

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5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	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、経口摂取後の化学物質のトキシコキネティクスを推定する汎用的なマウス PBK モデルを構築し、既報の実験データとの比較で検証を行った。並行して、腸管吸収と代謝クリアランスに係るモデル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およびマウス肝臓 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝安定性試験を実施し、試験の妥当性を評価した。さらに、*in vitro* および *in silico* 手法で決定したモデルパラメータ値を用いて、4- α -Cumylphenol (4-CP) について *in vitro* アッセイ濃度から *in vivo* 経口等価用量 (OED) への換算係数を構築したモデルで求め、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 値を OED に外挿した。算出した OED 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。以上を踏まえて本年度は、構築した汎用マウス PBK について汎用性の拡大を図ることとし、既存研究に関する調査結果に基づいて、対象生物種をラットおよびヒトに拡大し、構築したそれぞれの種のモデルを既報の実験データとの比較で検証した。並行して、昨年度に検討できなかった物質についてモデルパラメータ取得のため、ヒト結腸癌由来細胞 (Caco-2 細胞) を用いた細胞膜透過性試験および肝臓 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝安定性試験を継続した。さらに、*in vitro* 代謝安定性試験を実施した 6 物質の中の 4-CP, 4-Hydroxybiphenyl (HB), 2-Cyano-3,3'-diphenylacrylic acid ethyl ester (CE2), 1,1,1-tris(4-hydroxyphenyl)-ethane (THE) の 4 物質を対象に、既報の ER アゴニスト経路に関連する 14 の *in vitro* アッセイ結果から IVIVE でマウスの OED 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が可能な物質について比較を行い、内分泌かく乱影響評価への IVIVE の適用性を検討した。その結果、子宮肥大試験のエストロゲン様作用陽性物質 (4-CP, THE) および 陰性物質 (CE2) の OED と子宮肥大試験の NOAEL は概ね一致していた。しかし、陰性物質である 4-HB については OED が陽性判定に相当する数値を示した。

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、トキシコキネティクス (TK) やトキシコダイナミクス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、PBKモデルによる*in vitro*アッセイ試験液中遊離態濃度と等価な*in vivo*血中濃度および投与量の関係の推定、さらに経口等価用量(OED)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、IVIVEに適用する汎用的なマウスPBKモデルを構築し、既報の実験データとの比較で検証を行った。さらに、ヒト結腸癌由来細胞(Caco-2細胞)を用いた細胞膜透過性試験と肝臓S9画分を用いた*in vitro*代謝安定性試験を実施し、これらの試験や*in silico*手法で得たパラメータ値を用いて、ERアゴニスト活性に関する4-*alpha*-cumylphenol *in vitro*アッセイの濃度を等価な*in vivo*経口用量に外挿するための換算係数を構築したマウスモデルで算出した。この係数を用いて、等価な経口用量を算出し、マウスの子宮肥大試験結果と比較し、*in vitro*アッセイデータのIVIVEは有用であることを確認した。そして、本年度は、1) 昨年度に構築したマウスPBKモデルの汎用性向上に関する検討、2) 昨年度に未検討の

物質のモデルパラメータ取得のためのヒト結腸癌由来細胞(Caco-2細胞)を用いた細胞膜透過性試験および肝臓S9画分を用いた*in vitro*代謝安定性試験の継続、3) 複数物質に対するERアゴニスト経路に関連する14の*in vitro*アッセイでの影響濃度からマウスOEDへの外挿とマウスの子宮肥大試験結果との比較に基づく内分泌かく乱影響評価へのIVIVEの適用性の検討の各項目を実施した。

