

令和6年度 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）
化学物質管理のための *in silico* 毒性予測の利用推進と統合的リスク評価の
基盤構築に関する研究 分担研究報告書

分担研究課題名：経口毒性評価における PBK モデルの利用に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 第2室長 松本真理子
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 吉田喜久雄
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 第2室 村田康允
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 第2室 馬野高昭
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 第2室 磯貴子
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 第2室 若山美智子
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 第2室 広瀬望

研究要旨

内分泌かく乱化学物質の優先リストのマウス子宮肥大試験の結果を用いて、化学物質の定量的リスク評価に対する *in vitro* – *in vivo* 外挿 (IVIVE) アプローチの適用可能性を評価した。選択された5物質のうち、3物質が子宮肥大試験において陽性のエストロゲン活性を示し、2物質では活性は陰性であった。これらの化学物質は、エストロゲン受容体結合（開始イベント）からタンパク質産生までの5つのキーイベントを調べる 15 の *in vitro* アッセイで活性を示し、生理学的動態 (PBK) モデルを用いて IVIVE 変換係数を導出することが可能であった。カットオフポイント、半最大反応および 90% 反応における活性濃度 (ACC、AC₅₀およびAC₉₀) から外挿された経口等価用量 (OED) を他のキーイベントのOEDと比較し、それらの重なりから *in vivo* での用量-反応関係に大きな影響を与えると予想されるクリティカルなキーイベントを判定した。陽性のエストロゲン活性を示した 3物質については、決定されたクリティカルなキーイベントの *in vitro* AC₅₀値から求めたOEDは、子宮肥大試験で観察された最低影響レベルの2倍以内であった。さらに、活性が陰性であった 2物質のOEDは、子宮肥大試験における最高投与量よりも高かった。これらの結果に基づき、IVIVEアプローチの適用は概ね妥当と評価され、子宮肥大試験やそれ以外の短期の *in vivo* 試験の代替法としての可能性を示唆していると考えられた。しかし、化学物質の定量的リスク評価に IVIVEアプローチを適用するには、*in vivo* での反応に大きく影響するクリティカルなキーイベントを如何にして特定するか等について、さらに検討する必要がある。

A. 研究目的

生活環境中の化学物質の多くについて十分な毒性情報がないためリスク評価が実施されていない現状は化学物質管理における大きな問題であり、国際的な課題となっている。化学物質の人健康リスク評価を効率的に進めるためには、*in silico* 評価手法の開発と行政利用への取り組みが重要である。本研究は、*in silico* 毒性評価手法の開発の一環として、PBK モデルを活用した *in vivo* 毒性予測を行うための基盤を整理することを目的とする。R6 年度は先行研究 (*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: (21KD2005)) で収集したデータを基に、

内分泌かく乱化学物質のマウスの子宮肥大に対する *in vivo* の毒性予測 (*in vitro* – *in vivo* 外挿 (IVIVE) アプローチ) を試行し、IVIVE アプローチの適用可能性を評価した。

B. 研究方法

B.1. 検討対象物質の選定

厚生労働省の内分泌かく乱化学物質の優先リスト (未公表) 収載の物質を対象に、以下の3条件を満たす化学物質を抽出した。

- 1) 経口投与によるマウスでの子宮肥大試験が実施されている、
- 2) エストロゲン作用の開始イベントの①ERへの結合から、②受容体の二量化、③二量体のDNA結合、

④RDAへの情報転写を経て、⑤タンパク質産生に至る5つのキーイベントのいずれかを対象とする15の*in vitro*アッセイ（米国ToxCastプログラムで実施）が全てinactiveではない、

- 3) 生理学的動態（PBK）マウスモデルによる*in vitro* – *in vivo* 外挿（IVIVE）変換係数算出に必要なモデルパラメータ（分子量、オクタノール/水分配係数（log Kow）、血漿タンパク質非結合率（fup）、肝細胞クリアランス（CLint）およびトポロジカル極性表面積（TPSA））が入手可能である。

