影響用量を外挿し、マウスの子宮肥大試験結果と比較し、評価した。

B.1. 汎用マウスPBKモデルの構築

マウス PBK モデルは、今後、様々な物質に適用する可能性があることを考慮して、汎用的なモデルとした。マウスの身体は、血液、脂肪、高血流組織、低血流組織、腎臓、肝臓の代表的な 6 コンパートメントで構成し、経口摂取した化学物質は消化管から吸収され、肝臓を経由して血流により全身の各コンパートメントに輸送・分配されるとともに、肝臓で代謝され、また腎臓から排泄されると想定して、R 言語でモデルをコード化した。

体重、組織重量、血流量等の生理学的パラメータはマウスに特異的な値を採用したが、化学物質に固有のパラメータについては情報がほとんど得られない（特にマウスに対して）ため、それらのパラメータ値は以下のように整備した。

- ・組織と血液間の分配係数：オクタノール/水分配係数 (Kow) で推定されるラットに対する値を代用
- ・消化管からの吸収速度定数：Caco-2 透過係数 (*in vitro* 測定値または *in silico* 推定値) から算出
- ・肝クリアランス：*in vitro* で測定または *in silico* で推定される S9、肝細胞または肝ミクロソームでのクリアランスから計算
- ・腎クリアランス：血漿蛋白質非結合割合 (*in vitro* 測定値または *in silico* 推定値)、尿細管再吸収率 (Kow から計算) 等から

計算

作成したモデルを用いて、bisphenol A (BPA) を 0.4 mg/kg および 100 mg/kg でマウスに単回経口投与した場合の血中濃度の投与後 30 分～6 時間までの変化を計算し、CD1 マウスでの実験結果 (Taylor et al., 2011) と比較した。計算に際して、組織/血液分配係数、Caco-2 透過係数、ミクロソームでの *in vitro* クリアランスおよび血漿蛋白質非結合割合はラットに対する値を代用した。組織/血液分配係数以外は測定値であり、ミクロソームでのクリアランスは、フェーズ I の NADPH 依存性反応に加えて、フェーズ II のグルクロン酸抱合と硫酸抱合も含む総クリアランス測定値である。

さらに各組織/血液分配係数、血漿蛋白質非結合割合、*in vitro* ミクロソームクリアランス、Caco-2 透過係数等の単回経口投与時の BPA の血中最高濃度に及ぼす感度を解析した。

B.2. *in vitro*試験によるPBKモデルパラメータ値の整備

国立大学法人岡山大学において、PBK モデルに必要な腸管吸収に係るパラメータを得ることを目的として Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験及び PBK モデルに必要な代謝クリアランスに係るパラメータを得ることを目的としてマウス肝臓 S9 画分を用いた *In vitro* 代謝安定性試験を実施した。

被験物質は、ER アゴニスト活性に関する既報の *in vivo* 及び *in vitro* アッセイ両方のデータがある物質とした。具体的には、*in vivo* アッセイとして国衛研が保有しているマウスを用いた経口投与による子宮肥大試験、これと関連する *In vitro* アッセイとして ER レポーター遺伝子アッセイのア

ゴニスト活性評価系に相当するハイスクリーンアップスクリーニング (HTS) アッセイである Tox21_Era_BLA_Agonist_ratio および/あるいは Tox21_Era_LUC_VM7_Agonist として下表に示す 12 物質を選定した。

表 1 被験物質

化学物質	CAS
4-Alpha-cumylphenol	599-64-4
Daidzein	486-66-8
Dicumyl peroxide	80-43-3
4-Hydroxybiphenyl	92-69-3
Phenolphthalein	77-09-8
2-Cyano-3,3'-diphenylacrylic acid ethyl ester	5232-99-5
Nordihydroguaiaretic acid	500-38-9
1,1,1-Tris(4-hydroxyphenyl)-ethane	27955-94-8
4,4'-Thiodianiline	139-65-1
N,N-Diphenyl-p-phenylenediamine	74-31-7
Cinnamic acid, phenethyl ester	103-53-7
Triphenyl phosphate	115-86-6

・Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験

対象物質は、被験物質 12 物質及び試験系の検証のため FDA ガイダンスで透過クラスが明記されている指標化合物のうち 3 物質 (透過性高: phenytoin (CAS 57-41-0), 透過性中: furosemide (CAS 54-31-9), 透過性低: chlorothiazide (CAS 58-94-6)) の計 15 物質とした。Caco-2 単層膜は岡山大学で保有する Caco-2 細胞から作成した。細胞の健全性を確認するため実験開始前後に経上皮電気抵抗 (TEER) を測定し TEER が 1,100 Ω 以上のチャンバーを実験に用いた。細胞

膜透過性試験に先立ち、UV-吸収測定、LC/MS/MS 測定のための測定条件プロトコル作成、MeOH 及び DMSO による溶解度試験を実施した。溶解度試験において溶解性に問題があった 4 物質 (dicumyl peroxide, N,N-diphenyl-p-phenylenediamine, cinnamic acid, phenethyl ester, triphenyl phosphate) を除く 11 物質について細胞膜透過性試験を実施した。このうち指標化合物 1 物質 (phenytoin) と被験物質 5 物質 (4-alpha-cumylphenol, 4-hydroxybiphenyl, phenolphthalein, 2-cyano-3,3'-diphenylacrylic acid ethyl ester, nordihydroguaiaretic acid) の計 6 物質について化合物濃度を LC/MS/MS 装置にて測定して透過係数 (Papp) (cm/sec) を算出した。残り 5 物質についてはサンプリングまで実施したが濃度測定までは完了できなかった。

・マウス肝臓 S9 画分を用いた *In vitro* 代謝安定性試験

試験実施するに当たり、7-ethoxycoumarin (7EC) を薬物代謝第 1 相酵素の陽性対照基質に用いて解析諸条件を検討し、評価実施用プロトコルを確定した。次いで、Caco-2 細胞膜透過性試験において透過性が確認された被験物質 4-alpha-cumylphenol (4-CP) および phenolphthalein (PP) の 2 物質についてマウス肝臓 S9 画分及び第 1 相酵素 (NADPH 再生系) による代謝の有無確認、または代謝安定性試験を実施した。なお、陽性対照基質及び被験物質の残存量は、各々について条件プロトコルを作成したのち、LC/MS/MS 装置を用いて測定した。消失速度定数 (k_e) 及び *in vitro* 代謝クリアランス CL_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ -蛋白質) は、次の通り算出した。代謝安定性試験における基質の未変化体残存率 (y 軸、%) を反応時間 x 軸、min) に対して片対数プロットした。

この場合、各反応液の 0 min のピーク面積を 100%とし、各時点における割合を算出した。得られた直線の傾きを ke とした。次いで、マウス肝臓 S9 画分の CL_{int} は、下記の式により算出した。

$$CL_{int} = 1,000 \times ke \text{ S9 画分タンパク質濃度 (mg protein/mL)}$$

B.3. IVIVEの試行

4-CP を対象に ER アゴニスト活性に関する既報の *in vitro* アッセイの結果から IVIVE で等価な *in vivo* 影響用量を推定し、国衛研が保有しているマウスの子宮肥大試験結果との比較を試み、内分泌かく乱影響評価への適用性を検討した。

4-CP に固有の PBK モデルパラメータである脂肪、高血流組織、低血流組織、腎臓および肝臓の組織/血液分配係数はオクタノール/水分配係数 ($\log Kow = 4.07$) を基に DeJongh et al., (1997) の式で推定した。さらに、消化管からの化学物質の吸収速度定数は、オンライン推計ツール pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>) で推定した Caco-2 透過係数から算出し、肝クリアランスは、B.2 に記したように、*in vitro* で測定した S9 でのクリアランスの結果から算出した。また、血漿蛋白質非結合割合は、米国 EPA のオンラインデータベース CompTox Chemicals Dashboard (<https://comptox.epa.gov/dashboard/>) からヒトに対する *in vitro* での測定値を入手した。

整備した4-CPに特異的なパラメータ値を用い、汎用マウスPBKモデルで、単位経口投与量 (1 mg/kg/day) での血漿中非結合態のピーク濃度を推計し、IVIVEで等価な影響用量の推定に用いる換算係数を求めた。

IVIVEの対象とする*in vitro*アッセイデータとして、Tox21_ERa_BLA_Agonist_ratio

(AC_{50} : 10.37 μ M , ACC : 4.98 μ M) と Tox21_ERa_LUC_VM7_Agonist (AC_{50} : 0.67 μ M, ACC : 0.28 μ M) を選択し、マウスでの子宮肥大試験の結果 (NOEL: 300 mg/kg/day, LOEL: 1,000 mg/kg/day) と比較し、妥当性を評価した。なお、 AC_{50} は50%影響濃度、 ACC は有意な影響が見られる最小濃度である。

(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. 汎用マウスPBKモデルの構築

作成した汎用マウス PBK モデルを用い、ラットに対する BPA の組織/血液分配係数の推定値と Caco-2 透過係数、ミクロソームでのクリアランスおよび血漿蛋白質非結合割合の測定値をマウスに代用して推定した 0.4 mg/kg および 100 mg/kg で BPA を単回経口投与した場合の血漿中濃度の時間変化は、CD1 マウスでの測定濃度の 1/2 ~ 1.5 倍の範囲内で、良い一致を示した (BPA の血液/血漿比をヒトと同じ 1.05 と仮定)。