B. 研究方法

本年度は、昨年度に引き続きIVIVE関連の既存研究について調査を行い、その結果を参考にして、昨年度に構築・検証したマウスPBKモデルをIVIVEにおいてより汎用性があるモデルにするための検討を行った。また、Caco-2細胞を用いた細胞膜透過性試験および肝臓S9画分を用いた*in vitro*代謝安定性試験も引き続き実施し、昨年度に検討できなかった物質についてCaco-2膜透過係数(Papp)およびS9蛋白質ベースの*in vitro*クリアランスの値を得た。さらに、4物質について、*in vitro*代謝安定性試験や既報値、*in silico*法で得られたパラメータ値を用いてPBKモデルでERアゴニスト経路に関連する14の*in vitro*アッセイのACC(有意な影響が見られる最小濃度)およびAC₅₀(50%影響濃度)値を*in vivo*のマウスOEDに外挿し、可能な場合はマウスの子宮肥大試験結果と比較し、内分泌かく乱影響評価へのIVIVEの適用性を評価した。

B.1. マウスPBKモデルの汎用性向上

IVIVEに関する既存研究を調査し、IVIVEで使用される汎用的なPBKモデルについて、モデルの基本構造(構成コンパー

トメント, 考慮するADMEプロセス), 対象生物種, モデルへの入力パラメータ, 結果の出力, そしてプログラミング言語の面から特徴を解析した。

得られた解析結果を参考に昨年度構築したマウスPBKモデル(血液, 脂肪, 高血流組織, 低血流組織, 腎臓, 肝臓の6コンパートメントで構成; 消化管からの吸収, 組織への分配, 肝クリアランスおよび腎クリアランスによる代謝・排泄を考慮; R言語で構築)の汎用性向上について検討した。その際, マウスモデルの基本構造は保持し, 汎用性拡大に必要な数式およびパラメータ値をモデル内に追加で組み込むこととした。さらに, 上記の検討により新たに構築したモデルについて, 既報の実験データを用いて, 検証を行った。

B.2. *in vitro*試験によるPBKモデルパラメータ値の整備

昨年度に引き続き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, 昨年度対象とした12物質(表1)のうち昨年検討できた4- α -Cumylphenol (4-CP)を除く11物質(ERアゴニスト活性に関する既報の*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, *In vitro*アッセイとしてERレポータージェンアッセイのアゴニスト活性評価系に相当するTox21_ERa_BLA_Agonist_ratio およ

びTox21_ERa_LUC_VM7_Agonist)とした。

- 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7物質(Daidzein (D), Dicumyl peroxide (DP), 4-hydroxybiphenyl (4-HB), phenolphthalein (PP), 2-cyano-3,3'-diphenylacrylic acid ethyl ester (CE2), nordihydroguaiaretic acid (Nor), 1,1,1-tris(4-hydroxyphenyl)-ethane (THE)および試験系の検証のためFDAガイド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: antipyrine (AP) (CAS 60-80-0), 透過性中: furosemide (F) (CAS 54-31-9), 透過性低: chlorothiazide (C) (CAS 58-94-6))の計10物質とした。

Caco-2単層膜は理化学研究所BioResource Research Center細胞材料開発室より購入した細胞(RCB0988)を用いて作成した。単細胞膜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300 Ω 以上のチャンパーを実験に用いた。細胞膜透過性試験に先立ち, LC/MS測定およびHPLC測定のための測定条件プロトコル作成, 難水溶性のため前年度10 μ M溶液が作成できなかった物質について, 既存の論文で良好な結果の得られているTween80等の界面活性剤の使用を検討し, 5% Tween80で10 μ M溶液を作成が可能との結果が得られた。しかし, 単細胞膜の健全性の指標であるTEERが300 Ω を下回る例が多くみられたため界面活性剤の使用は不適と判断した。次に溶液調整方法を検討し急激にDMSO濃度を低下させず, DMSO最終濃度を従来の0.1%から1%とすることで10 μ M溶液を作成可能となった。細胞膜透過性試験は, 10物質(指標物質3物質, 被検物質7物質)について実施した。このうち, サンプル中に当該物質が認められなかったDPおよびCE2, 添加

サンプル中および apical 側サンプルには当該物質が認められたが basal 側サンプル中に認められなかった Nor を除く 7 物質について化合物濃度を LC/MS/MS 装置あるいは HPLC 装置にて測定して透過係数 (Papp) (cm/sec) を算出した。

・マウス肝臓 S9 画分を用いた *In vitro* 代謝安定性試験

被験物質 5 物質 (4-HB, PP, CE2, Nor, THE) については、前年度に確定した評価実施用プロトコルを用いてマウス肝臓 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。被験物質の残存量は LC/MS/MS 装置を用いて測定した。なお、陽性対照物質 7EC は昨年度の測定データを用いた。

消失速度定数 (ke)、*in vitro* 代謝クリアランス CL_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ -蛋白質)、 $t(1/2)$ 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} とは、下記の式により算出した。

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

$$t(1/2) = 0.693/ke$$

B.3. IVIVE の試行

B.2. に記した *in vitro* 代謝安定性試験を実施した 5 物質の中の 4-HB, CE2, THE および昨年度にデータの得られた 4-CP の 4 物質を対象に ER アゴニスト経路に関連する既報の 14 の *in vitro* アッセイの結果からマウス PBK モデルを用いた IVIVE で OED

を推定し、国衛研保有のマウスの子宮肥大試験結果との比較が可能な物質について比較を行い、内分泌かく乱影響評価への IVIVE 適用性を評価した。

化学物質に特異的な 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、肝臓の各組織/血液分配係数はオクタノール/水分配係数 ($\log Kow$) を基に DeJongh et al., (1997) の式で推定し、消化管からの化学物質の吸収速度定数は、Papp から算出した。その際、4-CP と 4-HB については、Kamiya et al., (2020) による文献値を、CE2 と THE については、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) から得たトポロジカル極性表面積を基に Punt et al., (2021) に従って Papp を計算し、使用した。肝クリアランスは、B.2. に記した *in vitro* で測定した S9 蛋白質でのクリアランスから算出した。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。

各物質に特異的なこれらの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 3 日間連続投与時の血漿中非結合態のピーク濃度を推計し、OED への外挿に用いる換算係数を求めた。

IVIVE の対象とするエストロゲン受容体 (ER) アゴニスト経路に関連する *in vitro* アッセイデータは、米国 National Toxicology Program (NTP) の Integrated Chemical Environment (ICE) (<https://ice.ntp.niehs.nih.gov/>) から、以下の 14 の ER 経路アッセイのデータを選択した。

- ① NVS_NR_bER
- ② NVS_NR_hER

- ③ NVS_NR_mERa
- ④ OT_ER_ERaERa_0480
- ⑤ OT_ER_ERaERa_1440
- ⑥ OT_ER_ERaERb_0480
- ⑦ OT_ER_ERaERb_1440
- ⑧ OT_ER_ERbERb_0480
- ⑨ OT_ER_ERbERb_1440
- ⑩ OT_ERa_EREGFP_0120
- ⑪ OT_ERa_EREGFP_0480
- ⑫ ATG_ERE_CIS_up
- ⑬ ATG_ERa_TRANS_up
- ⑭ TOX21_ERa_BLA_Agonist_ratio

上記のER経路アッセイの①～③はER結合アッセイ、④～⑨はER二量体の形成等を測定する蛋白質相補性アッセイ、⑩と⑪は転写因子とDNAの相互作用を測定するアッセイ、⑫と⑬はRNA転写レベルを測定するレポーター遺伝子アッセイ、そして⑭はレポーター蛋白質レベルを測定するアッセイである。これらのアッセイでACC (μM) およびAC₅₀ (μM) 値が報告されている場合、換算係数を用いてマウスのOED(mg/kg/日)を算出し、さらに、可能な場合、マウスでの子宮肥大試験の結果と比較し、IVIVEの適用性を評価した。

(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. マウスPBKモデルの汎用性向上

既存研究の調査から、IVIVEは、1) 外挿されたOEDとヒト曝露量の比(生物活性/曝露比, BER) から追加試験が必要な物質をリスクベースで優先順位付けをする「Nontargeted IVIVE」と2) 特定の有害影響を生じる*in vivo*用量の定量的な予測のため