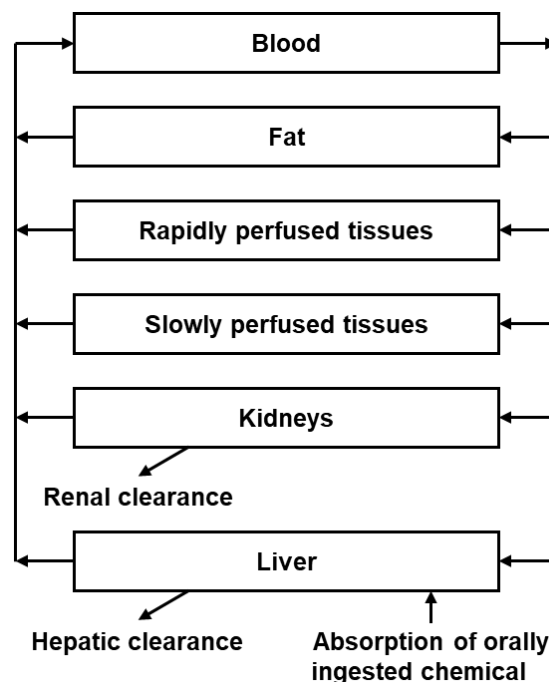
B. 2. *in vitro*アッセイデータ

*In vitro*アッセイデータについては、エストロゲン作用の開始イベントのERへの結合からタンパク質産生に至る5つのキーイベントのいずれかを対象とする計15の*in vitro*アッセイでの活性濃度（カットオフポイント濃度（ACC）、50 %活性濃度（AC₅₀）および90 %活性濃度（AC₉₀））を米国National Toxicology Program の Integrated Chemical Environment（ICE）データベースから取得した。

B. 3. マウスPBKモデル

下図に示す血液、脂肪、高血流組織、低血流組織、腎臓および肝臓の6コンパートメントで構成されるPBKマウスモデルを構築し、IVIVE換算係数の算出に使用した。このモデルは、化学物質が消化管から吸収され、肝臓経路で血流により輸送され、各コンパートメントに分配され、また肝臓で代謝され、腎臓から排泄されると想定している。使用するマウスの生理学的パラメータ（体重、各コンパートメントの容積、各コンパートメントへの血流量等）には既報の値を採用した。また、選定した物質に特異的なモデルパラメータは米国Environmental Protection Agency の CompTox Chemicals Dashboardデータベースおよび医薬基盤・健康・栄養研究所のDruMap Ver1.5から取得した。

構築したPBKマウスモデルについては、経口投与後のビスフェノールA（BPA）の経時的なマウス血清中濃度に関する既報の測定データを用いて、その予測能を検証した。



B. 4. IVIVE

PBKマウスモデルを用いて、1 mg/kg/dayで経口投与時のマウス血漿中タンパク質非結合態の最高濃度（C_{max}、μM）を次式で計算した。

$$IVIVE \text{ conversion factor} = \frac{1 \text{ mg/kg/day}}{C_{max} (\mu\text{M})}$$

抽出した各物質について*in vitro*アッセイのACC、AC₅₀ およびAC₉₀ の値からIVIVE変換係数を用いて経口経路の等価用量（OED）を算出し、5つのキーイベント毎の*in vitro*アッセイ由来のOEDの離散一様分布の重なりを連続する2つのキーイベント間で比較することにより、子宮肥大反応にクリティカルなキーイベントを選定した。

選定したクリティカルキーイベントを対象とする*in vitro*アッセイのACCおよびAC₅₀値から外挿したOEDの平均値をOED_{crit}とし、子宮肥大試験における最低影響レベル（LOEL）やベンチマーク用量（BMD）の値と比較することにより、IVIVEアプローチ適用の妥当性を評価した。BMD値の計算には、オランダRIVMのPROAST web application を使用した。

