

年齢群別生物学的有効用量推定システムの検証とパラメータ推定方法の見直し

Evaluation of Age-Dependent Biologically Effective Dose Evaluation System and Consideration on Its Parameter Estimation Method

○桑 詩野^{*}, 吉田 喜久雄^{**}, 益永 茂樹^{***}

Shino KUWA, Kikuo YOSHIDA, Shigeki MASUNAGA

Abstract. New toxicity testing method using *in vitro* assays and *in silico* models as an alternative approach to animal testing has been rapidly evolving in the past few years. PBPK model is a powerful tool which can relate the results from *in vitro* assays to the exposure scenarios by calculating biologically effective dose. Age-Dependent Biologically Effective Dose Evaluation System calculates the biologically effective dose of general Japanese population using PBPK model. In this study, we will try to evaluate the result and re-consider the estimation method for partition coefficient

Key Words: PBPK, biologically effective dose, partition coefficient

1. はじめに

2020 年までに化学物質が健康や環境への影響を最小とする方法で生産・使用されることを目標とする SAICM (国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチ) により, 世界各国にて化学物質のリスク評価が推進されている。しかし, 一方で評価が推進されることによる負担も大きく, 欧州では, REACH の施行に伴い動物実験が増えることと近年の実験動物数削減の動きとの矛盾が問題となっている (Gilbert, 2009)。

このため, 従来の動物実験による有害性評価手法にかかる時間, コストそして実験に供される動物の数を削減することを目的に, *in vitro* の分子生物学的なデータと数理的な手法をあわせた新しい有害性評価手法が注目されている。欧州の ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) では 1991 年の設立以降, 動物実験代替法の開発が進められており, 米国では, 2007 年の米国研究会議による「Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and Strategy」(U.S. NRC,

2007) 以来, 米国 EPA の National Center for Computational Toxicology を中心に, 分子生物学とコンピュータによる計算を駆使した有害性評価手法の開発が進められている。また, わが国でも動物実験代替法に向けて研究が重ねられている (酒井, 2010; 森澤, 2010)。

この新しい評価手法の枠組みでは, *in vitro* 毒性試験を活用するため, PBPK (生理学的薬物動態) モデルによる生物学的有効用量の推定が必要不可欠となる。年齢群別生物学的有効用量推定システム (桑ら, 2009) は, 新生児から成人まで, 年齢群別に PBPK モデルを用いた計算を行うことを目的としたシステムである。

小児に対する化学物質リスクは国内外において, 注目されている。SAICM では, 小児を含む高感受性集団のリスクが削減されることが謳われている。また, 国内においても, 改正化審法の付帯決議に胎児や乳幼児を含む感受性の高い集団を勘案することが盛り込まれる

しかし, 小児については多くの場合, 化学物質

* 製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター
(Chemical Management Center, National Institute of Technology and Evaluation)

** 産業技術総合研究所 安全科学研究部門 (Research Institute of Science for Safety and Sustainability, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

*** 横浜国立大学 大学院環境情報研究院
(Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University)

による影響に関するデータが限られており、その評価は難しい。U.S.EPA（2006）により示されている年齢群別のリスク評価の枠組みの中では、十分なデータが入手できない年齢群については、数理的な推定手法を用いることが必要であり、体内動態を解析するためには、PBPK モデルを推奨している。このような小児のPBPK モデルにはいくつかの事例（Pelekis M et al., 2001; Pelekis M et al., 2003; Price K et al., 2003; Clewell HJ et al., 2004; Nong A et al., 2006; Lipscomb, JC and Kedderis, GL, 2006）があり、年齢群別生物学的有効用量推定システムは、このようなモデルの考え方をベースに、日本人の生理学的データベースを組み込み、年齢群別に生物学的有効用量とそのばらつきを推定することができるものである。