同じAOPのMolecular initiating event (MIE) やKey event (KE) に対応した*in vitro*アッセイを対象とする「targeted IVIVE」に大別され、前者の目的のPBKツールとしては、米国NTPの汎用WebツールであるIntegrated Chemical Environment (ICE) (<https://ice.ntp.niehs.nih.gov/>) の「PBPK」と「IVIVE」ツールが、そして後者の目的のPBKツールとしては、汎用Webツールボックス「PBK workflow」(www.qivivetools.wur.nl) が該当すると考えられた。入力項目やモデルの詳細度が異なるこれらのツールの特徴を解析した結果、1) パラメータ値のデータベースや推計法を搭載する、2) ヒト、ラット、マウスを対象とする、3) 計算結果を多彩にグラフすることがマウスPBKモデルの汎用性向上に重要と判断された。昨年度に構築したマウスPBKモデルはR言語でコード化されており、データや推計式の追加は比較的容易であり、またグラフ出力の多様化にも対応可能と考えられることから、本年度は、マウスPBKモデルと同じ基本構造のラットとヒトのPBKモデルを構築し、マウスとラットのモデルは統合した。

ラットとヒトの生理学的パラメータ(体重、心拍出量、組織血流量割合および組織容積割合)の値は、マウスと同様にNoorlander, et al., (2022) の種固有の値を採用した。また、化学物質に特異的なパラメータである組織/血液分配係数、消化管からの吸収速度定数、肝代謝クリアランスについても、基本的にlog Kow, Pappおよび*in vitro*クリアランスから生物種別の計算ができるように数式をコード化した。新たに構築したラットモデルについては、Clewell et al., (2001) に報告されているイソプロピルアルコールを330および3056 mg/kgでラッ

トに単回経口投与した試験のデータと比較し、既報のパラメータ値を用いてラットの血中濃度の時間変化をほぼ推定できることを確認した。また、ヒトモデルについては、医薬品インタビューフォームに記載されたアセトアミノフェン（投与量：300 mg）とイルベサルタン（投与量：200 mg）をヒトに単回投与した試験のデータと比較し、既報のパラメータ値を用いてヒトの血中濃度の時間変化をほぼ推定できることを確認した。以上により、ヒト、ラット、マウスは同一の基本構造のPBKモデルでTKの推定が可能になった。

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 3 物質及び被験物質 7 物質について Caco-2 透過係数 (Papp) 算出を実施した。その結果、指標化合物 3 物質 (AP, F, C) および被験物質は 7 物質中 4 物質 (D, 4-HB, PP, THE) について表 2 のように算出された。他の 3 物質 (CE2, DP, Nor) 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。指標化合物の 3 物質のうち高透過クラスの AP と中等度透過性クラスの F の Papp (AP : $33.03/25.27 \times 10^{-6}$ cm/sec ; F : 1.40×10^{-6} cm/sec) は文献値 35.7×10^{-6} cm/sec, 1.3×10^{-6} cm/sec (Li et al., 2007) と同等であったが低透過性クラスの C (1.47×10^{-6} cm/sec) については文献値 0.19×10^{-6} cm/sec (Flaten et al., 2006) より高く、また中等度透過性クラスと逆転していた。

表 2 Papp ($\times 10^{-6}$ cm/sec)

Substance	Mean \pm SD
指標物質	

AP	高膜透過性	33.03 \pm 9.73
		25.27 \pm 20.36 ^H
	F	1.40 \pm 0.89 ^H
C	低膜透過性	(1.47 \pm 0.66)
被験物質		
D		26.25 \pm 6.18
4-HB		68.90 \pm 46.43 ^H
PP		8.83 \pm 2.88
THE		4.10 \pm 2.07
CE2		N.D.
DP		N.D.
Nor		N.D.

H: HPLCで測定, N.D.: 検出限界以下のため算出できず, (): 5% Tween80 存在下でのデータ

・マウス肝臓 S9 画分を用いた *In vitro* 代謝安定性試験

被験物質 5 物質 (4-HB, PP, CE2, Nor, THE) についてそれぞれの *ke* および *CLint* を算出した。また、陽性対照基質 7EC は昨年度の測定データをもとに再計算を行った。何れの場合も、実施諸条件（濃度、反応時間）は残存率と時間の回帰式の線形性を十分に確保していた（全被験物質について、 $R^2 > 0.9$ であった）。

① 7EC の *ke* は 0.554, *t*(1/2) および *CLint* はそれぞれ 1.25 min と 554 μ L/min/mg S9 protein であった。② 4-HB の *ke* は 0.099, *t*(1/2) および *CLint* はそれぞれ 7.0 min と 99.0 μ L/min/mg S9 protein であった。③ PP の *ke* は 0.005, *t*(1/2) および *CLint* はそれぞれ 137.7 min と 5.0 μ L/min/mg S9 protein であった。④ CE2 の *ke* は 0.659, *t*(1/2) および *CLint* はそれぞれ 1.05 min と 659.3 μ L/min/mg S9 protein であった。また、安定性確認用反応液 B（熱変性 S9）（60 min）と NADPH 再生系ナシ反応液の残存率（10 min）

はそれぞれ 106.2%と 0.02%であった。NADPH 再生系非存在下でも著しい残存率の減少が認められたことから、CE2 は P450 以外の酵素によって速やかに代謝を受けることが示唆された。さらに残存率は反応時間 5 分で 7.7%, 反応時間 10 分で 0.1% であったことから、より短い反応時間 (0, 1, 2, 5, 10, 15 min) での再解析を実施した。その結果, k_e は 0.602, それから求められた $t(1/2)$ および CL_{int} はそれぞれ 1.15 min と 601.9 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ S9 protein であった。⑤ Nor の k_e は 0.047, $t(1/2)$ および CL_{int} はそれぞれ 14.8 min と 46.8 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ S9 protein であった。なお、フィルター濾過後の 50 μM 溶液に含まれる Nor 濃度を測定した結果, 約 23.5 μM であった。従って、反応液中に含まれる Nor の終濃度は約 2.4 μM 程度と考えられた。⑥ THE の k_e は 0.055, $t(1/2)$ および CL_{int} はそれぞれ 12.57 min と 55.1 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ S9 protein であった。

C.3. IVIVEの試行

OED を算出した 4 物質の log Kow は, 3.20 (4-HB) ~4.07 (4-CP) の範囲にあり, 推定された組織/血液分配係数には最大でも 1.8 倍の差異しかなく, また, 血漿蛋白質非結合割合も最小の CE2 と最大の 4-CP の差異は 3.3 倍であった。一方, Papp から算出した消化管からの吸収の 1 次速度定数には最小の THE と最大の 4-HB で 12 倍の差異があり, S9 クリアランス測定値から計算した肝クリアランスにも最小の THE と最大の CE2 にも 12 倍の差異があった。これらのパラメータの変動に伴いピーク濃度に基づくマウスでの換算係数にも 34.6 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}/\mu\text{M}$ (4-HB) ~3350 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}/\mu\text{M}$ (CE2) と 100 倍近い差異が生じた。

これらの換算係数を基に ACC から外挿

した 4 物質のマウス OED の算術平均と範囲は, 4-CP で 125 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (10~598 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, 有効アッセイ数: 14), 4-HB で 276 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (26~921 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, 有効アッセイ数: 13), CE2 で 80800 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (有効アッセイ数: 1), そして THE で 311 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (29~805 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, 有効アッセイ数: 13) であった。また, AC_{50} からの OED の算術平均と範囲は, 4-CP で 484 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (22~1240 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, 有効アッセイ数: 14), 4-HB で 677 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (56~1410 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, 有効アッセイ数: 13), CE2 で 41300 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (有効アッセイ数: 1), そして THE で 981 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (25~3000 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, 有効アッセイ数: 13) であった。

これら OED を算出した物質のうち, 4-CP および CE2 は 3 日間経口投与によるマウス子宮肥大試験, THE および 4-HB は 7 日間経口投与によるマウス子宮肥大試験を実施しており, 4-CP および THE はエストロゲン様作用陽性を示し, 4-CP の LOAEL は 1000 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, NOAEL は 300 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, THE の LOAEL は 300 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, NOAEL は 100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ であった。CE2 および 4-HB エストロゲン様作用陰性を示し, 最大用量の 1000 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ においても影響は認められず NOAEL は >1000 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ であった。エストロゲン様作用陽性を示した 2 物質 (4-CP および THE) の OED (4-CP : ACC = 125 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, AC_{50} = 484 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$; THE : ACC = 311 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, AC_{50} = 981 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$) と子宮肥大試験の NOAEL は, 投与期間を考慮すると概ね一致していた。エストロゲン様作用陰性を示した 2 物質のうち CE2 について, OED (ACC = 80800 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, AC_{50} = 41300 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$,) と子宮肥大試験の NOAEL に大きな差はないもの

と考えられた。一方,4-HB については OED (ACC = 276 mg/kg/day, AC50 = 677 mg/kg/day) と子宮肥大試験における NOAEL との間に差がみられた。なお,4-HB は7日間皮下投与の子宮肥大試験においては陽性を示し,エストロゲン様作用自体は有している。

D. 考察

理想的な IVIVE はヒト由来の細胞等を用いた *in vitro* アッセイの活性濃度からヒト PBK モデルを用いて,ヒトでの OED に外挿し,有害性評価の Point of Departure (POD) を得て,ヒト健康リスクを定量的に判定できるようにすることであり,これによりリスク判定時の種間外挿に伴う不確実性も考慮不要になると考えられる。このような外挿を行うには,様々な化学物質に適用できる汎用的なヒト PBK モデルが必要となる。一方,*in vitro* アッセイからの IVIVE が妥当であることを示すには,ラットやマウスを用いた動物試験での NOAEL や LOAEL のデータとの比較による傍証が必要と考えられ,このためにはラットやマウスの汎用的な PBK モデルが必要となる。以上のことから,ラット,マウスおよびヒトでの TK を推定できる汎用 PBK モデルを構築することは重要であるが,現時点では,ラットモデルはイソプロピルアルコール,マウスモデルはビスフェノール A,そしてヒトモデルはアセトアミノフェンおよびイルベサルタンと検証事例が十分ではないため,モデルの汎用性の拡大とともに,今後も検証事例を増やし,モデルの信頼性を高める必要があると考えられる。

PBK モデルパラメータ値の整備のための Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験については,信頼性のあるデータを得るた

めに更なる試験条件等の検討が必要と考える。具体的には,膜透過性の指標化合物の透過性の結果に透過性クラスに応じた Papp が明確には得られていない。指標化合物の透過性には文献により差がみられ,例えば,Kus et al., (2023) の Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験を標準化する目的で種々の文献中の試験条件をレビューした報告では,高透過性物質 AP の Papp は 76.71×10^{-6} cm/sec,中等度透過性物質 F の Papp は 1.29×10^{-6} cm/sec 低透過性物質 C の Papp は 0.71×10^{-6} cm/sec とある。本研究で参考とした Papp の文献値は,中等度透過性物質は本研究で引用しているものと同じデータであるが,高透過性物質 AP は 35.7×10^{-6} cm/sec,低透過性物質 C は 0.19×10^{-6} cm/sec である。測定値には文献によって差があることから,指標化合物による試験系の保証は,測定値が文献値に近いことよりも透過性クラスに応じた差が確実に示されることにより得られると思われる。また,経口投与による子宮肥大試験において陽性結果が認められている被験物質 D については検出限界以下のため Papp が算出されていない。少なくとも経口投与での子宮肥大試験において陽性結果の得られる物質について測定値が得られる必要があると考える。また,難水溶性物質に対する検証もさらに必要と考えられる。マウス肝臓 S9 画分を用いた *In vitro* 代謝安定性試験については,子宮肥大試験において陽性結果が得られた物質が2物質と少ないことから陽性物質のデータを増やす必要があると考える。IVIVE の実用性の検討の精度を高めるためには,これら *in vitro* アッセイの精度の向上が必要と考える。

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。しかし、経口投与で陰性・皮下投与で陽性物質である 4-HB について OED が陽性判定に相当する数値を示していたことから、経口経路における毒性を予測するために、更に検討すべき観点があることが示された。しかし、ヒト健康リスク評価で活用されるであろう OED を定量的に示すことが出来たことに一定の意義があると考えられる。

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

Clewell, III, H.J., Gentry, R., Gearhart, J.M., Covington, T.R., Banton, M.I., and Andersen, M.E. (2001). Development of a physiologically based pharmacokinetic model of isopropanol and its metabolite acetone. *Toxicol. Sci.* 63, 160–172.

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.

Flaten GE, Dhanikula AB, Luthman K, Brandl M. (2007). Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *Eur J Pharm Sci.* 27, 80-90.

Kamiya, Y., Takaku, H., Yamada, R., Akase, C., Abe, Y., Sekiguchi, Y., Murayama, N., Shimizu, M., Kitajima, M., Shono, F., Funatsu, K., and Yamazaki, H. (2020). Determination and prediction of permeability across intestinal epithelial cell monolayer of a diverse range of industrial chemicals/drugs for estimation of oral absorption as a putative marker of hepatotoxicity. *Toxicol. Reports* 7, 149–154.

Kus M, Ibragimow I, Piotrowska-Kempisty H. (2023). Caco-2 Cell Line Standardization with Pharmaceutical Requirements and In Vitro Model Suitability for Permeability Assays. *Pharmaceutics.* 15, 2523

Li C, Liu T, Cui X, Uss AS, Cheng KC. (2007). Development of *in vitro* pharmacokinetic screens using Caco-2, human hepatocyte, and Caco-2/human hepatocyte hybrid systems for the prediction of oral

bioavailability in humans. *J Biomol Screen.* 12, 1084-1091.

Noorlander, A., Zhang, M., van Ravenzwaay, B., and Rietjens, I.M.C.M. (2022). Use of physiologically based kinetic modeling-facilitated reverse dosimetry to predict in vivo acute toxicity of tetrodotoxin in rodents. *Toxicol. Sci.* 187, 127–138.

Punt, A., Pinckaers, N., Peijnenburg, A., and Louisse, J. (2021). Development of a web-based toolbox to support quantitative in-vitro-to-in-vivo extrapolations (QIVIVE) within nonanimal testing strategies. *Chem. Res. Toxicol.* 34, 460–472.

表1 被験物質

化学物質	CAS	子宮肥大試験 NOAEL/LOAEL	TOX21_E Ra_BLA_ Agonist_ra tio	TOX21_E Ra_LUC_ VM7_Ago nist
4-alpha-Cumylphenol*	599-64-4	300/1000 (30/100)	○	○
Daidzein	486-66-8	200/600 (ND)	○	○
Dicumyl peroxide	80-43-3	100/300 (300/1000)	○	○
4-Hydroxybiphenyl	92-69-3	>1000/- (300/1000)	○	○
Phenolphthalein	77-09-8	>1000/- (1000/-)	ND	○
2-Cyano-3,3'- diphenylacrylic acid ethyl ester	5232-99-5	>1000/- (>1000/-)	○	○
Nordihydroguaiaretic acid	500-38-9	>1000/- (>1000/-)	○	○
1,1,1-tris(4- Hydroxyphenyl)-ethane	27955-94-8	100/300 (100/300)	ND	○
4,4'-Thiodianiline	139-65-1	25/80 (25/80)	○	ND
p-Phenylenediamine, N,N- diphenyl	74-31-7	>1000/- (300/1000)	ND	○
Cinnamic acid, phenethyl ester	103-53-7	>1000/- (>1000/-)	ND	○
Triphenyl phosphate	115-86-6	>1000/- (>1000/-)	ND	○

*：令和4年度測定、-：最大用量でエストロゲン様作用なし、○：データあり、ND：データなし

NOAEL/LOAEL：経口投与（皮下投与）