単回経口投与時の BPA の血中最高濃度に及ぼす感度に関する分析では、血中最高濃度は、*in vitro* ミクロソームクリアランスと Caco-2 透過係数に大きな感度があり、脂肪、高血流組織、低血流組織、腎臓および肝臓に対する組織/血液分配係数、血漿蛋白質非結合割合に対する感度は低かった。

C.2. *in vitro*試験によるPBKモデルパラメータ値の整備

- Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験
指標化合物 1 物質及び被験物質 5 物質について Papp 算出を実施した。その結果、指標化合物である phenytoin および被験物質

は 4-CP および PP について Caco-2 透過係数 (Papp) が下表のように算出された。他の 3 物質 (4-hydroxybiphenyl, 2-cyano-3,3'-diphenylacrylic acid ethyl ester, nordihydroguaiaretic acid) については検出限界以下のため測定値が得られず Papp は算出されなかった。

表 2 Papp ($\times 10^{-6}$ cm/sec)

Substance	sec	Ave. \pm SD
Phenytoin	900	1.94 \pm 0.24
	1,800	2.68 \pm 0.51
	3,600	2.98 \pm 0.39
	7,200	2.82 \pm 0.21
4-CP	900	N.D.
	1,800	0.019 \pm 0.004
	3,600	0.030 \pm 0.008
	7,200	0.033 \pm 0.018
PP	900	ND
	1,800	0.16 \pm 0.02
	3,600	0.26 \pm 0.02
	7,200	0.30 \pm 0.02

・マウス肝臓 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝安定性試験

陽性対照物質 7EC 及び被験物質 4-CP についてそれぞれの *ke* および *CLint* を算出した。7EC の *ke* は 0.406, それから求められた消失半減期 (*t* (1/2)) および *CLint* はそれぞれ 1.71 min および 406 μ L/min/mg-蛋白質であった。なお, NDAPH 再生系を添加しない場合 7EC の残存率は 95.3%であった。4-CP の *ke*, *t* (1/2)) および *CLint* はそれぞれ 0.117, 5.92 min および 117 μ L/min/mg-蛋白質であった。なお, NDAPH 再生系を添加しない場合 4-CP の残存率はばらつきが大きかったものの平均値は

102.5%であった。諸条件(濃度, 反応時間)は残存率と時間雄回帰式の線形性を十分に確保していた。なお, PP については, 測定装置 LC/MS/MS の不調などから *ke* および *CLint* の算出には至らなかった。

C.3. IVIVEの試行

log Kow を基に推定した 4-CP の脂肪, 高血流組織, 低血流組織, 腎臓および肝臓の組織/血液分配係数はそれぞれ, 148, 4.57, 1.15, 4.57 および 4.57 であった。また, Caco-2 透過係数推定値 (4.0×10^{-5} cm/s) から算出した消化管からの吸収の 1 次速度定数は 0.66/h で速やかに吸収されると推定された。また, S9 クリアランス測定値 (117 μ L/min/mg-蛋白質) から計算した肝クリアランスは 1.06 L/h で, ヒトでの血漿蛋白質非結合割合の測定値 (0.02) 等から算出した腎クリアランスは尿細管再吸収率が 1 のため, 4-CP の消失に寄与しないと推定された。

1 mg/kg/day で連続経口投与した場合に予想される血漿蛋白質非結合態の平均濃度は 0.00015 μ M (3.21×10^{-5} mg/L), ピーク濃度は 0.0063 μ M ($0.001.33 \times 10^{-3}$ mg/L) と算出された。さらに, ピーク濃度に基づく IVIVE 用換算係数は 160 mg/kg/day/ μ M (= 1 mg/kg/day/0.0063 μ M) と求められた。この換算係数から Tox21_ERa_BLA_Agonist_ratio と Tox21_ERa_LUC_VM7_Agonist の AC₅₀ 値から求めた等価の経口用量はそれぞれ, 1,660 および 107 mg/kg/day と外挿され, また, それぞれのアッセイの ACC 値から外挿された等価の経口用量はそれぞれ, 797 および 45 mg/kg/day であった。これらの等価経口用量は, マウスでの子宮肥大試験の NOEL と LOEL の値 (それぞれ, 300 と 1,000 mg/kg/day) と大きな相違はなかった。

D. 考察

2 投与レベルでの BPA のケースのみであるが、作成したマウス PBK モデルは、血中濃度の時間変化を再現した。使用した消化管吸収速度定数や肝クリアランスの値は、ラットに対する値であるが、ラットの値をマウスに代用することは PBK モデルの論文ではしばしば見られ、今回が特殊な事例ということはない。しかし、マウスと異なる生物種に対して得られる吸収速度定数や肝クリアランスを使用する場合は、PBK モデル計算結果や IVIVE の結果に不確実性が生じる可能性があることに注意が必要であるが、この不果実性の程度の定量化には、今後もマウス PBK モデルの検証が必要と考えられる。

Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験では、指標化合物とした 3 物質のうち高透過クラスの phenytoin 以外の物質では Papp が得られておらずこの試験の妥当性を確保できなかった。また、phenytoin の Papp 値についても文献値 26.9×10^{-6} cm/s (Yazdanian et al., 1998 referred in Hou et al., 2004) と比較して低い値であった。さらに、委託報告書には、透過試験後の薬液を LC/MS/MS 測定までの期間凍結にて保存したことにより化学物質の析出が認められ、LC/MS/MS での測定値が想定値よりも低く検出されたと報告されている。したがって、この試験で得られた Papp については、参考値として取り扱うことが望ましいと考えられる。一方、マウス S9 を用いた *in vitro* 代謝安定性試験については、陽性対照の 7EC のラットのクリアランスの文献値 (Carilile et al., 1998) をもとに両者を同じ肝臓 1 g 当たりのクリアランスで比較すると岡山大 2.12 L/h/g-liver, 文献値 : 0.97 L/h/g-liver となり 2 倍程度の差であり、4-CP のクリアランスについては、U.S.EPA の

CompTox Chemicals Dashboard に肝細胞 10^6 個当たりの *in vitro* クリアランスの測定値として、27.2 μ L/min/million hepatocytes があり、ラットの肝臓 1 g 中の細胞数 135×10^6 cells/g (Fabian et al., 2019) をもとに両者を同じ肝臓 1 g 当たりのクリアランスで比較すると岡山大 : 0.640 L/h/g-liver, U.S.EPA : 0.220 L/h/g-liver となり、3 倍弱であることから得られた試験データは妥当と考えられる。

4-CP, 1 物質のみであるが、2 種類の ER アゴニスト活性に関する *in vitro* アッセイのデータの AC_{50} 値や ACC 値から IVIVE で推定した等価の *in vivo* 影響用量はマウスの子宮肥大試験の NOEL や LOEL と大きくは異ならなかったことから、今回検討した外挿手法は妥当と思われるが、手法の妥当性を判断するには、さらに他の物質での検討が必要である。さらに検討の過程において *in vitro* で測定されたパラメータ値を用いて、*in silico* 推定法の検証も同時に行うことができる。*In silico* 手法の導入は将来的には、IVIVE 法に必須と考えられるため、この検証も大事である。

E. 結論

本年度の検討の結果、*in vitro* アッセイのデータからのマウスの子宮肥大試験の影響用量推定を IVIVE で試行することは可能と思われた。次年度は、既報物性値や *in silico* 手法による推定値を基に、さらに検討に供する物質を選定し、*in vitro* 測定や *in silico* 推定によりパラメータ値を整備するとともに、IVIVE を試行し、子宮肥大影響評価への適用の妥当性をさらに検討する。

F. 研究発表

F.1. 論文発表
なし

F.2 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 引用文献

Carlile, D.J, Stevens, A.J., Ashforth, E. L., Waghela, D., and Houston, J.B. (1998). *In Vivo* Clearance of Ethoxycoumarin and Its Prediction from; *In Vitro* Systems Use of Drug Depletion and Metabolite Formation Methods in Hepatic Microsomes and Isolated Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*. 26, 216-221.

DeJongh, J., Verhaar, H.J., and Hermens, J.L. (1997). A quantitative property-property relationship (QPPR) approach to estimate *in vitro* tissue-blood partition coefficients of organic chemicals in rats and humans. *Arch. Toxicol.* 72, 17-25.

Fabian, E., Gomes, C., Birk, B., Williford, T., Hernandez, T.R., Haase, C., Zbranek, R., van Ravenzwaay, B., and Landsiedel, R. (2019). *In vitro* to *in vivo* extrapolation (IVIVE) by

PBTK modeling for animal free risk assessment approaches of potential endocrine-disrupting compounds. *Arch. Toxicol.* 93, 401-416.

Hou, T.J., Zhang, K., Xia, W., Qiao, X.B., and Xu X.J. (2004). ADME Evaluation in Drug Discovery. 5. Correlation of Caco-2 Permeation with Simple Molecular Properties. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 44, 1585-1600.

Taylor, J.A., Vom Saal, F., Welshons, W.V., Drury, B., Rottinghaus, G., Hunt, P.A., Toutain, P-L., Laffont, C.M., and Vandervoort, C.A. (2011). Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: Relevance for human exposure. *Environ. Health Perspect.* 119, 422-430.

Yazdanian, M., Glynn, S.L., Wright, J.L., and Hawi, A. (1998). Correlating Partitioning and Caco-2 Cell Permeability of Structurally Diverse Small Molecular Weight Compounds. *Pharm. Res.* 15, 1490-1494.