しかし、PBPK モデルの開発に対しては、しばしば懐疑的な見解が見られる（Reddy et al., 2005）。Chiu WA et al. (2007)によると健康リスク評価にPBPK モデルを用いるためには、使用可能であること（availability）と適用可能であること（applicability）を示すことが重要であるとしている。そして、モデルが適用可能であることを示すためにはその推定結果が妥当であることを徹底的に検証することが必要であるとしている。ここでは、使用および適用が可能であるシステムを目指して、年齢群別生物学的有効用量推定システムの信頼性と使いやすさを向上させることを目的とし、システムの計算結果の検証を行い、パラメータの推定方法の見直しを検討する。

2. 年齢群別生物学的有効用量推定システム

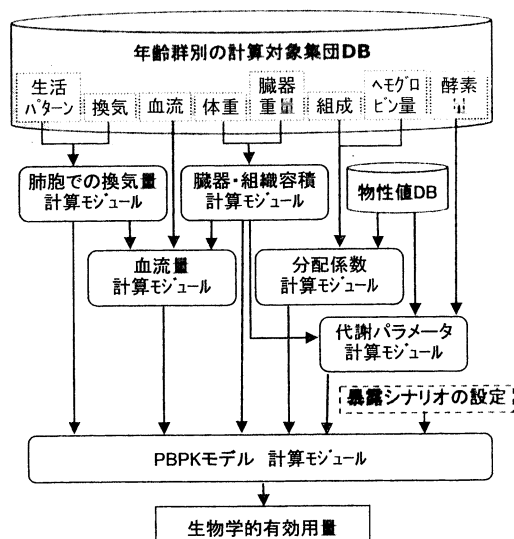


図1 年齢群別生物学的有効用量推定システム

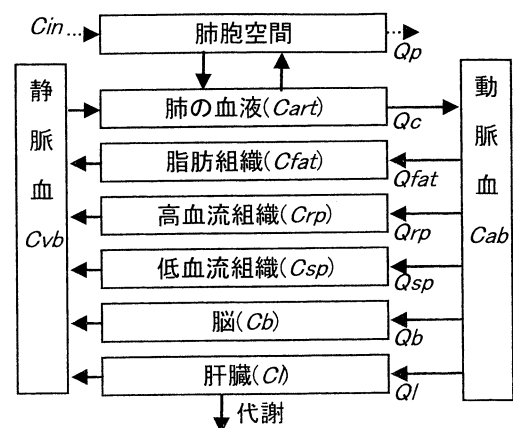


図2 PBPKモデルの構造

本システムは、図1に示すように生物学的有効用量を計算するPBPKモデルと年齢群別にパラメータを設定するモジュールからなる（桑ら，2009）。PBPKモデルのコンパートメント構成は、図2に示すとおりである。Ramsey and Andersen（1984）のモデルを基にし、神経毒性の評価を行うため、脳コンパートメントを追加し、さらに、複数物質に対する同時暴露による代謝阻害を計算するため、肝臓における代謝阻害計算機能を追加している。

年齢群は、新生児（生後1月末満）、乳児（生後2月）、幼児（1歳）、園児（5歳）、学童（10歳）、思春期（15歳）、成人の7群であり、現段階では、計算対象物質はベンゼン（B）、トルエン（T）、エチルベンゼン（E）、キシレン（X）である。

3. 計算結果の検証

リスク評価に、PBPKモデルを活用するためには、その推計結果に対する信頼性の向上が不可欠である。2006年米国にてPBPKモデルの不確かさとばらつきに関する国際ワークショップ（Barton HA et al., 2007）が開かれるなど、PBPKモデルの推計結果の精度を向上し、妥当性を評価することは重要視されている（Clewell and Clewell, 2008; Chiu et al., 2007; U.S. EPA, 2006）。

そこで、ここでは年齢群別生物学的有効用量推定システムの計算結果の検証を試みる。桑ら（2009）では、トルエンについていくつかの職業暴露データを用いた検証で、良好な結果がえられている。この検証では、データの中央値などを用いて計算結果の妥当性を示した。しかし、暴露量や体内動態には個人差によるばらつきがあり、結果として血中濃度にもばらつきが生じる。ここでは、暴露量と体内動態の個人差による血中濃度のばらつきの推計結果についても検証する。

このため、個人差によるばらつきが想定されるパラメータについては、分布を設定し、Crystal Ball（構造計画研究所）を用いて、モンテカルロシミュレーションを行った。体内動態のばらつきには、年齢群別生物学的有効用量推定システムに設定されている性別、年齢群別のパラメータを用いた。

Neubert et al. (2001)では、印刷工場内の4つの職場で働く人々の暴露量と血中濃度が報告されている。そこで、ここでは報告されている個人暴露量の50パーセンタイル値と75パーセンタイル値を用いて、暴露量に対数正規分布を仮定した。暴露時間は連続6時間とし、血液採取された暴露終了後30分の血中濃度を推定した。モンテカルロシミュレーションの計算回数は10,000回とした。

推定された血中濃度と実測値（Neubert et al., 2001）のばらつきを図3に示す。縦軸は対数軸とし、血中濃度を示している。この結果、推定値/測定値比が職場1～4それぞれで、0.5、0.5、0.3、0.4と若干過小評価の傾向があるものの、測定値と推定値のばらつきはよく一致した。

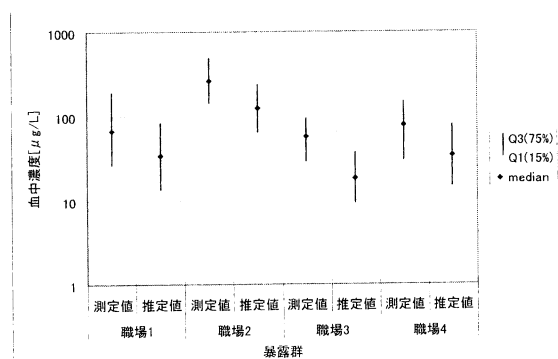


図3 推定結果と実測値の比較（職業暴露）

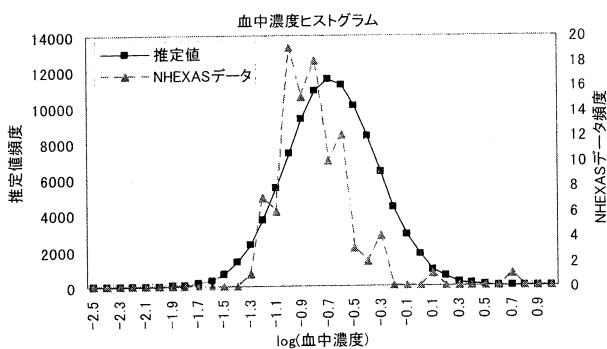


図4 推定結果と実測値の比較（一般環境レベル）

次に、一般環境レベルでの推定結果を検証する。ここでは、U.S.EPAのNHEXASのバイオモニタリング結果（U.S.EPA, 2002）を用いた。NHEXASデータについては、VOCの暴露量は個人差による変

動よりも、個々人の時間による変動の方が大きいと解析されている（Clayton et al., 1999）。そこで、ここでは、個人暴露量のばらつきを考慮するため、喫煙者がいない世帯のヒトについての個人暴露量データをすべて抽出し、暴露量の分布情報を抽出した。中央値 $27\mu\text{g}/\text{m}^3$ と95%値 $110\mu\text{g}/\text{m}^3$ を用いて、対数正規分布を仮定した。推定結果と実測値（U.S.EPA, 2002）を図4に示す。分布をおおむね良好に推定することができたと考えられる。

4. パラメータの見直し

まず、計算結果に対してその不確かさが与える影響の大きいパラメータを抽出するため、Crystal Ballを用いて、モンテカルロシミュレーションによる感度解析を行った。分配係数には不確かさ係数0.5～1.5の三角分布を設定し、代謝パラメータ（VmaxとKm）には、-1～1の対数一様分布の不確かさ係数を設定した。また、比較的不確かさが低いと考えられる臓器・組織容積や肺胞換気量、心拍出量と臓器・組織血流量については、0.9～1.1の三角分布の不確かさ係数を設定した。

成人男性の脳中濃度に対するパラメータの寄与率を図5に示す。新生児では成人よりも代謝パラメータの不確かさの寄与率が大きかったが順位はかわらなかった。なお、比較のため本システムにあらかじめ設定されたパラメータの個人差によるばらつきによる寄与率を同グラフに示す。図5と図6より、成人および新生児男性双方について、脳/血液分配係数（分配係数（脳）と表示）による寄与率が大きいことがわかった。

次に、年齢群別の脳/血液分配係数計算結果（図6）と年齢群別の脳組織中濃度推定結果（図7）を示す。脳組織中濃度推定値を見ると、新生児ではその濃度が高くなっているが、これは代謝が未熟であることの影響と考えられる。また、他の年齢群については、分配係数の年齢群別の傾向とよく似ていることがわかる。よって、臓器・組織中濃度の年齢群別の傾向を推計するため、分配係数と代謝パラメータが重要であることがわかった。

また、本システムは現在、BTEXについての計算が可能である。このシステムを他の物質に適用をするためには、代謝パラメータと分配係数を入力することが必要である。

このため、ここではまず分配係数の推計方法についての見直しを検討する。本システムにおいて、分配係数の推計には、Pulinらの手法（Poulin et al, 1996a; Poulin et al 1996b）を用いている。この手法

では、生理学的食塩水と植物油への溶存度から血液および各臓器・組織の水分の脂質への溶存を求め、血中たんぱく質（ヘモグロビン）との親和性から血中におけるたんぱく質結合量を求める。このため、年齢群別の各臓器・組織の組成の違いによる分配係数の傾向を計算できる。また、Payne et al. (2002) にて、12 物質を用いて、血液や臓器・組織と空気との分配係数の推計手法の比較を行った結果、Poulin らによる手法は一部臓器・組織については他の手法よりその推計精度が劣るものの全般的に良好に推計できているとしている。

しかし、BTEX については推計結果と実測値との差が大きいことから、本システムでは補正係数を導入している。また、生理学的食塩水や植物油への溶存度は一般的に測定されている値ではなく、

他物質への適用は限られる。特に血中たんぱく質との親和性は血中脂質と水分への溶解を仮定して推計した分配係数と分配係数実測値との差が、たんぱく質への結合分であると仮定して求められている。このため、現手法では実測値がない物質への適用は難しい。

また、臓器・組織/空気分配係数の実測値自体にもばらつきがある。Thrall et al. (2002) では、分配係数の実測を行い、既存データとの比較を行った結果、物質や臓器・組織によっては得られた値に大きな差があるとしている。

そこで、ここでは、オクタノール・水分配係数など入手しやすいパラメータを用いた推計手法を導入することを検討する。

Balaz and Lukacova (1999)による手法では、血液

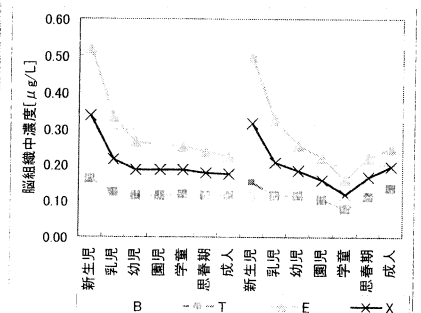
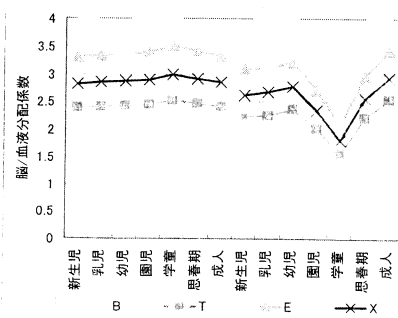
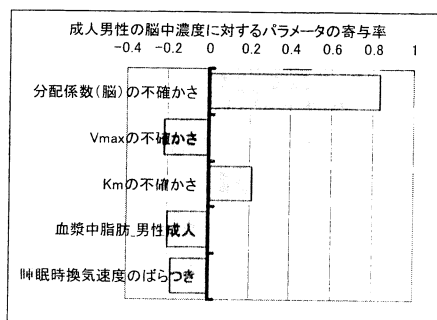


図5 成人男性の脳中濃度の感度解析結果

図6 年齢群別分配係数推定値

図7 年齢群別脳組織中濃度推定

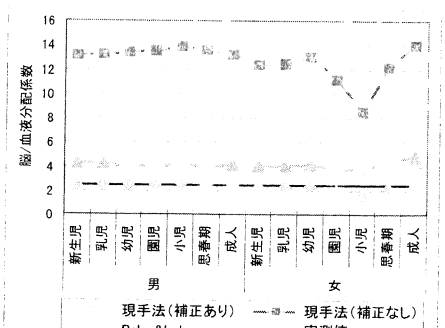
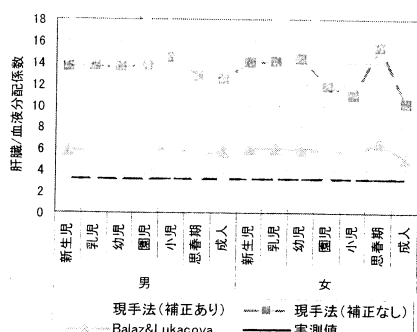
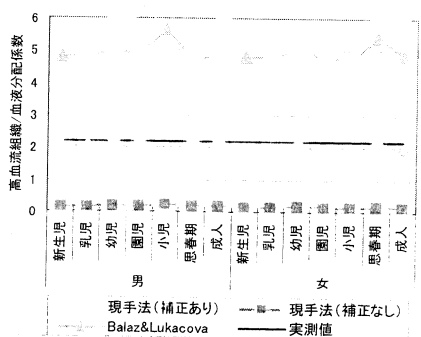
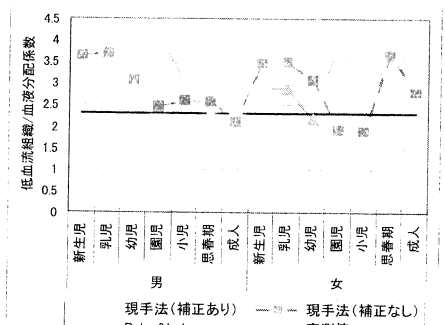
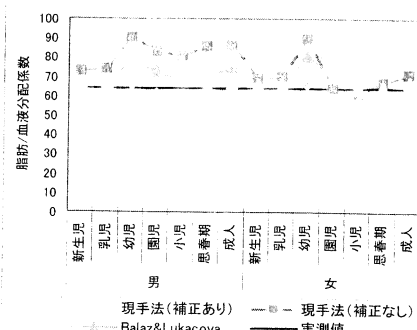
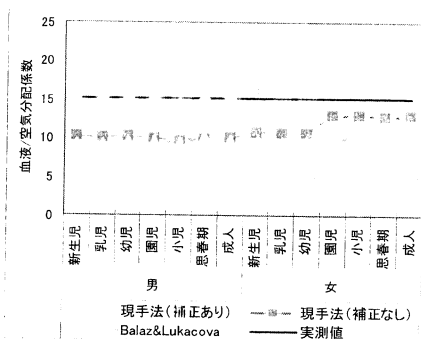


図8 分配係数の計算結果

や各臓器・組織の水分、脂質とたんぱく質の割合、そしてオクタノール・水分配係数から、各臓器・組織と血液についての分配係数を推定している。このため、必要となる物質固有のデータはオクタノール・水分配係数のみであり、さらには年齢による各臓器・組織の構成の違いを分配係数推定に反映させることができる。

ここでは Balaz and Lukacova (1999) による手法により BTEX の分配係数を計算し、図 8 にて、現手法の補正ありの場合と補正なしの場合および実測値との比較をした。多くの場合現手法による補正なしの場合よりも実測に近い値を推計することができている。また、年齢群別の傾向としては、低血流組織/血液分配係数の場合を除いて、現手法と同じような傾向がえられている。

ここでは、各臓器・組織の水分と脂質の含有割合より、残りはたんぱく質であることを仮定している。Balaz&Lucacova の手法にて、園児の低血流組織/血液分配係数が大きく推定されているのは、代表組織である筋肉の水分割合が他の年齢群と比較してかなり少なく、その分たんぱく質量が多く推計され、結果的にたんぱく質への結合量が大きく推定されているためと考えら得る。

今後はさらに物質数を増やしてこの手法の妥当性を検討し、また各臓器・組織の組成データの妥当性についても検証することが必要と考えられる。

5. まとめ

本稿では、使用と適用が可能であるシステムを目指して、年齢群別生物学的有効用量推定システムの計算結果の検証を行った。この結果、トルエンについては、成人の職業暴露および一般環境レベルの暴露について、個人差によるばらつきを含め、良好な検証結果がえられた。

今後、さらなる信頼性の向上のためには、特に小児を対象として検証事例を増やすことが必要である。環境省による「子どもの健康と環境に関する全国調査」(環境省, 2010) や米国の”National Children’s Study” (Needham et al., 2005) などの大規模な小児の疫学調査にはバイオモニタリングデータの採取も計画されており、その結果によっては、小児の推定結果を検証することも可能となる。バイオモニタリングデータを活用する場合、血中濃度だけでなく尿中濃度が測定されていることも多い。これを活用するためには尿中濃度推計機能の開発が必須となる。

次に、感度解析により精度を高める必要性が高

いパラメータを抽出した。この結果、分配係数と代謝パラメータの不確かさによる計算結果への影響が比較的大きいことがわかった。これらのパラメータは物質ごとに設定することが必要なパラメータでもあり、適用範囲となる物質を広げるためにも、汎用的なパラメータから推計できる方法を導入することが必要である。

また、より多くの物質の計算を行うため、経口や経皮などの暴露経路への対応、そして母乳や胎児コンパートメントを追加することが必要である。そして、すべての年齢群を網羅するためには高齢者についても考慮が必要である。

なお、今後、本システムのユーザーインターフェイスを開発し、横浜国立大学大学院環境情報学府、益永・中井&松田研究室のホームページにて公開することを予定している。

謝辞

本研究は筆者が、横浜国立大学に在学中に、同大学大学院環境情報研究院共同研究プロジェクトの支援を受けて行われたものである。

参考文献

- Barton HA, Chiu WA, Woodrow Setzer R, Andersen ME, Bailer AJ, Bois FY, Dewoskin RS, Hays S, Johanson G, Jones N, Loizou G, Macphail RC, Portier CJ, Spendiff M and Tan YM (2007) Characterizing uncertainty and variability in physiologically based pharmacokinetic models: state of the science and needs for research and implementation. *Toxicol. Sci.*, 99:395-402.
- Balaz S and Lukacova V (1999) A Model-based Dependence of the Human Tissue/Blood Partition Coefficients of Chemicals on Lipophilicity and Tissue Composition. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 18(4):361-368,
- Article first published online: 14 OCT 1999
- Chiu WA, Barton HA, DeWoskin RS, Schlosser P, Thompson CM, Sonawane B, Lipscomb JC and Krishnan K (2007) Evaluation of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. *J. Appl. Toxicol.*, 27:218-237.
- Clayton CA, Pellizzari ED, Whitmore RW, Perritt RL, Auackenboss JJ (1999) National Human Exposure Assessment Survey (NHEXAS): distributions and associations of lead, arsenic and volatile organic compounds in EPA Region 5. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, 9(5):381-92.

- Clewell HJ, Gentry PR, Covington TR, Sarangapani R and Teeguarden JG (2004) Evaluation of the potential impact of age- and gender-specific pharmacokinetic differences on tissue dosimetry. *Toxicol. Sci.*, 79:381-393.
- Clewell RA and Clewell HJ 3rd (2008) Development and specification of physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 50:129-143.
- Gilbert N (2009) Chemical-safety costs uncertain. *Nature*, 160:1065.
- Lipscomb JC and Kedderis GL (2006) Use of Physiologically Based Pharmacokinetic Models to Quantify the Impact of Human Age and Interindividual Differences in Physiology and Biochemistry Pertinent to Risk - Final Report. EPA/600/R-06/014A.
- Needham LL, Ozkaynak H, Whyatt RM, Barr DB, Wang RY, Naeher L, Akland G, Bahadori T, Bradman A, Fortmann R, Liu LJ, Morandi M, O'Rourke MK, Thomas K, Quackenboss J, Ryan PB, Zartarian V. (2005) Exposure assessment in the National Children's Study: Introduction. *Environ. Health Perspect.*, 113(8):1076-82.
- Neubert D, Bochert G, Gericke C, Hanke B, Beckmann G (2001) Multicenter field trial on possible health effects of toluene. I. Toluene body burdens in workers of the rotogravure industry. *Toxicology*, 168(2):139-57.
- Nong A, McCarver DG, Hines RN and Krishnan K (2006) Modeling interchild differences in pharmacokinetics on the basis of subject-specific data on physiology and hepatic CYP2E1 levels: a case study with toluene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 214:78-87.
- Payne MP, Kenny LC. (2002) Comparison of models for the estimation of biological partition coefficients. *J Toxicol Environ Health A.*, 65(13):897-931.
- Pelekis M, Nicolich MJ and Gauthier JS (2003) Probabilistic framework for the estimation of the adult and child toxicokinetic intraspecies uncertainty factors. *Risk. Anal.*, 23:1239-1255.
- Poulin P, Krishnan K. (1996a) A mechanistic algorithm for predicting blood:air partition coefficients of organic chemicals with the consideration of reversible binding in hemoglobin. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 136(1):131-7.
- Poulin P, Krishnan K. (1996b) A tissue composition-based algorithm for predicting tissue:air partition coefficients of organic chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 136(1):126-30.
- Price K, Haddad S and Krishnan K (2003) Physiological modeling of age-specific changes in the pharmacokinetics of organic chemicals in children. *J. Toxicol. Environ. Health. A.*, 66:417-433.
- Ramsey JC and Andersen ME (1984) A physiologically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 73:159-175.
- Reddy, MB; Yang RSH; Clewell HJ; Andersen ME (2005) Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling, Science and Applications. Wiley-Interscience, NJ.
- Thrall KD, Gies RA, Muniz J, Woodstock AD, Higgins G. (2002) Route-of-entry and brain tissue partition coefficients for common superfund contaminants. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 65(24):2075-86.
- U.S. EPA (2002) NHEXAS Phase I Region 5 Study. http://oaspub.epa.gov/heds/study_list_frame.
- U.S.EPA (2006a) Framework for Assessing Health Risks of Environmental Exposures to Children. EPA/600/R-05/093F.
- U.S. EPA (2006b) Approaches for the Application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Models and Supporting Data in Risk Assessment. EPA/600/R-05/043F.
- U.S. National Research Council (2007) Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. Washington, DC: National Academy Press.
- 環境省 (2010) 第 2 回子供の健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査) 検討会 配布資料 7-基本計画 (案) .
- 桑 詩野, 吉田 喜久雄, 益永 茂樹 (2009) 年齢群別生物学的有効用量推定システムの構築と空气中芳香族炭化水素類への適用. *日本リスク研究学会誌*, 19(3):75-84.
- 酒井 康行 (2010) ヒトハザード評価における新しい流れと培養組織モデル. *化学工学*, 74(6):1-4.
- 森澤 眞輔 (2010) 有害化学物質による健康リスク評価: その現状と将来. *日本リスク研究学会誌*, 20(2):115-123.