（倫理面の配慮）

本研究では動物を用いた実験は実施しない。

C. 研究結果

C1. 検討対象物質の選定

マウス経口投与試験が実施された内分泌かく乱化学物質の優先リスト内の化学物質の中で、9物質が、ER結合からタンパク質産生に至る5つのキーイ

ベントの各々において2つ以上のアッセイで ACC とAC₅₀ の値が存在した。また、65物質については、物質固有のPBKモデルパラメータが全て入手可能で、PBKモデルによるIVIVE変換係数算出が可能であった。これらの結果から、条件を満たす物質を抽出した結果、5物質が抽出され、これらの物質をIVIVEの検討対象物質とした。5物質中の3物質は子宮肥大試験でエストロゲン作用が陽性で、残り2物質は陰性であった。

物質名	CAS RN	結果
2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	131-55-5	+
Daidzein	486-66-8	+
4-Cumylphenol	599-64-4	+
Heptyl 4-hydroxybenzoate	1085-12-7	—
2-Ethylhexyl 4-hydroxybenzoate	5153-25-3	—

C. 2. マウスPBKモデル

構築したPBKマウスモデルで、2レベルで経口投与後の経時的な BPA のマウス血清中の非結合態の濃度を予測した。その結果、モデル予測値は測定値の1/3～3倍の範囲内で、若干過小推定気味であったが、ほぼ適切に濃度－時間変化を再現した。さらに、CLintを除く物質に特異的なパラメータである分子量、log Kow、fupおよびTPSAは、検討対象の5物質とBPAで大きな差異はないことから、吸収、分布および腎排泄にも大きな差異は生じないと予想されたため、BPAで予測能が検証されたPBKマウスモデルを5物質のIVIVE換算係数の算出に使用することは可能と判断した。

C. 3. IVIVE

5物質に対して選定されたクリティカルなキーイベントは、タンパク質産生（3物質）、受容体の二量化（1物質）、そして二量体のDNA結合（1物質）であった。

算出されたIVIVE換算係数を使用して対象物質のクリティカルなキーイベントのAC₅₀値から外挿されたOED_{crit}値は、子宮肥大試験でエストロゲン活性が陽性で、LOELが導出されている3物質では、LOELの1/2～2倍の範囲内であり、BMD₅₀に対しても同様に1/2～2倍の範囲内であった。また、クリティカルなキーイベントのACC値から外挿されたOED_{crit}値は、陽性3物質ではともにNOELおよびBMD₂₀の1/4～4倍の範囲内であった。

一方、子宮肥大試験においてエストロゲン活性が陰性であった2物質では、ACC値が陽性の3物質に比べて高く、反応の発現には3物質よりも高い

血漿中タンパク質非結合態の濃度が必要であることに加えて、IVIVE換算係数も3物質と同程度かより高値であるため、より多くの投与量を必要となる。このため、陰性2物質のOED_{crit}は子宮肥大試験における最大投与量（1000 mg/kg/day）よりも大きい値が算出された。

物質名	クリティカルキーイベント	OED _{crit} mg/kg/day
2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	タンパク質産生	510
Daidzein	二量体のDNA結合	680
4-Cumylphenol	受容体の二量化	160
Heptyl 4-hydroxybenzoate	タンパク質産生	1700
2-Ethylhexyl 4-hydroxybenzoate	タンパク質産生	9900

D. 考察

子宮肥大試験でエストロゲン作用が陽性の3物質について、クリティカルキーイベントの*in vitro* AC₅₀およびACC値から算出したOED_{crit}はそれぞれ、LOELとBMD₅₀およびNOELとBMD₂₀と同レベルであり、陰性の2物質については、OED_{crit}は子宮肥大試験の最高投与量よりも高い値が予測された。これらの結果から、IVIVEアプローチの適用は、ほぼ妥当と評価され、子宮肥大試験やそれ以外の短期の*in vivo*試験の代替法としての可能性を示唆していると考えられた。

現在、IVIVEアプローチは主にスクリーニングと優先順位付けへの適用が想定されており、活発に検討が行われている。しかし、現行の定量的リスク評価でPoint of Departure (PoD)として使用される*in vivo*試験のNOAELやBMDL等の代替となり得るOEDを得るためには、*in vivo*の毒性発現に係る作用機序の各キーイベントの中から如何にしてクリティカルなキーイベントを選定し、PoDとなり得るOEDを導出するかについてのさらなる検討が必要と考えられる。

本検討においては、PBKマウスモデルが重要な役割を果たしたが、マウス特異的な情報が限られていたため、一部のパラメータにはラットの値を代用した。BPAでの検証の結果は、ほぼ妥当であり、代用が5物質のIVIVEの検討には大きな影響を及ぼさなかったと考えられるが、今後のIVIVEの検討においては、多様なトキシコキネティック特性を持つ化学物質を対象とする必要があると予

想される。このため、マウスモデルの検証に利用できる薬物動態試験データの入手可能性は限られているが、モデルの予測の不確実性を減らし、信頼性を向上させるため多様な特性の物質で PBK モデルの検証を続ける努力が必要である。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質の優先リスト内の5物質を対象とした本検討では、PBKモデルを利用することにより *in vitro* アッセイの結果から子宮肥大試験の結果をほぼ妥当に予測できたと考えられるが、今後さらに多様な特性の物質に適用を拡大して IVIVE アプローチの妥当性を子宮肥大試験や他の短期間の *in vivo* 試験で評価することが重要である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hirose N, Hasegawa, S, Umamo T, Murata Y, Iso T, Inoue K, Yamada T, Masumura K, Matsumoto M: Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (X). Bull. Natl Inst. Health Sci. 2024 142: 63-70
2. Iso T, Suzuki K, Murata Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama KI, Hirose A, Masumura K, Matsumoto M: Lack of *in vivo* mutagenicity of carbendazim in the liver and glandular stomach of MutaMice. Genes Environ. 2024;46:7. doi: 10.1186/s41021-024-00299-4.

2. 学会発表

1. 村田康允、赤木純一、土井悠子、磯貴子、馬野高昭、小川久美子、増村健一、松本真理子: ジルコニウムブトキシドのラットを用いた90日間反復経口投与毒性試験。福岡、第51回日本毒性学会学術年会、2024年7月3-5日
2. 磯貴子、村田康允、広瀬望、馬野高昭、津田雅貴、堀端克良、杉山圭一、増村健一、松本真理子: 酢酸コバルト(II)四水和物の *in vivo* 変

異原性評価。福岡、第51回日本毒性学会学術年会、2024年7月3-5日

3. Matsumoto M, Yoshida K, Umamo T, Murata Y, Hirose N, Iso T, Yamada T, Masumura K: *In vitro* to *in vivo* extrapolation (IVIVE) for uterotrophic activity of 4- α -cumylphenol. 福岡、第51回日本毒性学会学術年会、2024年7月3-5日
4. 松本真理子、磯貴子、馬野高昭、村田康允、広瀬望、増村健一、堀端克良、杉山圭一: トルエンジイソシアネート経口投与による MutaMouse 肝臓における変異原性。岡山、第53回日本環境変異ゲノム学会、2024年12月7-8日
5. Tanabe A., Fukushima A., Akahori Y., Umamo T., Hirose N., Matsumoto M, Hirose A. Comparison of BMDL calculation performance with Bayesian BMD calculation tools using continuous datasets of animal toxicity studies. SRA2024 (オースティン、2024年12月8-12日)
6. M. Matsumoto, M. Wakayama, N. Hirose, T. Umamo, T. Iso, and Y. Murata: Comparison of Bayesian model averaging BMDLs calculated with ToxicR and BMABMDR for the incidence of animal carcinogenicity SOT2025 (オーランド、2025年3月17日)
7. Fukushima A., Tanabe A., Matsumoto M, Umamo T., Hayashi T., Hirose A.: Impact analysis of prior information on BMDL calculation for continuous data using Bayesian model software tools. SOT2025 (オーランド、2025年3月17日)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし