

博士学位論文

生理学的薬物動態モデリング手法による  
ヒト体内動態を考慮した化学物質のリスク評価に関する研究

令和4年度

昭和薬科大学 大学院 薬学研究科

薬物動態学研究室

三浦 智徳



## 目次

序論 .....	1
第 I 章 動物の血中薬物濃度推移を再現する簡易生理学的薬物動態モデルによる肝中および尿中濃度の推定 .....	5
第 1 節 緒言 .....	5
第 2 節 実験材料および方法 .....	7
2-1 試薬、実験材料および実験動物 .....	7
2-2 <i>In vivo</i> 化学物質代謝消失 .....	9
2-3 <i>In vitro</i> 化学物質代謝消失 .....	9
2-4 生体由来試料中の薬物分析 .....	10
2-5 血液中への漏出ヒトアルブミン mRNA 検出 .....	13
2-6 簡易 PBPK モデルを用いた化学物質の動物体内動態の前向き予測 .....	14
2-7 統計学的解析 .....	20
第 3 節 結果 .....	24
3-1 化学物質の動物生体内動態予測 .....	24
3-2 化学物質の動物に対する毒性評価 .....	36
第 4 節 考察 .....	38
第 II 章 ヒト由来の生体試料から検出され得る化学物質のリスク評価 .....	45
第 1 節 緒言 .....	45
第 2 節 実験方法 .....	47
2-1 簡易 PBPK モデルを用いた化学物質のヒト体内動態の前向き予測 .....	47
2-2 簡易 PBPK モデルを用いた化学物質のヒト体内動態の後ろ向き予測 .....	49
第 3 節 結果 .....	51
3-1 ヒト血中バイオモニタリング濃度を用いた化学物質の曝露量評価 .....	51
3-2 ヒト尿中バイオモニタリング濃度を用いた化学物質の曝露量評価 .....	55
3-3 PBPK モデル用入力パラメータ値と既報バイオモニタリング濃度の関係 .....	59
第 4 節 考察 .....	60
総括 .....	65
本論文内容の誌上発表 .....	69

謝辭 .....	70
參考文獻 .....	71

## 序論

生活環境下には、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性のある様々な一般化学物質が存在している。これらの一般化学物質は、工業用製品、生活用品、化粧品および医薬品等の多様な原料として使用されており、一般化学物質はヒトの生活に大きな恩恵を与えている。意図的に一般化学物質を体内へ取り込むことは少ないが、ヒトは日々、一般化学物質に曝露され続けている。近年の高感度分析技術の向上により、ヒトの血中および尿中等から予想外に種々の一般化学物質が濃度情報として検出されている。しかしながら、これらの安全性が懸念される一般化学物質のヒト経口曝露量の情報および経口曝露量と生体内濃度との関係は十分に検討されていない。

揮発性有機化合物であるスチレンは、ポリスチレン等を原料としたプラスチック製の食品容器や飲み物のカップおよび絨毯の繊維等に含まれている(Withey, 1976; Alwis et al., 2012; Niaz et al., 2017)。アニリンや種々ジメチルアニリン誘導体は、工業中間体、繊維染料、化粧品および医薬品等の原料として使用されている(Stabbert et al., 2003; Pauluhn, 2004; Bugosen et al., 2020; Chinthakindi and Kannan, 2021; Chinthakindi and Kannan, 2022a; Chinthakindi and Kannan, 2022b)。これらの化学物質は発がん性リスクの可能性および血液毒性の可能性が懸念されている(Lewalter and Korallus, 1985; Goncalves et al., 2001; Sexton et al., 2006; Chinthakindi and Kannan, 2022a)。工業用溶媒であるブロモベンゼン、1,2-ジブロモベンゼン、1,4-ジブロモベンゼンおよび臭素系難燃剤であるテトラブロモビスフェノール A (TBBPA) は、生活環境下や食品中等に存在している(Lau and Monks, 1988; Chakrabarti, 1991; Szymanska et al., 1998; Hakk and Letcher, 2003; Hays and Kirman, 2019; Wang et al., 2019)。フタル酸ジエステル類である炭素鎖 4 のフタル酸ジブ

チル (DBP) および炭素鎖 9 のフタル酸ジイソノニル (DINP) は、プラスチック製品や医療製品の包装等の汎用性可塑剤として世界的に生産されている (Hellwig et al., 1997; Wine et al., 1997; Silva et al., 2003; Koch et al., 2006)。しかしながら、これらの化学物質は、肝毒性、生殖毒性等の潜在的な臓器毒性リスクが懸念されている (Kluwe et al., 1983; Lau and Monks, 1988; Chakrabarti, 1991; Hellwig et al., 1997; Szymanska et al., 1998; Hakk and Letcher, 2003; Hays and Kirman, 2019; Wang et al., 2019)。

一般化学物質の多様な潜在的リスクは、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) に基づき、一般にラット等のげっ歯類に 28 日間反復経口投与した際の生死や組織への影響等の結果から、体重当たりの化学物質投与量を用いて評価される。しかしながら、これらをヒトに適用するために、画一的に動物とヒトとの種差 10、個体差 10 の合計 1/100 の安全係数を掛けた基準値として取り扱われ、それらの生体内動態の差異はほとんど考慮されていない。

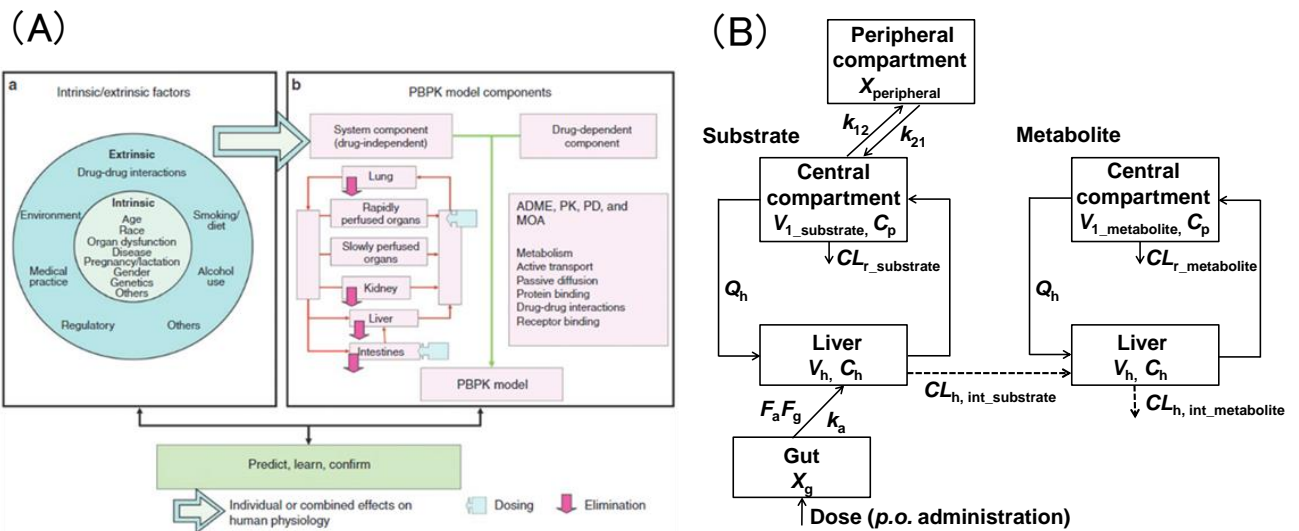
ヒト型モデル動物である免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植したマウス (ヒト肝キメラマウス) は、肝臓の種差を考慮することなくヒト型肝代謝を再現でき、薬物動態研究等に広く利用され始めている (Hasegawa et al., 2011)。肝臓の種差を考慮することなく、ヒト肝キメラマウス *in vivo* データを直接ヒトに外挿し、化学物質のヒト体内動態および毒性を評価してきた実績がある (Adachi et al., 2015; Miyaguchi et al., 2015)。

生理学的薬物動態 (PBPK) モデルは、生体側の生理学的情報と物質側の物理化学的情報を基に、化合物の薬物動態を解析する数理的モデルである。薬物血中モニタリング結果や毒性発現を正確に予測する複雑な PBPK モデルは、医

薬領域や医薬品開発領域等で一般的に広く利用されている(Zhou, 2009; Huang and Rowland, 2012; Wambaugh et al., 2018; Sayre et al., 2020; Emoto et al., 2021)。しかしながら、これら複雑な PBPK モデルは高精度に体内動態を予測することが可能である一方、極めて煩雑なモデルであり習得や適用が困難である。Fig. 1 に示すように、医薬領域で利用されている Full PBPK モデルに対比して、小腸、肝臓、全身循環および/または末梢の最小コンパートメントで構成された簡易 PBPK モデルは、医薬品や化学物質の生体外からの経口曝露量と生体内の濃度を双方向かつ迅速に計算することが可能であり、研究者誰もが比較的容易に取り扱うことができる簡易モデルである (Adachi et al., 2015; Miyaguchi et al., 2015; Yamazaki et al., 2016; Miura et al., 2021)。

以上の背景から、化学物質の生体外からの曝露量から生体内濃度を前向きに予測する「Forward dosimetry」および生体内濃度から生体外の曝露量を後ろ向きに予測する「Reverse dosimetry」の双方向を予測し、ヒト体内動態を考慮した複合的な化学物質のリスク評価手法が重要である。ヒト型モデル動物および簡易 PBPK モデルを組み合わせることは、化学物質の経口曝露量と生体内濃度を双方向に予測し、ヒト体内動態を考慮した化学物質リスク評価の新汎用手法となる可能性がある。そこで本研究では、ヒト型モデル動物および簡易 PBPK モデルを活用し、ヒト由来の生体試料から検出され得る化学物質を取り上げ、物質としての経口曝露量と生体内濃度を双方向に予測し、ヒト体内動態を加味する化学物質のリスク評価手法の検討を目的とした。第 I 章では、文献報告のあった血中薬物濃度もしくは最小限の動物実験を基に、簡易的にヒト型モデル動物の血中、肝中および尿中濃度を前向きに予測し得る簡易 PBPK モデルを構築し、化学物質の生体内動態および毒性の予測手法を検討した。第 II 章では、ヒト由

来の生体試料から濃度として検出された化学物質を取り上げ、動物 PBPK モデルから構築したヒト PBPK モデルを活用し、既報ヒトバイオモニタリング濃度から経口曝露量を後ろ向きに予測し、生活環境下における化学物質のリスク評価を検討した。本研究によって、ヒト型モデル動物および簡易 PBPK モデルを組み合わせ、ヒト体内動態を考慮した化学物質リスク評価の新手法を得たので、以下に詳述する。



**Fig. 1. Full (A) and simplified (B) PBPK model structures.** The schemes in panels A and B were taken from (Huang and Rowland, 2012) and (Miura et al., 2021), respectively.



## 第 I 章 動物の血中薬物濃度推移を再現する簡易生理学的薬物動態モデルによる肝中および尿中濃度の推定

### 第 1 節 緒言

揮発性有機化合物であるスチレンは、ポリスチレン等を原料としたプラスチック製の食品容器や飲み物のカップおよび絨毯の繊維等に含まれており、発がん性のリスクが懸念されている(Withey, 1976; Sexton et al., 2006; Alwis et al., 2012; Niaz et al., 2017)。スチレンとヒトのがん形態の因果関係を示す疫学的根拠は明らかではないが(Rueff et al., 2009)、特定の揮発性有機化合物の長期的曝露はがんや先天性疾患へのリスクの可能性を増大させるため、国際がん研究機関ではスチレンを含むヒト発がん物質グループ B の揮発性有機化合物の曝露量を推定することに関心が高まっている(Sexton et al., 2006)。揮発性有機化合物の毒性予測のために PBPK モデルが使用されてきた(Ramsey and Andersen, 1984; Kirman et al., 2003; Krishnan and Johanson, 2005)。スチレンの主要尿中排泄物は、工場等の作業領域での曝露モニタリングより報告されている(Takeuchi et al., 2019)。米国疾病管理予防センターの環境化学物質のヒトへの曝露に関する報告([https://www.cdc.gov/exposurereport/data\\_tables.html](https://www.cdc.gov/exposurereport/data_tables.html))によると、ヒト血液試料中のスチレン濃度は低値であったと報告されている。しかしながら現在まで、スチレンのヒトへの曝露量と生体内濃度の評価は実施されていない。

ブロモベンゼンは主に肝臓で毒性を誘発する工業用溶媒である(Lau and Monks, 1988; Chakrabarti, 1991; Szymanska et al., 1998)。ブロモベンゼン、1,2-ジブロモベンゼンおよび 1,4-ジブロモベンゼンに関する代謝および毒性は、約 20 年以上前から知られてきた(Szymanska et al., 1998; Szymanska and Piotrowski,

2000; Szymanska et al., 2002; Dodd et al., 2013)。臭素系難燃剤である TBBPA は生活環境下や食品中に存在しており、近年、ヒト生体内からも検出されたことから、TBBPA の潜在的な健康リスクが懸念されている (Hakk and Letcher, 2003; Hays and Kirman, 2019; Wang et al., 2019)。TBBPA はその有用性の高さと毒性ハザードの低さ故に、最も広く使用されている臭素系難燃剤の一つである (Hakk and Letcher, 2003; Borghoff et al., 2016; Hays and Kirman, 2019)。近年、化学物質のヒトへの曝露評価や健康モニタリングを確立するために、バイオモニタリング報告データがますます注目され始めている。

フタル酸ジエステル類である炭素鎖 4 の DBP および炭素鎖 9 の DINP は、プラスチック製品や医療製品の包装等の汎用性可塑剤として世界的に生産されている (Hellwig et al., 1997; Wine et al., 1997; Silva et al., 2003; Koch et al., 2006)。近年、炭素側鎖の短い DBP は、毒性の観点から炭素側鎖が長いフタル酸ビス (2-エチルヘキシル) (DEHP) や DINP 等に代替されはじめている。

アニリンおよびジメチルアニリン誘導体は、工業中間体、繊維染料、化粧品および医薬品等の原料として使用されている (Stabbert et al., 2003; Pauluhn, 2004; Bugosen et al., 2020; Chinthakindi and Kannan, 2021; Chinthakindi and Kannan, 2022a; Chinthakindi and Kannan, 2022b)。2020 年には、840 万トンものアニリンが世界中で生産されている一方で、アニリンおよびジメチルアニリン誘導体はヒトでの発がん性の可能性が報告されている (Chinthakindi and Kannan, 2022a)。アニリンおよびジメチルアニリン誘導体は、血液毒性が報告されている *N*-水酸化体および排泄可能なアミノ基のグルクロン酸抱合体へ代謝されることが報告されている (Lewalter and Korallus, 1985; Goncalves et al., 2001)。特に、アニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンは、複数の国で収集された室内の空気、室内のほこりおよび

たばこの煙等から検出されている (Palmiotto et al., 2001; Stabbert et al., 2003; Zhang et al., 2017; Chinthakindi and Kannan, 2021; Chinthakindi and Kannan, 2022b; Chinthakindi and Kannan, 2022a)。これらは一般的にペットとしてのイヌやネコの尿糞中からも検出されている (Chinthakindi and Kannan, 2022b; Chinthakindi and Kannan, 2022a)。

種々化学物質の動物とヒトの体内動態予測および毒性を評価し得る手法が求められている。そこで、ヒト型モデル動物および最小コンパートメントに着目した簡易 PBPK モデルを組み合わせ、化学物質の物質質量から動物血中、肝中および尿中濃度を推定し得る前向き予測手法を考案し、新手法の基盤を構築した。第 I 章では、生体への毒性が懸念されている比較的低分子の化学物質を取り上げ、ヒト型モデル動物および簡易 PBPK モデルを活用し、化学物質の物質質量から動物の血中、肝中および尿中濃度を前向きに予測することを目的とした。

## 第 2 節 実験材料および方法

### 2-1 試薬、実験材料および実験動物

スチレン (CAS 番号 100-42-5) は富士フイルム和光純薬 (大阪) から購入した。ブロモベンゼン (CAS 番号 108-86-1)、1,2-ジブロモベンゼン (CAS 番号 583-53-9)、1,4-ジブロモベンゼン (CAS 番号 106-37-6)、TBBPA (CAS 番号 79-94-7)、DBP (CAS 番号 84-74-2)、フタル酸モノブチル (MBP) (CAS 番号 131-70-4)、アニリン (CAS 番号 62-53-3)、2,3-ジメチルアニリン (CAS 番号 87-59-2)、2,4-ジメチルアニリン (CAS 番号 95-68-1)、2,5-ジメチルアニリン (CAS 番号 95-78-3)、2,6-ジメチルアニリン (CAS 番号 87-62-7)、*N*,2-ジメチルアニリ

ン (CAS 番号 611-21-2)、3,5-ジメチルアニリン (CAS 番号 108-69-0) は、東京化成工業 (東京) より購入した。DINP (CAS 番号 28553-12-0) は、ベンゼン環部分に  $^{14}\text{C}$  を有する  $^{14}\text{C}$ -DINP として Curachem (Cheongju, Korea) で合成したものをを用いた。ウリジン二リン酸グルクロン酸 (UDPGA) および  $\beta$ -グルクロニダーゼは、それぞれ Sigma-Aldrich (ST. Louis, MO, USA) および富士フイルム和光純薬から購入した。その他の試薬は市販品の最高純度のものを使用した。

Sprague-Dawley ラットの肝マイクロゾームは Yamashita ら (Yamashita et al., 2014) が調製したものをを使用した。CD-1 マウスおよびヒト (HL150) のプールされた肝マイクロゾームは、Corning Life Sciences (Corning, NY, USA) から購入した。Sprague-Dawley ラットおよびヒトのプールされた肝 9000×g supernatant fractions (S9)、ならびに Sprague-Dawley ラット、CD-1 マウスおよびヒトのプールされた小腸マイクロゾームは、Xenotech (Kansas, KS, USA) から購入した。

ラットは日本チャールス・リバー (東京) から 6 週齢雄性ラット (140-220 g BW) を購入した。ヒト肝キメラマウスおよび対照マウスは、それぞれ公益財団法人実験動物中央研究所において作成された 17-18 週齢雄性もしくは雌性 TK-NOG マウス (20-30 g BW) ならびにヒト肝キメラマウス (20-30 g BW) を使用した (Uehara et al., 2021)。血漿中ヒトアルブミン濃度の測定により、90%以上のマウス由来肝細胞がヒト肝細胞に置換しているヒト肝キメラマウスを実験に用いた (Hasegawa et al., 2011; Yamazaki et al., 2016)。実験動物の使用は、昭和薬科大学、新日本科学および実験動物中央研究所の各動物委員会において承認された上で研究を実施した。

## 2-2 *In vivo* 化学物質代謝消失

ラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウス（各 3-5 匹）に第 2 節 2-1 項に記載した化学物質を 25-1000 mg/kg 単回経口投与した。各投与量は、各化学物質の血液、肝臓および腎臓毒性データベースに記載されている投与量を基に決定した(Jenkins et al., 1972; Hakk and Letcher, 2003; Sakuratani et al., 2013; Borghoff et al., 2016; Hays and Kirman, 2019; Kamiya et al., 2019; Kamiya et al., 2020)。DINP は多くの異性体で構成されていることから、ベンゼン環部分に  $^{14}\text{C}$  を有する  $^{14}\text{C}$ -DINP を選定した。各動物血液試料は、単回経口投与 0.083-24 時間後に採取し、40-160  $\mu\text{L}$  のアセトニトリルもしくはメタノールを添加し、20000 $\times$ g、4 $^{\circ}\text{C}$  で 15 分遠心分離を行い、各動物血漿試料（ $\sim 20 \mu\text{L}$ ）として分取した。ヒト肝キメラマウスの肝臓試料は、単回経口投与 2 時間後の肝臓を摘出し試料として採取した。採取した肝臓試料（ $\sim 1.5 \text{ g}$ ）をホモジネートした後、1.5 mL のアセトニトリルを添加し、10 分間超音波処理し、20000 $\times$ g、4 $^{\circ}\text{C}$  で 15 分遠心分離を行い分析試料とした。各動物尿糞試料は、単回経口投与後 48 時間の蓄尿および蓄糞として採取した。採取した尿試料（10-20  $\mu\text{L}$ ）に 40-90  $\mu\text{L}$  のアセトニトリルを添加し、20000 $\times$ g、4 $^{\circ}\text{C}$  で 15 分遠心分離を行い分析試料とした。採取した糞試料（50 mg）に精製水（ $\sim 500 \mu\text{L}$ ）を添加し、ホモジネートを行い、2 倍量のアセトニトリル添加後 20000 $\times$ g、4 $^{\circ}\text{C}$  で 15 分遠心分離を行い分析試料とした。

## 2-3 *In vitro* 化学物質代謝消失

第 2 節 2-1 項に記載した各動物の肝ミクロゾーム、肝 S9 もしくは小腸ミクロゾーム（0.10-0.50 mg protein/mL）に 100 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）もしくは 100 mM Tris-HCl（pH 6.5）、NADPH 産生系（0.25 mM NADP $^{+}$ 、2.5 mM G-

6-P、0.25 unit/mL G-6-P DH) もしくは 20 mM UDPGA、1.0 mM アセチル CoA、5 mg/mL アラメシチン、50 mM 塩化マグネシウムおよび第 2 節 2-1 項に記載した各基質 (10-100  $\mu$ M) を加え、全量を 100-200  $\mu$ L とし、37°C で 20-30 分間インキュベーションした。反応後、氷上でアセトニトリル (100-200  $\mu$ L) を添加し反応を停止させた。攪拌後、20000 $\times$ g、4°C で 10 分間遠心分離し、得られた上清 (10-20  $\mu$ L) を分析試料とした。各酵素源を用いた化学物質の *in vitro* 代謝消失速度は、基質の消失率から算出した。

#### 2-4 生体由来試料中の薬物分析

各分析試料の測定は、液体クロマトグラフ (Prominence-i LC-2030C, SHIMADZU, Kyoto, Japan) およびオクタデシルシラン (C18) カラム (Mightysil RP-18 GP Aqua, 5  $\mu$ m, 4.6 mm, 250 mm, KANTO CHEMICAL CO. INC., Tokyo, Japan) を基本として使用し、注入量は 10  $\mu$ L、カラム温度は 35-40°C、流速は 1.0 mL/min を基本とした。例外として、ブロモベンゼン、1,2-ジブロモベンゼンおよび 1,4-ジブロモベンゼンの測定時の流速は 0.3 mL/min とした。各測定物質に応じて、移動相および測定波長を変更した。ブロモベンゼン、1,2-ジブロモベンゼンおよび 1,4-ジブロモベンゼン測定時の移動相は、メタノールおよび酢酸 (55:45) を使用した。TBBPA およびそのグルクロン酸抱合体測定時の移動相は、メタノールおよび 0.1% 酢酸 (70:30) を使用し、保持時間はそれぞれ、TBBPA グルクロン酸抱合体は 5.3 分、TBBPA は 16 分であった。MBP およびそのグルクロン酸抱合体測定時の移動相は、アセトニトリルおよび 0.1% 酢酸 (60:40) とした。保持時間はそれぞれ、MBP グルクロン酸抱合体が 4.8 分、MBP が 5.1 分であった。*In vitro* 測定試料としてのアニリンもしくは 2,6-ジメチルアニリン測定時の移動相は、20% もしくは 30% アセトニトリルを使用した。各測定物質の測定波

長はそれぞれ、ブロモベンゼン誘導体測定時は UV 210 nm、TBBPA およびそのグルクロン酸抱合体測定時は UV214 nm、MBP およびそのグルクロン酸抱合体測定時は UV240 nm、アニリンおよび 2,6-ジメチルアニリン測定時は UV254 nm とした。上述以外の分析機器および条件にて測定した物質を、以下に記述する。

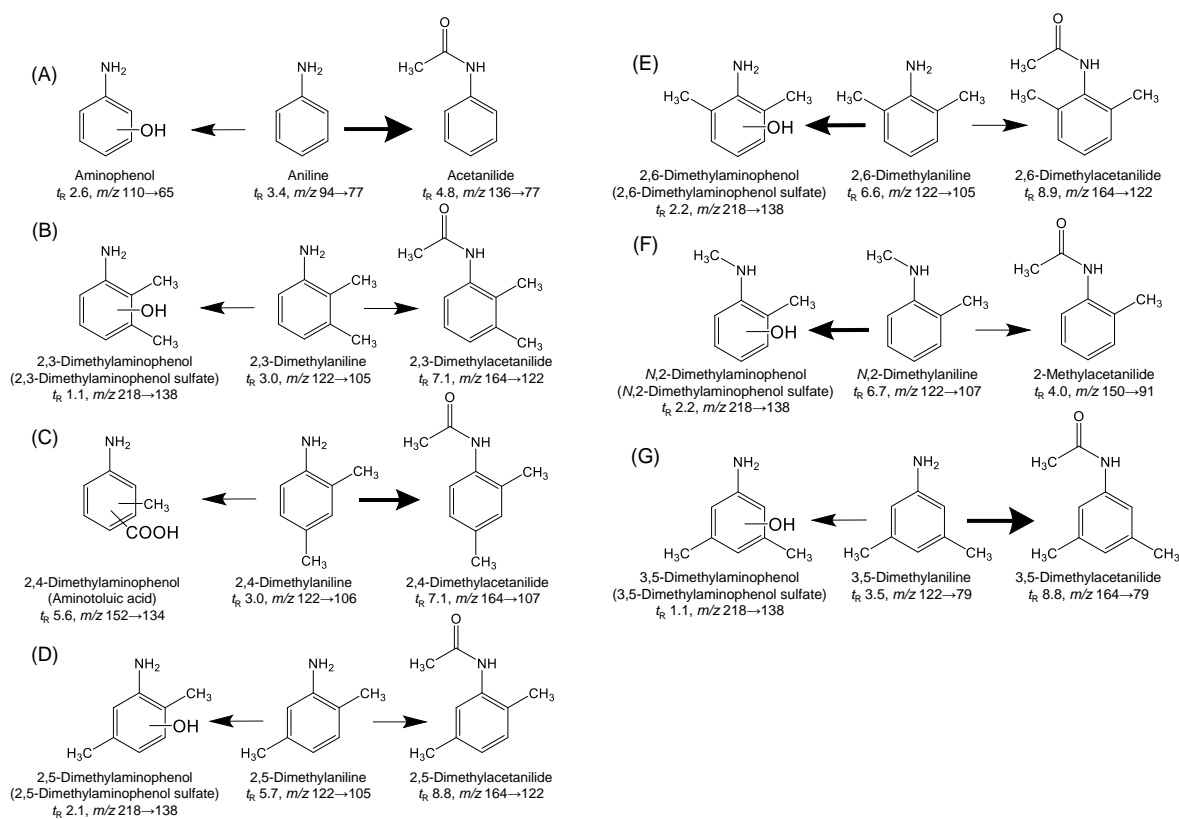
スチレンは第一種指定化学物質であるため、新日本科学薬物代謝分析センターにて分析を行った。測定には液体クロマトグラフィーを採用し、分離カラムにオクタデシルシラン (C18) カラム (YMC-Triart C18 plus 3  $\mu$ m, 2.1  $\times$  50 mm, YMC, Kyoto, Japan) および検出系としてタンデム質量分析計を使用した。移動相は、(A) 0.1% 酢酸と (B) メタノールを用いて分析した。測定条件は、(A) の濃度を 30% から開始し、2 分から 10% に低下させ、その後 2 分から 4 分まで 0% を維持した。4 分から 30% とした後、6 分まで維持した。流速は 0.3 mL/分、注入量は 5  $\mu$ L、カラム温度は 40°C とした。スチレンのトランジションは  $m/z$  104.2  $\rightarrow$  103.1 を使用し、スチレン- $d_5$  のトランジションは  $m/z$  109.2  $\rightarrow$  108.1 で測定した。キャピラリー温度は 600 °C に設定した。

血漿試料中 DINP およびその複数の代謝物の測定は液体クロマトグラフィーシンチレーションカウンターシステム (LC equipped with Tri-Carb 3100TR scintillation counter; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を使用し、尿糞試料中の測定は液体クロマトグラフィーラジオアイソトープ検出器システム (LC equipped with Radiomatic 625TR detector; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を使用した。カラムは UK-C8 カラム (3 mm, 4.6mm, 150 mm, Imtakt, Kyoto, Japan) を使用した。移動相は、(A) アセトニトリルと (B) 0.1% 酢酸水溶液を用い、(A) と (B) のグラジエントにより分析した。グラジエント条件は、(A) の濃度を 2 % から開始し、45 分までに 90% まで上昇させ、50 分まで維持した。その後 60 分までに 2%

まで低下させた。流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 40°C とした。DINP およびその複数の代謝物は、ラジオクロマトグラムより測定した観測ピーク面積から定量化した。これらの構造は、エレクトロスプレーネガティブイオン化モードでタンデム質量分析計と Accela/LTQ orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定した。フタル酸モノイソノール (MINP) は  $m/z$  291.15976→291.16031、carboxylated MINP は  $m/z$  321.13397→321.13440、hydroxylated MINP は  $m/z$  307.15469→307.15515、carbonylated MINP は  $m/z$  305.13925→305.13953、MINP グルクロン酸抱合体は  $m/z$  467.19177→467.19223、carboxylated MINP グルクロン酸抱合体は  $m/z$  497.16547→497.16641、hydroxylated MINP グルクロン酸抱合体は  $m/z$  483.18646→483.18735、carbonylated MINP グルクロン酸抱合体は  $m/z$  481.17084→478.17178 とした。

*In vivo* 測定試料としてのアニリンおよびジメチルアニリン誘導体の基質および代謝物の測定は、液体クロマトグラフィー、C18 カラム (YMC-Triart C18 plus 3  $\mu$ m, 2.1  $\times$  50 mm, YMC) およびタンデム質量分析計を使用した。移動相は、(A) メタノールと (B) 10 mM 酢酸アンモニウムを用い、(A) と (B) のグラジエントにより分析した。グラジエント条件は、(A) の濃度を 5% から開始し、6.5 分で 65% まで上昇させ、その後 100% として 8.5 分まで維持した。その後 5% まで低下させ 10.5 分まで維持した。流速は 0.3 mL/min、注入量は 10  $\mu$ L、カラム温度は 40°C とした。アニリンおよびジメチルアニリン誘導体の各保持時間 ( $t_R$ ) およびトランジションは、**Fig. I-1** に図示する。アニリンおよびジメチルアニリン誘導体の代謝物は、液体クロマトグラフィーより測定した観測ピーク面積値を用いて半定量した。





**Fig. I-1. Predominant and minor (arrows) metabolic pathways of aniline (A); 2,3-dimethylaniline (B); 2,4-dimethylaniline (C); 2,5-dimethylaniline (D); 2,6-dimethylaniline (E); *N*,2-dimethylaniline (F); and 3,5-dimethylaniline (G) to their oxidative or acetylated metabolites in rats as determined using liquid chromatography–tandem mass spectrometry.**

## 2-5 血液中への漏出ヒトアルブミン mRNA 検出

RNA は、ヒト肝キメラマウスから採取した血漿試料 (15  $\mu$ L) から miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN, Venlo, NLD) を用いて、推奨されているプロトコールに従って調製した。RNA (9.0  $\mu$ g) を High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写し、Murayama ら (Murayama et al., 2018) の方法に従い、ヒトアルブミン用プライマー、*TaKaRa LA Taq* DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ、滋賀) および Applied Biosystems 2720 thermocycler (Thermo Fisher Scientific) を用いて、33 サイクルの伸長反応を行った。その後、4% アガロースゲルを用いて電気泳動し、検出されるバンドの強度にて判定を行った。

## 2-6 簡易 PBPK モデルを用いた化学物質の動物体内動態の前向き予測

PBPK モデルを化学物質のリスク評価に活用し得るようにするために、序論で述べたように (Fig. 1B)、消化管  $X_g$ 、肝  $V_h$ 、全身循環分布容積  $V_1$  および/または末梢  $X_{\text{peripheral}}$  の限定されたコンパートメント (Adachi et al., 2015; Shimizu and Yamazaki, 2017; Kamiya et al., 2021; Miura et al., 2021; Kamiya et al., 2022) に焦点を絞り、化合物濃度の時間推移を記述した。本研究の進捗に応じ、一部の化合物の血中薬物濃度の再現には、代謝物の末梢コンパートメントの追加、および  $V_1$  より腎  $V_r$  の独立、あるいは未変化体に限定した。生体外からの曝露量から生体内濃度を前向きに予測する「Forward dosimetry」および生体内濃度から生体外の曝露量を後ろ向きに予測する「Reverse dosimetry」の双方向予測を可能とした簡易 PBPK モデルを利用した。

ラットおよびマウスの生体側の定数は、文献情報 (Ramsey and Andersen, 1984; Davies and Morris, 1993; Brown et al., 1997; Eriksson et al., 1998; Hurst et al., 1999; Clewell et al., 2000; Kato et al., 2008; Sweeney et al., 2008) より以下のように設定した (Table I-1)。ヒト肝キメラマウスの生体側の定数は対照マウスと同値とした。腎血流量 ( $Q_r$ ) の値は肝血流量 ( $Q_h$ ) と同様の値とした。 $V_b$  および  $V_u$  はそれぞれ血液量および一日当たりの尿量を示す。

**Table I-1. Physiological parameters in rat and mouse**

Physiological parameters	Rat	Mouse
Body weight (kg)	0.25	0.025
Liver weight (g)	10.0	1.50
$Q_h$ (L/h)	0.853	0.160
$Q_r$ (L/h)	0.853	0.160
$V_h$ (L)	0.00850	0.000850
$V_r$ (L)	0.00370	0.000340
$V_b$ (L)	0.0160	0.00160
$V_u$ (mL/day)	10.0	1.0

本研究にて注目した化学物質およびそれらの代謝物の構造に着目し、Simcyp (Certara, Princeton, NJ)、ChemBioDraw (HULINKS Inc., Tokyo, Japan) および Percepta (Advanced Chemistry Development, Toronto, ON, Canada) ソフトウェアを用いて物質固有記述子を決定した。物質固有の分子量とソフトウェアで算出した酸解離定数と血漿タンパク非結合率 ( $f_{u,p}$ ) を用い、既報 (Uchimura et al., 2008; Emoto et al., 2009; Tsukada et al., 2013) に基づき算出した血液中-血漿中薬物濃度比 ( $R_b$ ) および肝または腎血液分配係数 ( $K_{p,h}$  または  $K_{p,r}$ ) (Poulin and Theil, 2002) を **Table I-2** に示す。 $K_b$  は血液分配係数を示す。

$$K_{p,h} = \frac{0.02289 \cdot P + 0.72621}{0.00396 \cdot P + 0.960581} \cdot \frac{f_{u,p} + 1}{2} \quad \text{式 (1)}$$

$$K_b = 10^{\log K_b} \quad \text{式 (2)}$$

$$\log K_b = 0.617 \cdot \log \left( \frac{1 - f_{u,p}}{f_{u,p}} \right) + 0.208 \quad \text{式 (3)}$$

$$R_b = 0.45 \cdot (K_b \cdot f_{u,p} - 1) + 1 \quad \text{式 (4)}$$

後述するように、DBP 経口投与後の動物血漿中および尿中からは DBP は検出されず、複数の代謝物が検出されたことより、検出された MBP を見かけの親化合物、MBP グルクロン酸抱合体を見かけの代謝物と見なして、PBPK モデル用入力パラメータ値を決定した。同様に、DINP 経口投与後の動物血漿中および尿中からは DINP は検出されず、複数の代謝物が検出されたことより、検出された MINP およびそのグルクロン酸抱合体を合計して見かけの親化合物とし、carboxylated MINP、hydroxylated MINP、carbonylated MINP、およびそれらのグルクロン酸抱合体等の酸化的代謝物を合計して MINP 側鎖の水酸化体と見なして、PBPK モデル用入力パラメータ値を決定した。

**Table I-2. Physiological parameters for chemicals**

Parameter	Molecular weight	Octanol–water partition coefficient, $\log P$	Plasma unbound fraction, $f_{u,p}$	Blood–plasma concentration ratio, $R_b$	Liver (kidney)–plasma concentration ratio, $K_{p,h}$ and $K_{p,r}$
Styrene	104	2.86	0.136	0.859	0.859
Bromobenzene	157	3.01	0.118	0.847	2.69
1,2-Dibromobenzene	236	3.67	0.0636	0.793	2.94
1,4-Dibromobenzene	236	3.87	0.0524	0.777	2.96
Tetrabromobisphenol A	554	6.81	0.00126	0.602	2.89
Tetrabromobisphenol A glucuronide	706	5.20	0.00582	0.651	2.90
Diisononyl phthalate	419	9.76	0.000126	0.573	2.89
Monoisononyl phthalate	292	5.23	0.005	0.645	2.90
Hydroxylated monoisononyl phthalate	308	3.25	0.0244	0.723	3.29
Dibutyl phthalate	278	4.73	0.0222	0.717	2.94
Monobutyl phthalate	222	2.72	0.0376	0.752	2.17
Monobutyl phthalate glucuronide	398	0.563	0.193	0.889	0.495
Aniline	93	0.915	0.539	0.906	0.709
2,3-Dimethylaniline	121	1.81	0.317	0.920	1.20
2,4-Dimethylaniline	121	1.86	0.306	0.918	1.25
2,5-Dimethylaniline	121	1.86	0.306	0.918	1.25
2,6-Dimethylaniline	121	1.81	0.317	0.920	1.20
<i>N</i> ,2-Dimethylaniline	121	2.14	0.249	0.907	1.61
3,5-Dimethylaniline	121	1.91	0.296	0.917	1.31

各化学物質の実測血漿中濃度推移を基に、残渣法に基づきコンパートメントモデルの初期値を設定した。吸収率×腸管有効率 ( $F_a \cdot F_g$ ) の初期値は、以下の式を用いて算出した。一般比率として  $CL_h$  と  $CL_r$  は 9:1 となるように設定した (Kamiya et al., 2019; Kamiya et al., 2020)。

$$F_a \cdot F_g = 1 \quad \text{式 (5)}$$

$$CL_h = \frac{Q_h \cdot \text{Dose} - Q_h \cdot \text{AUC} \cdot CL_r}{\text{Dose} + Q_h \cdot \text{AUC}} \quad \text{式 (6)}$$

$$F = F_h = 1 - \frac{CL_h}{Q_h} \quad \text{式 (7)}$$

初期値から、非線形最小二乗法プログラム MULTI (Yamaoka et al., 1981) を用い、コンパートメントモデルによる薬物動態学的解析を行い、 $V_d$ 、 $k_a$  および  $k_{el}$  を算出した (Suemizu et al., 2014; Adachi et al., 2015; Miyaguchi et al., 2015; Yamazaki et al., 2016)。算出した各パラメータ値と以下に示す薬物動態公式から、 $CL_{tot}$ 、 $CL_r$ 、 $CL_h$ 、 $CL_{h,int}$  および  $V_1$  を算出し、初期値として設定した。

$$CL_{tot} = V_d \cdot k_{el} \quad \text{式 (8)}$$

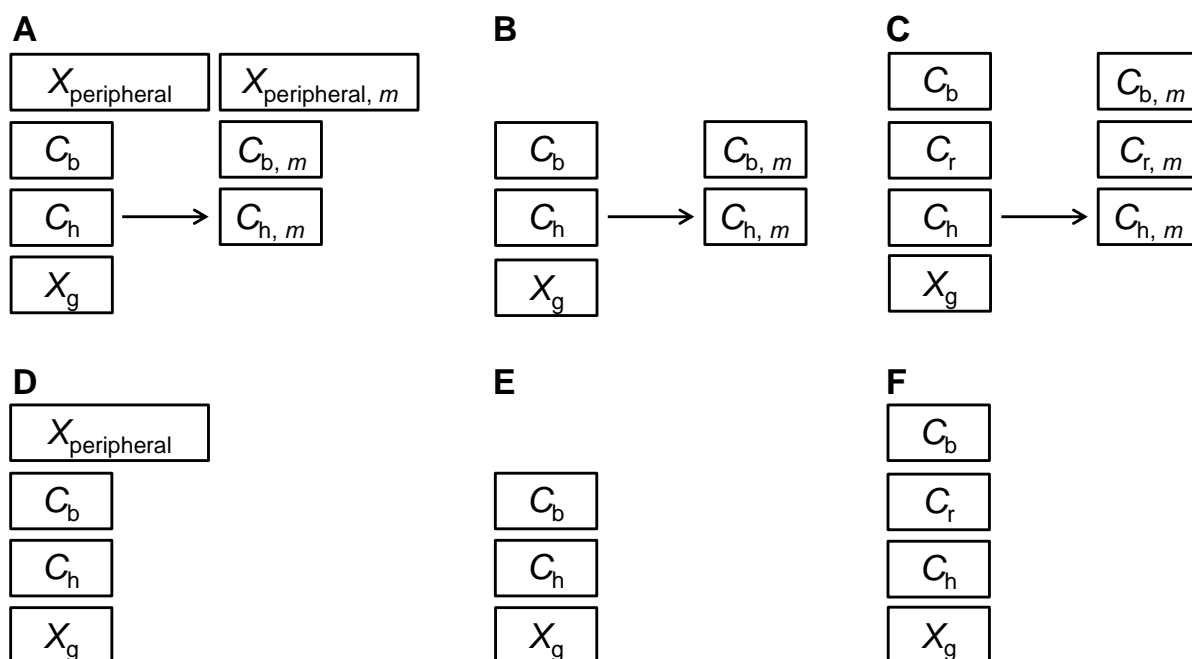
$$CL_h = CL_{tot} - CL_r \quad \text{式 (9)}$$

$$CL_{h,int} = \frac{R_b}{f_{u,p}} \cdot \frac{Q_h \cdot CL_h}{Q_h - CL_h} \quad \text{式 (10)}$$

$$V_1 = V_d \quad \text{式 (11)}$$

$$V_1 = (V_{ss} - V_b - V_h \cdot \frac{K_{p,h} \times F_h}{R_b}) / \frac{1 + f_{u,p}}{2} \quad \text{式 (12)}$$

後述する DBP を動物に単回経口投与した際の MBP および MBP グルクロン酸抱合体の実測血漿中濃度に基づき、新たに代謝物の末梢コンパートメントを追加し、**Fig. I-2A** に模式的に示す基質 MBP と代謝物 MBP グルクロン酸抱合体 (添字  $m$ ) モデルを採択し、以下の微分方程式 (13) から (21) を採択して解析した。



**Fig. I-2. Six systems for differential equations solved to model the concentrations of the substrate and/or its primary metabolite (indicated with subscript  $m$ ) in this study.**  $X_g$  and  $X_{peripheral}$  are substance amounts in gut and peripheral components.  $C_b$ ,  $C_h$ , and  $C_r$  are blood, hepatic, and renal substance concentrations. *In vivo* concentrations of DBP and its metabolites, DINP and its metabolites, and TBBPA and its metabolites were modeled with the differential equations A, B, and C, respectively. *In vivo* concentrations of styrene, bromobenzene, and aniline derivatives were modeled with the differential equations D, E, and F, respectively.

$$\frac{dX_g}{dt} = -k_a \cdot X_g \quad \text{when at } t = 0, X_g(0) = Fa \cdot Fg \cdot \text{dose} \quad \text{式 (13)}$$

$$V_h \frac{dC_h}{dt} = Q_h \cdot C_b - \frac{Q_h \cdot C_h \cdot R_b}{K_{p,h}} + k_a \cdot X_g - CL_{h,int} \cdot \frac{C_h}{K_{p,h}} \cdot f_{u,p} \quad \text{式 (14)}$$

$$V_1 \frac{dC_b}{dt} = -Q_h \cdot C_b + \frac{Q_h \cdot C_h \cdot R_b}{K_{p,h}} - k_{12} \cdot V_1 \cdot C_b + k_{21} \cdot X_{peripheral} - CL_r \cdot C_b \quad \text{式 (15)}$$

$$V_u \frac{dC_u}{dt} = CL_r \cdot C_b \quad \text{式 (16)}$$

$$\frac{dX_{peripheral}}{dt} = k_{12} \cdot V_1 \cdot C_b + k_{21} \cdot X_{peripheral} \quad \text{式 (17)}$$

$$V_{h,m} \frac{dC_{h,m}}{dt} = Q_h \cdot C_{b,m} - \frac{Q_h \cdot C_{h,m} \cdot R_{b,m}}{K_{p,h,m}} + CL_{h,int} \cdot \frac{C_h}{K_{p,h}} \cdot f_{u,p} - CL_{h,int,m} \cdot \frac{C_{h,m}}{K_{p,h,m}} \cdot f_{u,p,m} \quad \text{式 (18)}$$

$$V_{1,m} \frac{dC_{b,m}}{dt} = -Q_h \cdot C_{b,m} + \frac{Q_h \cdot C_{h,m} \cdot R_{b,m}}{K_{p,h,m}} - k_{12,m} \cdot V_{1,m} \cdot C_{b,m} + k_{21,m} \cdot X_{peripheral,m} - CL_{r,m} \cdot C_{b,m} \quad \text{式 (19)}$$

$$V_{u,m} \frac{dC_{u,m}}{dt} = CL_{r,m} \cdot C_{b,m} \quad \text{式 (20)}$$

$$\frac{dX_{peripheral,m}}{dt} = k_{12,m} \cdot V_{1,m} \cdot C_{b,m} + k_{21,m} \cdot X_{peripheral,m} \quad \text{式 (21)}$$

$X_g$  および  $X_{\text{peripheral}}$  は消化管および末梢における基質量、 $C_h$ 、 $C_r$  および  $C_b$  はそれぞれ肝、腎および血中の時間依存的に変動する基質濃度を表す。

実験動物での血中濃度—時間推移曲線を再現する際、末梢コンパートメントを必要としない事例も存在する。本事例に該当する DINP を単回経口投与した際の MINP および MINP 酸化代謝物の実測血漿中濃度推移に基づき、**Fig. I-2B** に模式的に示すように、上記の式 (15) および式 (19) をそれぞれ末梢への物質移行を考慮しない下記の式 (22) および式 (23) に変更し、式 (13)、(14)、(16)、(18)、(20)、(22) および (23) を採択して解析した。

未変化体スチレンの実測血中濃度推移に基づき、**Fig. I-2D** に模式的に示す上記の式 (13) から式 (17) を PBPK モデルに採用した。同様に、未変化体ブロモベンゼン、1,2-ジブロモベンゼンおよび 1,4-ジブロモベンゼンの実測血中濃度推移に基づき、**Fig. I-2E** に模式的に示す簡易的な PBPK モデルを、物質毎に個別に設定し、上記の式 (13)、(14)、(16) および (22) を採択した。

$$V_1 \frac{dC_b}{dt} = -Q_h \cdot C_b + \frac{Q_h \cdot C_h \cdot R_b}{K_{p,h}} - CL_r \cdot C_b \quad \text{式 (22)}$$

$$V_{1,m} \frac{dC_{b,m}}{dt} = -Q_h \cdot C_{b,m} + \frac{Q_h \cdot C_{h,m} \cdot R_{b,m}}{K_{p,h,m}} - CL_{r,m} \cdot C_{b,m} \quad \text{式 (23)}$$

TBBPA を単回経口投与した際の TBBPA および TBBPA グルクロン酸抱合体の実測血漿中濃度推移に基づき、**Fig. I-2C** に模式的に示す腎を独立させた基質と代謝物からなる PBPK モデル採択した。すなわち、式 (15) および (19) をそれぞれ下記の式 (24) および (26) に変更し、新たに式 (25) および (27) を追加し、式 (13)、(14)、(16)、(18)、(20)、(24)、(25)、(26) および (27) を採択した。

$$V_1 \frac{dC_b}{dt} = -(Q_h + Q_r) \cdot C_b + \frac{Q_h \cdot C_h \cdot R_b}{K_{p,h}} + \frac{Q_r \cdot C_r \cdot R_b}{K_{p,r}} \quad \text{式 (24)}$$

$$V_r \frac{dC_r}{dt} = Q_r \cdot C_b - \frac{Q_r \cdot C_r \cdot R_b}{K_{p,r}} - CL_r \cdot \frac{C_r}{K_{p,r}} \cdot f_{u,p} \quad \text{式 (25)}$$

$$V_{1,m} \frac{dC_{b,m}}{dt} = -(Q_h + Q_r) \cdot C_{b,m} + \frac{Q_h \cdot C_{h,m} \cdot R_{b,m}}{K_{p,h,m}} + \frac{Q_r \cdot C_{r,m} \cdot R_{b,m}}{K_{p,r,m}} \quad \text{式 (26)}$$

$$V_{r,m} \frac{dC_{r,m}}{dt} = Q_r \cdot C_{b,m} - \frac{Q_r \cdot C_{r,m} \cdot R_{b,m}}{K_{p,r,m}} - CL_{r,m} \cdot \frac{C_{r,m}}{K_{p,r,m}} \cdot f_{u,p,m} \quad \text{式 (27)}$$

未変化体アニリンおよびジメチルアニリン誘導体の実測血漿中濃度推移に基づき、**Fig. I-2F** に模式的に示す腎を独立させた PBPK モデルを化合物毎に設定し、式 (13)、(14)、(16)、(24) および (25) を採択して解析した。

続いて、第 2 節 2-5 項で測定したラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウスの実測血中濃度推移を基に、非線形モデル解析ソフトウェアを用いて最適化計算を行い、最小コンパートメントからなる簡易 PBPK モデル用入力パラメータ値を設定した。これらの過程を経て算出した、予測血中濃度を PBPK モデルにて再現するラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウスの PBPK モデル用入力パラメータ値をそれぞれ、**Table I-3、I-4** および **I-5** に示す。以上のような PBPK モデル用入力パラメータ値を用いて、構築した簡易 PBPK モデルより化学物質の動物血中、肝中および尿中仮想投与曲線を出力し、PBPK モデル用出力パラメータ値である最大濃度値 ( $C_{\max}$ ) および血中濃度時間曲線下面積 (AUC) を算出した。

## 2-7 統計学的解析

プールしたラット、マウスおよびヒト肝および小腸マイクロゾームならびに肝 S9 を酵素源とした化学物質の *in vitro* 代謝消失速度の統計解析は、GraphPad Prism (GraphPad Prism Software, La Jolla, CA, USA) を用い、統計的検定は、有意水準を  $p < 0.05$  に設定した。



**Table I-3. Experimental and calculated parameters for rat PBPK models established in this study**

Parameter	Fraction absorbed × intestinal availability	Absorption rate constant	Transfer rate constant	Transfer rate constant	Volume of systemic circulation	Hepatic intrinsic clearance	Hepatic clearance	Renal clearance
Symbol (unit)	$F_a \cdot F_g$	$k_a$ (1/h)	$k_{12}$ (1/h)	$k_{21}$ (1/h)	$V_1$ (L)	$CL_{h,int}$ (L/h)	$CL_h$ (L/h)	$CL_r$ (L/h)
Styrene	0.910	24.0 ± 0.5	2.56 ± 0.30	1.69 ± 0.31	0.062 ± 0.001	14.5 ± 0.3	0.595	0.001
Bromobenzene	1	1.63 ± 0.57	na	na	0.434 ± 0.155	18.7 ± 0.6	0.616	0.0616
1,2-Dibromobenzene	0.7	3.81 ± 0.82	na	na	1.60 ± 0.20	17.1 ± 1.1	0.479	0.0479
1,4-Dibromobenzene	1	1.30 ± 0.45	na	na	1.41 ± 0.23	0.390 ± 0.253	0.0200	0.0020
Tetrabromobisphenol A	0.0145	1.79 ± 0.11	na	na	0.276 ± 0.001	20.3 ± 0.1	0.022	0.0020
Tetrabromobisphenol A glucuronide	na	na	na	na	0.758 ± 0.078	20.6 ± 0.1	0.105	0.095
Diisononyl phthalate	na	na	na	na	na	na	na	na
Monoisononyl phthalate	na	na	na	na	na	na	na	na
Oxidized monoisononyl phthalate	na	na	na	na	na	na	na	na
Dibutyl phthalate	na	na	na	na	na	na	na	na
Monobutyl phthalate	1	2.52 ± 0.98	na	na	0.304 ± 0.067	2.23 ± 0.49	0.0763	0.0092
Monobutyl phthalate glucuronide	na	na	na	na	na	na	na	na
Aniline	0.824	18.8 ± 1.3	na	na	0.402 ± 0.061	3.43 ± 0.47	0.584	0.063
2,3-Dimethylaniline	0.279	11.3 ± 1.3	na	na	0.579 ± 0.053	0.299 ± 0.045	0.0852	0.0089
2,4-Dimethylaniline	0.496	11.5 ± 0.6	na	na	0.503 ± 0.044	2.70 ± 0.28	0.420	0.045
2,5-Dimethylaniline	0.260	10.8 ± 1.2	na	na	0.314 ± 0.020	0.110 ± 0.017	0.0323	0.0033
2,6-Dimethylaniline	0.292	7.02 ± 0.20	na	na	0.367 ± 0.006	0.454 ± 0.008	0.123	0.013
<i>N</i> ,2-Dimethylaniline	0.321	2.40 ± 0.32	na	na	0.480 ± 0.062	0.952 ± 0.119	0.185	0.019
3,5-Dimethylaniline	0.416	14.3 ± 0.2	na	na	0.548 ± 0.023	1.88 ± 0.10	0.336	0.036

na ; not available.

**Table I-4. Experimental and calculated parameters for mouse PBPK models established in this study**

Parameter	Fraction absorbed × intestinal availability	Absorption rate constant	Transfer rate constant	Transfer rate constant	Volume of systemic circulation	Hepatic intrinsic clearance	Hepatic clearance	Renal clearance
Symbol (unit)	$F_a \cdot F_g$	$k_a$ (1/h)	$k_{12}$ (1/h)	$k_{21}$ (1/h)	$V_1$ (L)	$CL_{h,int}$ (L/h)	$CL_h$ (L/h)	$CL_r$ (L/h)
Bromobenzene	1	1.40 ± 0.28	na	na	0.138 ± 0.020	1.53 ± 0.08	0.0848	0.0085
1,2-Dibromobenzene	0.9	2.92 ± 0.25	na	na	0.214 ± 0.014	1.60 ± 0.11	0.0623	0.0062
1,4-Dibromobenzene	1	2.01 ± 0.71	na	na	0.276 ± 0.045	0.537 ± 0.131	0.0239	0.0024
Tetrabromobisphenol A	0.0107	3.63 ± 0.72	na	na	0.0997 ± 0.0114	5.01 ± 0.88	0.00609	0.0004
Tetrabromobisphenol A glucuronide	na	na	na	na	0.00679 ± 0.00276	0.390 ± 0.081	0.00224	0.00205
Monoisononyl phthalate	1	0.767 ± 0.046	na	na	0.0270 ± 0.0030	3.18 ± 0.05	0.0145	0.0015
Hydroxylated monoisononyl phthalate	na	na	na	na	0.0227 ± 0.0021	0.289 ± 0.009	0.00675	0.00675
Monobutyl phthalate	1	3.15 ± 1.27	0.549 ± 0.320	0.0238 ± 0.0342	0.222 ± 0.085	3.33 ± 1.44	0.0702	0.0050
Monobutyl phthalate glucuronide	na	na	1.27 ± 3.41	0.0858 ± 0.108	0.0266 ± 0.0678	0.0275 ± 0.0888	0.0051	0.0060

na ; not available.

**Table I-5. Experimental and calculated parameters for PBPK models in humanized-liver mice established in this study**

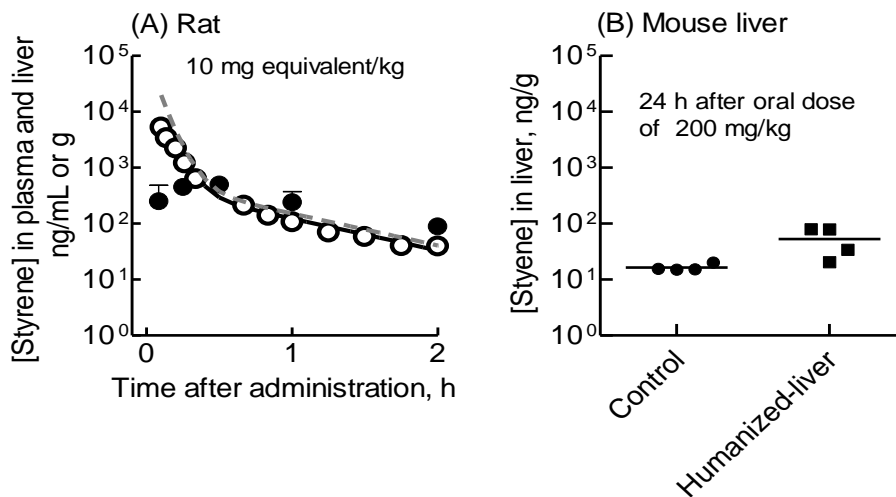
Parameter	Fraction absorbed × intestinal availability	Absorption rate constant	Transfer rate constant	Transfer rate constant	Volume of systemic circulation	Hepatic intrinsic clearance	Hepatic clearance	Renal clearance
Symbol (unit)	$F_a \cdot F_g$	$k_a$ (1/h)	$k_{12}$ (1/h)	$k_{21}$ (1/h)	$V_1$ (L)	$CL_{h,int}$ (L/h)	$CL_h$ (L/h)	$CL_r$ (L/h)
Bromobenzene	1	1.19 ± 0.64	na	na	0.152 ± 0.073	1.26 ± 0.17	0.0771	0.0077
1,2-Dibromobenzene	0.9	3.64 ± 0.29	na	na	0.135 ± 0.009	1.58 ± 0.09	0.0617	0.0062
1,4-Dibromobenzene	1	1.41 ± 0.15	na	na	0.290 ± 0.011	0.197 ± 0.014	0.00972	0.00097
Tetrabromobisphenol A	0.0142	1.53 ± 0.62	na	na	0.106 ± 0.030	32.0 ± 0.9	0.0322	0.0004
Tetrabromobisphenol A glucuronide	na	na	na	na	0.00422 ± 0.00140	0.145 ± 0.041	0.000837	0.000761
Monoisononyl phthalate	1	1.50 ± 0.06	na	na	0.0182 ± 0.0023	4.56 ± 0.06	0.0200	0.0020
Hydroxylated monoisononyl phthalate	na	na	na	na	0.0195 ± 0.0030	0.576 ± 0.051	0.0129	0.0129
Monobutyl phthalate	1	3.16 ± 2.01	0.266 ± 0.317	0.129 ± 0.185	0.162 ± 0.066	3.07 ± 0.87	0.0670	0.0050
Monobutyl phthalate glucuronide	na	na	0.773 ± 2.210	0.0991 ± 0.117	0.0293 ± 0.0775	0.0780 ± 0.0629	0.0138	0.0085
Aniline	1	3.62 ± 2.62	na	na	0.0407 ± 0.0199	0.0922 ± 0.0221	0.0379	0.0040
2,6-Dimethylaniline	0.442	4.09 ± 1.47	na	na	0.469 ± 0.061	0.0509 ± 0.0222	0.0147	0.0015

na ; not available.

### 第3節 結果

#### 3-1 化学物質の動物生体内動態予測

ラットにスチレン (25 mg/kg) を単回経口投与した際のラット血漿中濃度を測定し、**Fig. I-3** に示す。Withey ら(Withey, 1976)が 1976 年に文献報告した、スチレン (10 mg/kg) を単回経口投与後のラット血漿中濃度と各投与量を標準化して比較したところ、スチレンの血漿中の消失相が概ね一致した (**Fig. I-3A**)。対照マウスおよびヒト肝キメラマウスにラットよりも一桁高用量のスチレン (200 mg/kg) を単回経口投与した際の血漿中濃度を測定したところ、経口投与 15 分後には検出限界以下 ( $<0.10 \mu\text{g/mL}$ ) であった一方で、スチレン単回経口投与 24 時間後の対照およびヒト肝キメラマウスの肝中濃度を測定したところ、平均肝中濃度はそれぞれ 16.3 ng/g および 53.0 ng/g であった (**Fig. I-3B**)。



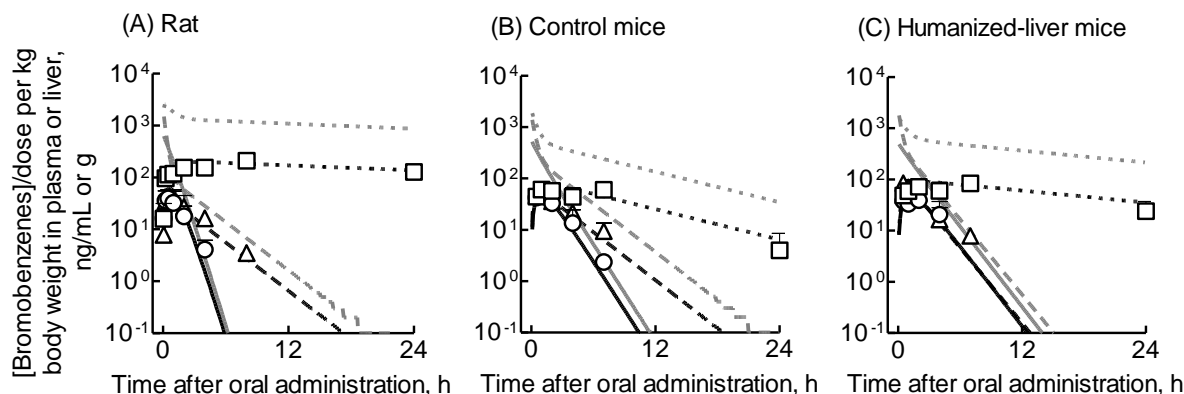
**Fig. I-3. Reported, measured, and estimated styrene concentrations in plasma or liver from rats (A) and control and humanized-liver mice (B) after oral administrations and PBPK model analysis.** (A) Reported plasma concentrations after 10 mg/kg styrene administration to rats (open circles) (Withey, 1976), measured dose-normalized plasma concentrations data from the current study after 25 mg/kg oral doses of styrene to rats (closed circles), and PBPK estimated plasma (solid line) and liver (dashed gray line) concentrations after virtual administration of 10 mg/kg styrene to rats. (B) Individual concentrations (plots) and means (lines) of styrene in liver from mice 24 hour after 200 mg/kg oral doses of styrene.

第 2 節 2-6 項で算出したラット PBPK モデル用入力パラメータ値 (Table I-3) を基に出力したスチレンの血中および肝中仮想投与曲線を Fig. I-3 に図示する。出力したスチレンの血中仮想投与曲線は、Withey (Withey, 1976) が 1976 年に文献報告したスチレンのラット血中濃度と一致した (Fig. I-3A)。スチレンの肝中仮想投与曲線は、血中仮想投与曲線よりも高い濃度推移を示した (Fig. I-3A)。

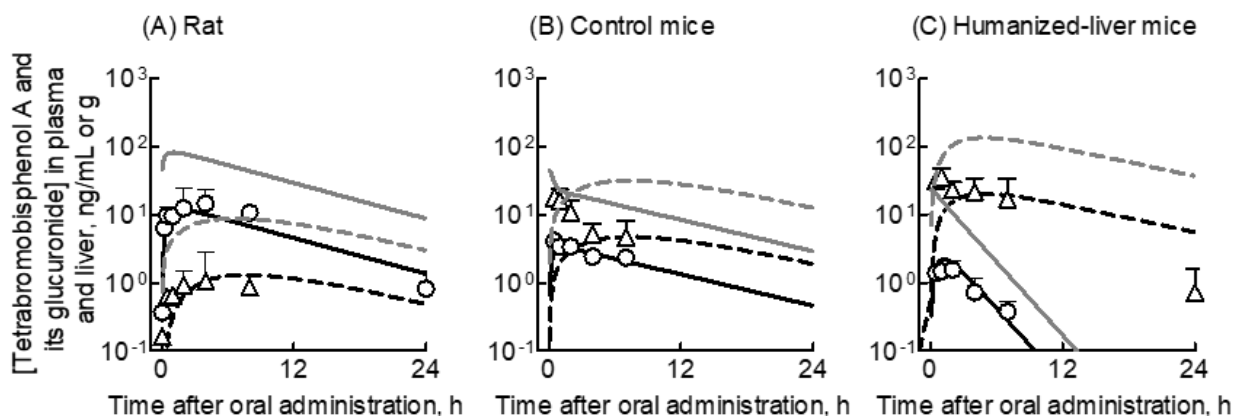
ラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウスにブロモベンゼン誘導体であるブロモベンゼン (100-150 mg/kg)、1,2-ジブロモベンゼン (100 mg/kg)、1,4-ジブロモベンゼン (100-250 mg/kg) および TBBPA (25-1000 mg/kg) を単回経口投与した際の未変化体および TBBPA グルクロン酸抱合体の血漿中濃度を測定し、Fig. I-4 および Fig. I-5 に図示する。ブロモベンゼンは、ラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウス血漿中の代謝消失が速やかであった一方で、1,4-ジブロモベンゼンは血漿中代謝消失が緩やかであることが認められた (Fig. I-4)。1,2-ジブロモベンゼンは、ヒト肝キメラマウス血漿中の代謝消失がブロモベンゼンと同程度であった一方で、ラットおよび対照マウス血漿中の代謝消失がブロモベンゼンと比較して緩やかであることが認められた (Fig. I-4)。別途、ヒト肝キメラマウスにブロモベンゼンおよび 1,4-ジブロモベンゼンをそれぞれ単回経口投与 2 時間後の肝臓を摘出し、肝中濃度を測定したところ、それぞれ 93 および 87 ng/g であり、同血漿中濃度と比較して高値であることが認められた。

ラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウス体内での TBBPA 未変化体の血中濃度は投与量と比較してわずかであり、大部分はそのグルクロン酸抱合体へ変換された (Fig. I-5)。単回経口投与量を 1.0 mg/kg に標準化換算した際の TBBPA のラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウス血中  $C_{max}$  値は、それぞれ 14.6、4.1 および 1.6 ng/mL であり、AUC 値はそれぞれ 194、40 および 10 ng·h/mL で

あった。同様に、TBBPA グルクロン酸抱合体のラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウス血中  $C_{max}$  値は、それぞれ 1.1、18 および 36 ng/mL であり、血中 AUC 値は、それぞれ 7.1、97 および 310 ng·h/mL であった。TBBPA およびそのグルクロン酸抱合体を合計した総 TBBPA とした際、対照マウスに TBBPA を単回経口投与 24 時間後の蓄尿および畜糞試料中の総 TBBPA 量は、それぞれ投与量に対して 3% 以下および 13% であり、ヒト肝キメラマウスの蓄尿および畜糞試料中の総 TBBPA 量は、それぞれ投与量に対して 1% 以下および 11% であった。第 2 節 2-6 項で算出したラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウスの PBPK モデル用入力パラメータ値 (Table I-3, 4, 5) を基に出力したブロモベンゼン誘導体およびそれら代謝物の血中および肝中仮想投与曲線を Fig. I-4, 5 に図示する。これら出力した血中仮想投与曲線はおおむね実測血中濃度と一致した (Fig. I-4, 5)。第 2 節 2-6 項で算出したラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウスの PBPK モデル用入力パラメータ値より、ラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウスの 1,4-ジブロモベンゼンの  $CL_{h, int}$  値は、ブロモベンゼンおよび 1,2-ジブロモベンゼンのそれらと比較して、それぞれ低値を示した (Table I-3, 4, 5)。対照マウスおよびヒト肝キメラマウス PBPK モデルより出力したブロモベンゼンおよび 1,4-ジブロモベンゼンの肝中仮想投与曲線は、出力した血中仮想投与曲線と比較して高い推移を示し、実測した肝中濃度と概ね一致した (Fig. I-4)。



**Fig. I-4. Plasma and hepatic concentrations of bromobenzene, 1,2-dibromobenzene, and 1,4-dibromobenzene in rats (A), control mice (B), and humanized-liver mice (C) after single oral doses.** Dose-normalized plasma concentrations of bromobenzene (circles), 1,2-dibromobenzene (triangles), and 1,4-dibromobenzene (squares) are shown with SD values (bars) for between three and five animals. Estimated plasma (black) and hepatic (gray) concentrations of bromobenzene (solid line), 1,2-dibromobenzene (dashed line), and 1,4-dibromobenzene (dotted line) are shown after virtual oral doses using PBPK models with the input parameters. Rats were treated with the same doses (100 mg/kg body weight) of bromobenzene, 1,2-dibromobenzene, and 1,4-dibromobenzene. Control and humanized-liver mice were treated with 150 mg bromobenzene/kg body weight, 100 mg 1,2-dibromobenzene/kg, or 250 mg 1,4-dibromobenzene/kg for their potential toxicity.



**Fig. I-5. Plasma concentrations of tetrabromobisphenol A (circles) and its glucuronide (triangles) in (A) rats, (B) control mice, and (C) humanized-liver mice for a normalized dose of 1.0 mg/kg after single oral doses of 25 and 1000 mg/kg.** Solid and dotted line show the PBPK model results for tetrabromobisphenol A and its glucuronide in plasma (black) and liver (gray), respectively, after a single virtual oral dose of 1.0 mg/kg. Data plots show the means and SDs of normalized concentrations for single oral doses of 25 and 1000 mg/kg for experiments in three rats and four mice.

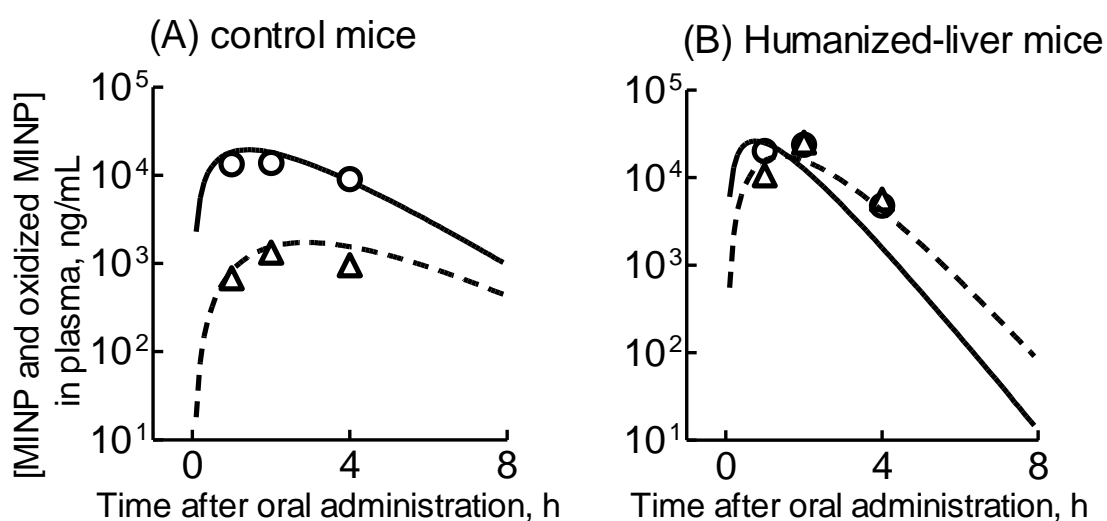
対照およびヒト肝キメラマウスにフタル酸エステル類である DINP (50 mg/kg) および DBP (100 mg/kg) を単回経口投与した際の未変化体および代謝物の血漿中および尿中濃度を測定した。DINP および DBP は対照およびヒト肝キメラマウス血漿中および尿中から検出されず、速やかに DINP の一次代謝物である MINP およびそのグルクロン酸抱合体、DBP の一次代謝物である MBP へと変換され、さらに DINP の二次代謝物である MINP 酸化的代謝物およびそのグルクロン酸抱合体、DBP の二次代謝物である MBP グルクロン酸抱合体へと変換された。これらの *in vivo* 実験結果を基に、DINP の代謝物の中、MINP グルクロン酸抱合体を含めた MINP を親化合物 (substrate)、酸化的代謝物のグルクロン酸抱合体を含めたものを MINP 酸化的代謝物 (Primary metabolite) とし、**Fig. I-6, 7** 図示する。対照マウスの血漿中 MINP 酸化的代謝物の濃度は MINP の濃度と比較して低値を示した一方で、ヒト肝キメラマウスの血漿中 MINP 酸化的代謝物の濃度は MINP の濃度と同程度であった (**Fig. I-6**)。ヒト肝キメラマウス血漿中の MBP 濃度は対照マウスの血漿中濃度と比較して高値を示した一方で、ヒト肝キメラマウス血漿中の MBP グルクロン酸抱合体濃度は対照マウス血漿中濃度と同程度であった (**Fig. I-7**)。

同様に、対照およびヒト肝キメラマウスに DINP および DBP を単回経口投与した際のそれらの代謝物の尿中濃度を測定し、**Fig. I-8, 9** に図示する。ヒト肝キメラマウス尿中の MINP 濃度は対照マウス尿中濃度と同程度であった一方で、ヒト肝キメラマウス尿中の MINP 酸化的代謝物濃度は対照マウスの尿中濃度と比較して高値を示した (**Fig. I-8**)。ヒト肝キメラマウス尿中の MBP および MBP グルクロン酸抱合体濃度は、対照マウスと比較して同程度であった (**Fig. I-9**)。

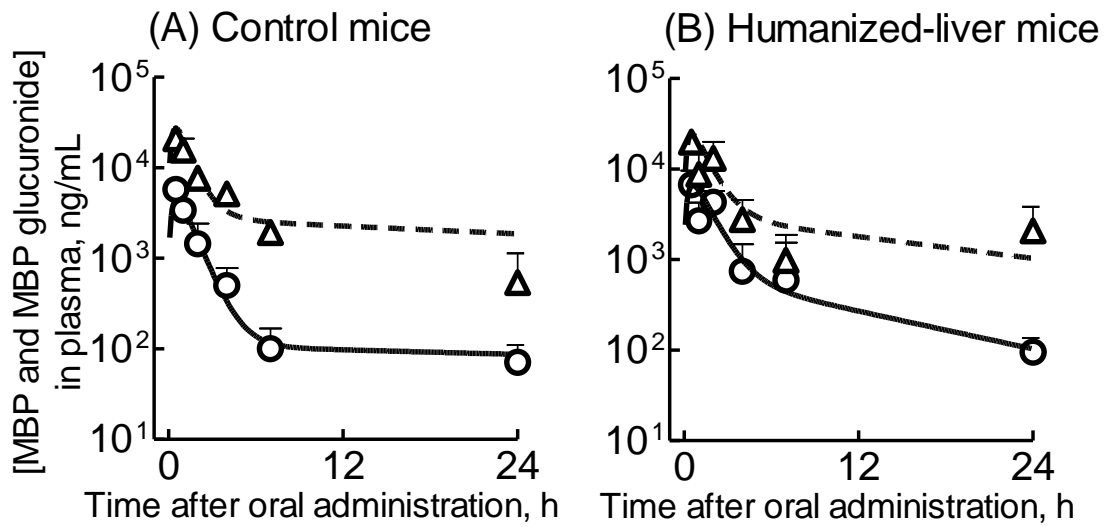
第 2 節 2-6 項で算出した対照マウスおよびヒト肝キメラマウスの PBPK モデ



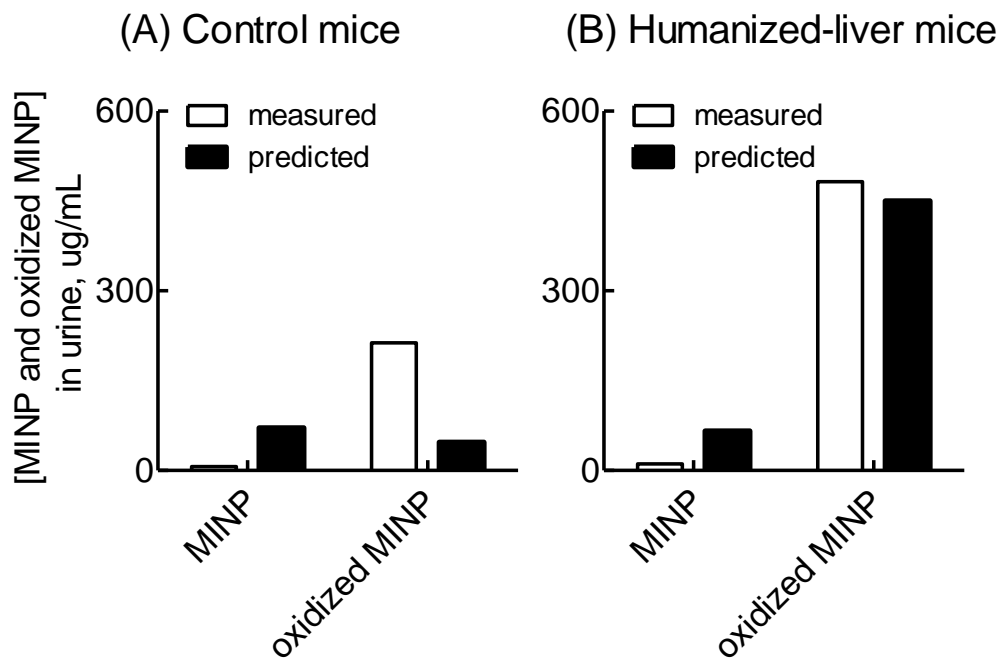
ル用入力パラメータ値 (Table I-4, 5) を基に、MINP を親化合物、MINP 酸化的代謝物を見かけの代謝物とした血中および尿中仮想投与曲線を出力し、Fig. I-6, 8 に図示する。同様に、MBP を親化合物、MBP グルクロン酸抱合体を見かけの代謝物とした血中および尿中仮想投与曲線を出力し、Fig. I-7, 9 に図示する。これら出力した MINP、MINP 酸化的代謝物、MBP および MBP グルクロン酸抱合体の対照およびヒト肝キメラマウス血中仮想投与曲線は、おおむね実測血中濃度と一致した。対照マウスおよびヒト肝キメラマウス PBPK モデルより出力した MBP および MBP グルクロン酸抱合体の予測尿中濃度は実測尿中濃度と一致しなかった一方で、出力した MINP および MINP 酸化的代謝物の予測尿中濃度は、おおむね実測尿中濃度と一致した (Fig. I-8)。



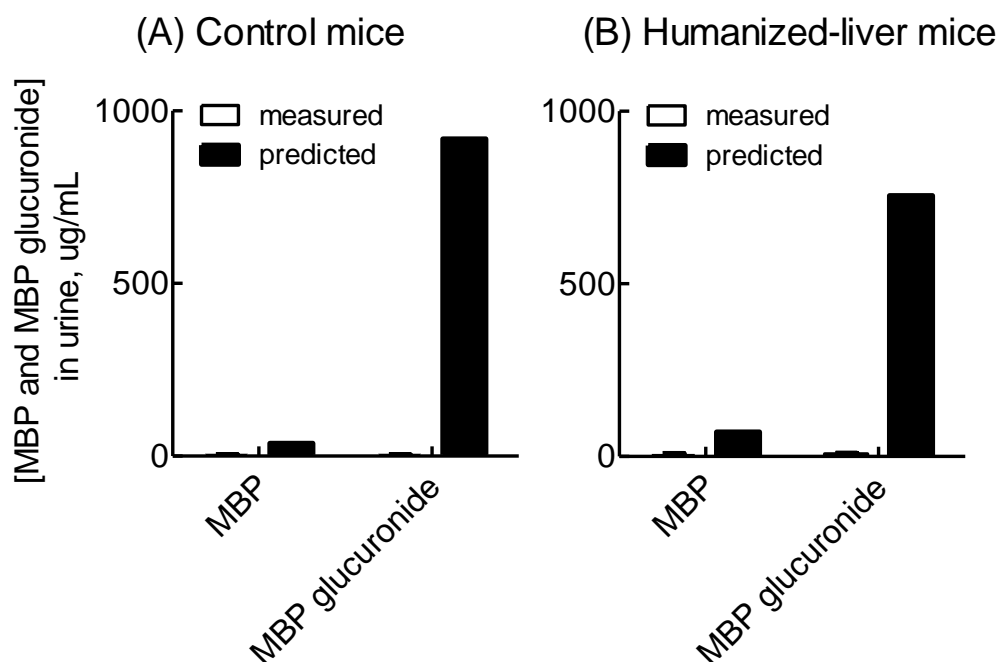
**Fig. I-6. Plasma concentrations of MINP (circles) and oxidized MINP (triangles) in control mice (A) and humanized-liver mice (B) after single oral doses of DINP. Solid and dashed lines show the PBPK model results for MINP and oxidized MINP, respectively.**



**Fig. I-7. Plasma concentrations of MBP (circles) and MBP glucuronide (triangles) in control mice (A) and humanized-liver mice (B) after single oral doses of DBP. Solid and dashed lines show the PBPK model results for MBP and MBP glucuronide, respectively.**



**Fig. I-8. Urinary concentrations of MINP and oxidized MINP in control mice (A) and humanized-liver mice (B) after single oral doses of DINP (open columns). Closed columns show the PBPK model results for MINP and oxidized MINP, respectively.**



**Fig. I-9. Urinary concentrations of MBP and MBP glucuronide in control mice (A) and humanized-liver mice (B) after single oral doses of DBP (open columns). Closed columns show the PBPK model results for MBP and MBP glucuronide, respectively.**

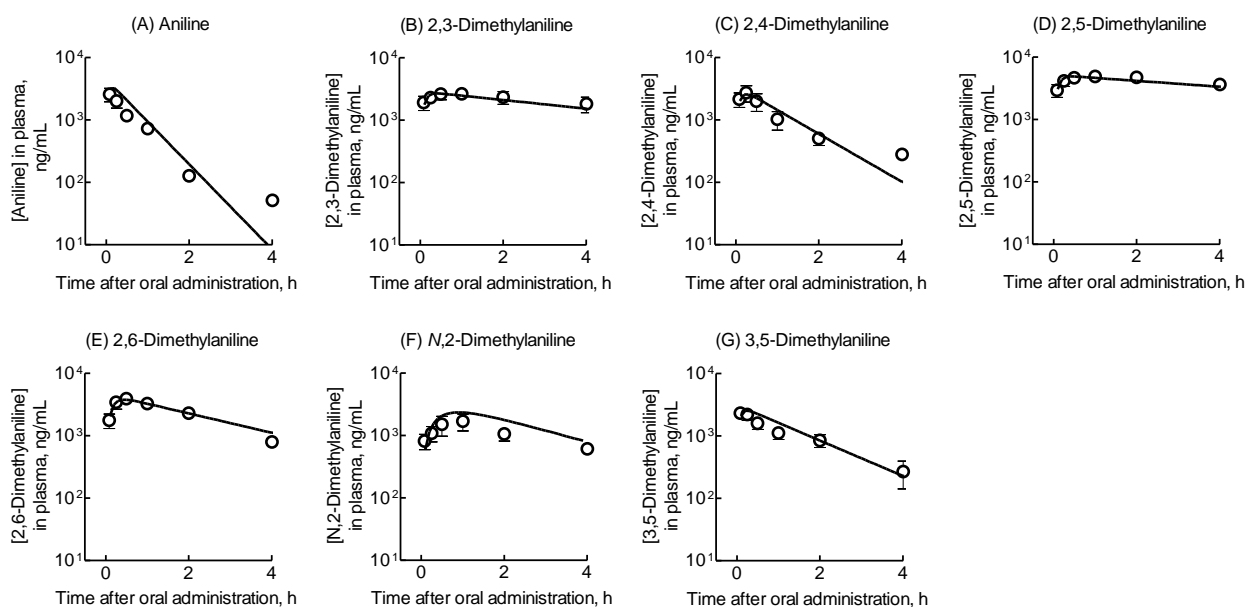
ラットにアニリン、2,3-、2,4-、2,5-、2,6-、*N*,2-および3,4-ジメチルアニリンを単回経口投与（25 mg/kg）した際のラット血漿中濃度を測定し、**Fig. I-10**に図示する。同時にアニリンおよびジメチルアニリン誘導体の定量可能な活性化体と見なされる一次代謝物として、これらのアセチル抱合体および酸化的代謝物の観測ピーク面積値を用いて半定量し、**Fig. I-11**に図示する。得られたアニリンおよびジメチルアニリン誘導体の未変化体の血漿中濃度より、アニリン、2,4-ジメチルアニリンおよび3,5-ジメチルアニリンはラット血漿中の消失が速やかであった一方で、2,3-、2,5-、2,6-および*N*,2-ジメチルアニリンはラット血漿中の消失が遅いことが認められた（**Fig. I-10**）。第2節2-6項で算出したラットのPBPKモデル用入力パラメータ値（**Table I-3**）を基に出力したアニリンおよびジメチルアニリン誘導体の血中仮想投与曲線を**Fig. I-10**に図示する。出力したアニリン

およびジメチルアニリン誘導体のラット血中仮想投与曲線は、概ね実測血中濃度と一致した。ラット血中のアニリン、2,4-ジメチルアニリンおよび3,5-ジメチルアニリンのアセチル抱合体量はそれらの基質よりも多い一方で、2,3- および2,5-ジメチルアニリンのアセチル抱合体量はそれらの基質と同程度であった (Fig. I-11)。それらに対して、2,6-およびN,2-ジメチルアニリンのアセチル抱合体量は、それら以外のアニリン誘導体と比較して最も少ないことが認められた (Fig. I-11)。

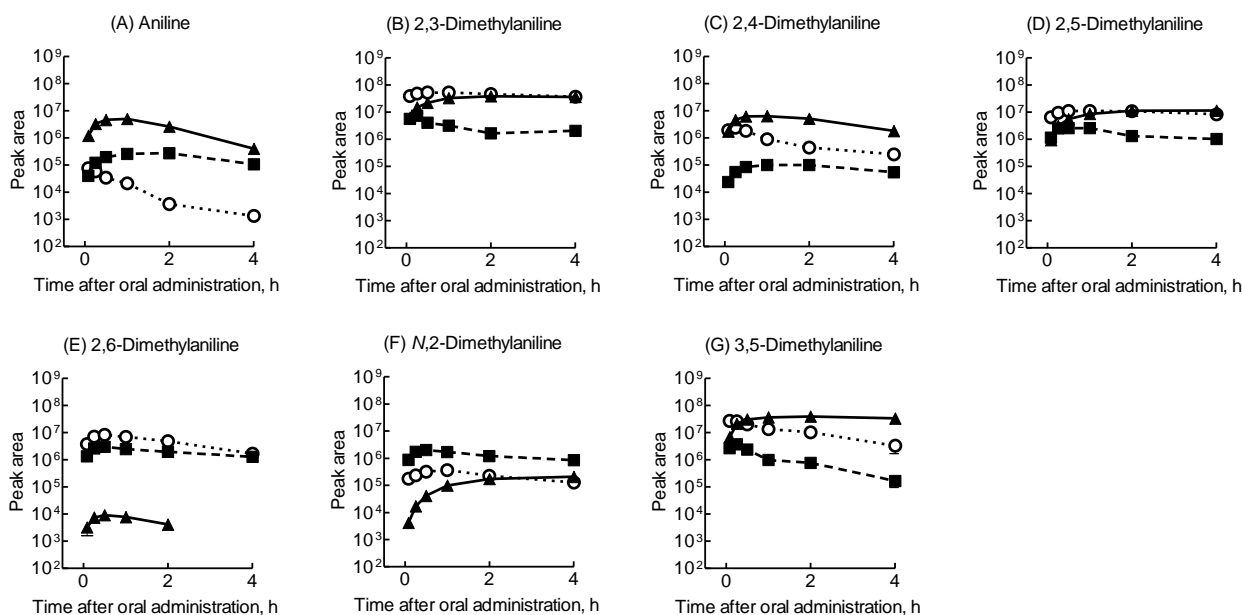
ラット血中代謝消失が速やかなアニリン (100 mg/kg) および代謝消失が遅い2,6-ジメチルアニリン (116 mg/kg) をヒト肝キメラマウスに単回経口投与した際の血漿中濃度を測定し、Fig. I-12 に図示する。アニリンはヒト肝キメラマウス血漿中の消失が速やかであった一方で、2,6-ジメチルアニリンは血漿中の消失が遅いことが認められた (Fig. I-12)。アニリンおよび2,6-ジメチルアニリンのヒト肝キメラマウス血中の  $C_{max}$  値は、それぞれ 26 および 2.4  $\mu\text{g/mL}$  であり、経口投与4時間後もしくは7時間後までのAUC値は、それぞれ 45 もしくは 12  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  であった。第2節2-6項で算出したヒト肝キメラマウスのPBPKモデル入力パラメータ値 (Table I-5) を基に出力したアニリンおよび2,6-ジメチルアニリンの血中仮想投与曲線を Fig. I-12 に図示する。出力したアニリンおよび2,6-ジメチルアニリンのヒト肝キメラマウス血中仮想投与曲線は、概ね実測血中濃度と一致した (Fig. I-12)。

アニリンのヒト肝キメラマウス血中の  $C_{max}$  値は、ラット血中の  $C_{max}$  値と比較して、一桁程度高値であることが認められた。これらの差異を調査するためにプールしたラット、マウスおよびヒトの肝および小腸マイクロゾームおよび肝S9を酵素源としたアニリンおよび2,6-ジメチルアニリンの *in vitro* 代謝消失速度を

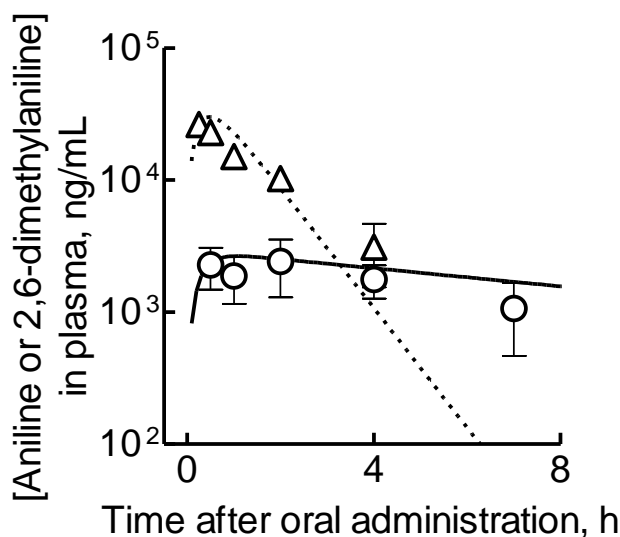
算出した (Table I-6)。ラット、マウスおよびヒトの肝および小腸マイクロゾームを酵素源とした代謝消失速度には差異は認められなかった一方で、ラット S9 を酵素源としたアニリンの代謝消失速度は、ヒト肝 S9 を酵素源としたものと比較して有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。



**Fig. I-10. Plasma concentrations of aniline (A); 2,3-dimethylaniline (B); 2,4-dimethylaniline (C); 2,5-dimethylaniline (D); 2,6-dimethylaniline (E); N,2-dimethylaniline (F); and 3,5-dimethylaniline (G) in rats after single oral doses of 25 mg/kg.** Mean observed plasma concentrations of aniline and its derivatives (circles) are shown with standard deviation values (bars) for three rats. Rat plasma concentrations of substrates (solid lines) estimated using PBPK models with the input parameters are shown after virtual oral doses of 25 mg/kg.



**Fig. I-11. Peak areas obtained from LC-MS/MS analyses of substrates and their metabolites in rat plasma after single oral doses of aniline (A); 2,3-dimethylaniline (B); 2,4-dimethylaniline (C); 2,5-dimethylaniline (D); 2,6-dimethylaniline (E); *N*,2-dimethylaniline (F); and 3,5-dimethylaniline (G). Mean peak areas of aniline and its derivatives (circles), their acetylated metabolites (triangles), and their oxidative metabolites (squares) in rat plasma were detected using LC-MS/MS analyses and are shown with standard deviation values (bars) for three rats.**



**Fig. I-12. Plasma concentrations of aniline (triangles) and 2,6-dimethylaniline (circles) in humanized-liver mice after single oral doses. Mean observed plasma concentrations of aniline and 2,6-dimethylaniline are shown with standard deviation values (bars) for four or five mice. Aniline pharmacokinetic data are taken from own previous study.<sup>21</sup> Solid and dotted lines show the PBPK model results for aniline and 2,6-dimethylaniline, respectively, after a single virtual oral dose of 100 and 116 mg/kg.**

**Table I-6. *In vitro* aniline and 2,6-dimethylaniline elimination rates by liver and intestinal microsomes or S9 fractions from mice, rats, and/or humans**

Species	Chemicals	Metabolic disappearances, nmol/min/mg microsomal or S9 protein		
		Intestine	Liver	
		Microsomal fractions	Microsomal fractions	S9 fractions
Mouse	Aniline	0.082 ± 0.039	0.36 ± 0.01	Not determined
	2,6-Dimethylaniline	0.059 ± 0.010	0.20 ± 0.01	Not determined
Rat	Aniline	0.15 ± 0.12	0.29 ± 0.03	0.45 ± 0.02 *
	2,6-Dimethylaniline	0.069 ± 0.038	0.26 ± 0.02	0.066 ± 0.012
Human	Aniline	0.17 ± 0.04	0.33 ± 0.01	0.097 ± 0.028
	2,6-Dimethylaniline	0.076 ± 0.015	0.14 ± 0.01	0.072 ± 0.008

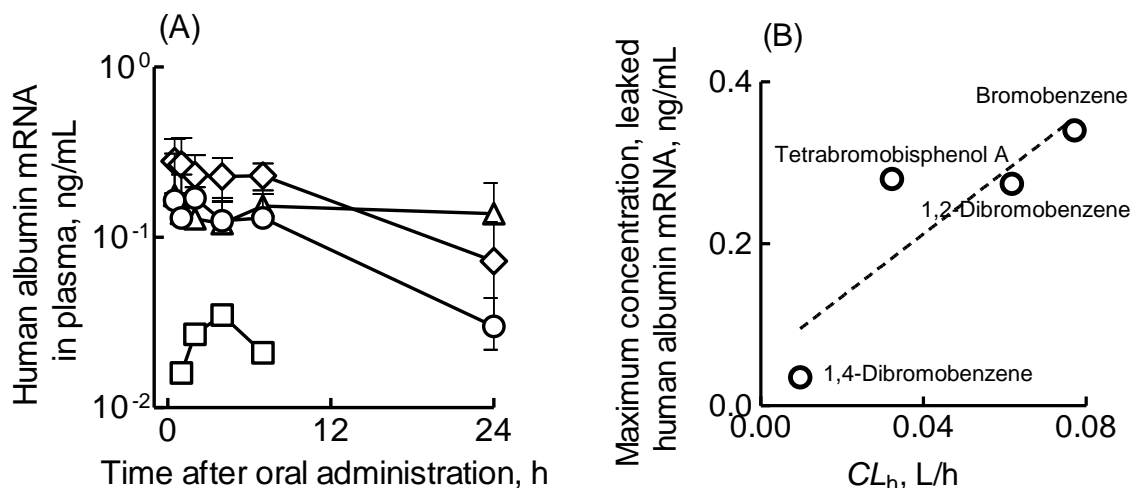
Aniline and 2,6-dimethylaniline (10 µM) were incubated with liver or intestine microsomes or S9 fractions (0.50 mg/mL) at 37°C for 30 min in triplicate determinations. Data are means and standard deviations. \* Significantly different from those in human liver S9 fractions ( $p < 0.05$ ).

### 3-2 化学物質の動物に対する毒性評価

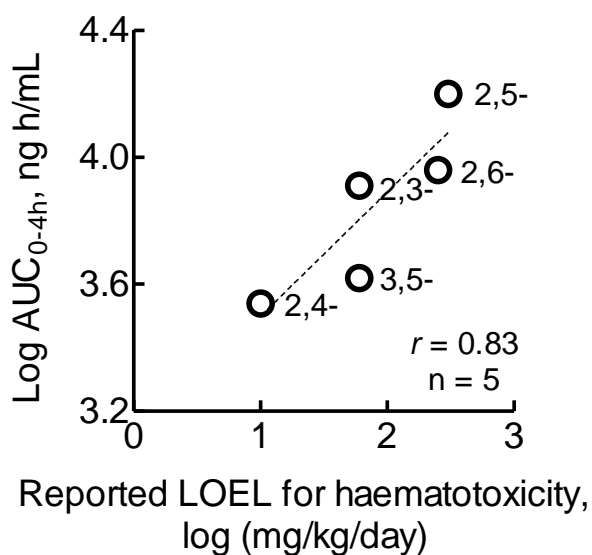
ヒト肝臓傷害指標として用いられるヒトアルブミン mRNA のヒト肝キメラマウス血液中への漏出を調査するために、ヒト肝キメラマウスにブロモベンゼン誘導体を単回経口投与後の血漿試料中のヒトアルブミン mRNA 濃度を測定し、**Fig. I-13A** に図示する。血漿中代謝消失の速やかなブロモベンゼンおよび 1,2-ジブロモベンゼン投与後のヒト肝キメラマウス血漿中ヒトアルブミン mRNA 濃度は高値を示し、投与 24 時間後も検出可能であった一方で、血漿中代謝消失の遅い 1,4-ジブロモベンゼン投与後の血漿中ヒトアルブミン mRNA 濃度は低値を示し、投与 24 時間後は検出限界以下であった (**Fig. I-13A**)。ブロモベンゼン誘導体の  $CL_h$  値とヒト肝キメラマウス血漿中へ漏出したヒトアルブミン mRNA 濃度との関係を調査したところ、ブロモベンゼン誘導体投与後のヒト肝キメラマウス血漿中へ漏出したヒトアルブミン mRNA 最大濃度とブロモベンゼン誘導体の  $CL_h$  値との間に正の相関関係が認められた (**Fig. I-13B**)。

簡易 PBPK モデルを用いて化学物質の動物に対する血液毒性を評価するために、第 3 節 3-1 項にて構築したラット PBPK モデルより出力した 5 種のジメチルアニリン誘導体未変化体の予測血中 AUC 値および報告されている血液の最小作用量 (LOEL) との関係を調査したところ、見かけ上の正の相関関係が認められた ( $r = 0.83$ ) (**Fig. I-14**)。





**Fig. I-13. Plasma concentrations of human albumin mRNA (A) and relationship between human albumin mRNA leaked into plasma and hepatic clearance (B) of bromobenzene, 1,2-dibromobenzene, 1,4-dibromobenzene, and tetrabromobisphenol A in humanized-liver mice.** Humanized-liver mice were treated with single oral doses of bromobenzene (circles), 1,2-dibromobenzene (triangles), 1,4-dibromobenzene (squares), and tetrabromobisphenol A (rhombus). Four humanized-liver mice were treated with 150 mg bromobenzene/kg body weight, 100 mg 1,2-dibromobenzene/kg, 250 mg 1,4-dibromobenzene/kg, or 1000 mg tetrabromobisphenol A/kg. Data represent mean concentrations with standard deviations.



**Fig. I-14. Relationships between reported lowest-observed-effect levels (LOEL) for haematotoxicity and  $AUC_{0-4}$  values of aniline and its dimethyl derivatives.** 2,3-, 2,3-Dimethylaniline; 2,4-, 2,4-dimethylaniline; 2,5-, 2,5-dimethylaniline; 2,6-, 2,6-dimethylaniline; and 3,5-, 3,5-dimethylaniline.

#### 第4節 考察

本章では、ヒト型モデル動物および最小コンパートメントに着目した簡易 PBPK モデルを組合わせ、化学物質の物質質量から動物血中、肝中および尿中濃度を推定し得る前向き予測する手法を検討した。この簡易 PBPK モデルの前向き予測手法を用いて、着目した化学物質の動物種差が及ぼす生体内動態の影響および一部の化学物質の動物に対する毒性を評価した。

本研究では、スチレンを単回経口投与後のラット血漿中からスチレンが検出された一方で、ヒト肝キメラマウスへの経口投与 15 分後のヒト肝キメラマウス血漿中からスチレンは検出限界以下であったことから (**Fig. I-3A**)、スチレンのラットおよびヒト肝キメラマウス血漿中からのスチレン代謝消失に種差が存在することが推察された。マウス体内において、スチレンの投与量依存的に皮下脂肪組織および肝臓へのスチレン未変化体濃度の増加が報告されている(Lof et al., 1983)。マウスの肺はスチレンによる発がん性関連の標的臓器と考えられており、生理学的な毒性モデルではスチレンによる肺への負荷が考慮されてきた(Csanady et al., 2003)。スチレンはチトクロム P450 (P450) 2E1 によるエポキシ化反応により、主要代謝物であるスチレン 7,8-エポキシ体に代謝されることが報告されている(Lof et al., 1984; Hartman et al., 2012; Hartman et al., 2013; Hartman et al., 2015)。ヒトの気道に多く存在する P450 2A13 はスチレンの 7,8-エポキシ化反応を効率よく触媒することが報告されている(Fukami et al., 2008)。スチレンのマウスへの慢性的な曝露による腫瘍の形成に関して、スチレンの DNA への結合は重要ではないことが報告されている(Boogaard et al., 2000)。マウスに投与されたスチレンは、肝臓および肺中のグルタチオン濃度を急速に低下させたことが報告されている(Turner et al., 2005)。さらに、単回経口投与 24 時間後のヒト肝

キメラマウス肝中からスチレンが検出された (**Fig. I-3B**)。これらの背景および研究結果より、ラットと比較してヒト肝キメラマウス体内では、スチレンの血液中から肝中への移行性が高く、スチレンの肝臓への蓄積の可能性が高いことが推察された。

ブロモベンゼンは化学物質による毒性の研究をするための貴重な化学物質である(Heijne et al., 2004; Koen et al., 2007)。ブロモベンゼン等の生体異物を介した細胞毒性における生物学的要因に関する研究が報告されてきた(Heijne et al., 2003; Tanaka et al., 2007)。ブロモベンゼンの代謝活性化および毒性に関して、P450 および還元型グルタチオンによる解毒反応が重要であることが報告されている(Lau and Monks, 1988)。本研究より、ブロモベンゼンおよび 1,2-ジブロモベンゼンのラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウス血漿中の代謝消失は、1,4-ジブロモベンゼンと比較して速やかであったことから (**Fig. I-4**)、ベンゼン環パラ位のブロモ置換基の有無が血中代謝消失に影響を及ぼす可能性が示唆された。1,4-ジブロモベンゼンはパラ位置換基の影響により代謝物生成反応が遅い一方、ブロモベンゼンはパラ位置換基が存在しないため代謝物生成反応が速く、エポキシ体生成による肝臓毒性の可能性が高いことが推察された。さらに、簡易 PBPK モデルより出力したブロモベンゼンおよび 1,4-ジブロモベンゼンの予測肝中濃度は、両化学物質投与 2 時間後の実測肝中濃度と概ね一致した (**Fig. I-4**)。これらのことより、簡易 PBPK モデルを用いて物質質量から生体内濃度を求める前向き予測手法は、ブロモベンゼン誘導体の血中濃度の再現に加えて、肝中濃度の予測を可能とすることを示唆した。

微生物を用いた研究より、潜在的な毒物と考えられているビスフェノール A への TBBPA 脱臭素化反応は、嫌氣的条件下において発生することが報告されて

いる(Hakk and Letcher, 2003)。TBBPA は経口投与後、消化管より速やかに吸収され、効率よく肝臓でグルクロン酸抱合され、胆汁中排泄を介して主に糞中に排泄されると報告されており、結果としてバイオアベイラビリティが低い物質とされている(Schauer et al., 2006; Borghoff et al., 2016; Hays and Kirman, 2019)。本研究より、TBBPA を対照マウスおよびヒト肝キメラマウスに経口投与した際の実測血漿中濃度を基に PBPK モデル用入力パラメータ値を算出したところ、対照マウスおよびヒト肝キメラマウスの  $F_a$ - $F_g$  値はそれぞれ、0.0107 および 0.0142 であり、TBBPA の糞中排泄量は尿中排泄量よりも高値であった。これらのことから、TBBPA は対照マウスおよびヒト肝キメラマウス体内において、バイオアベイラビリティの低い化学物質であることが推察された。

げっ歯類への高用量の DEHP および DINP を経口投与した際の生殖毒性が報告されている(Kluwe et al., 1983; Hellwig et al., 1997)。しかしながら、DBP、DEHP および DINP のヒト生殖毒性に関する情報は明らかとなっていない。DBP の経口的な曝露は、ラットおよびマウスの生殖機能に影響を及ぼす一方で、ハムスターには影響を及ぼさないことが報告されている(Oishi and Hiraga, 1980; Gray et al., 1982; Wine et al., 1997)。これら実験動物に限定される生殖毒性の知見から、日本では DBP および DEHP の玩具および油脂性の製品等を含む食品に接触する容器や包装等への使用が、DINP の口にするを本質とした育児用品への使用が禁止されている(Dekant and Bridges, 2016)。

DBP の一次代謝物である MBP および二次代謝物であるそのグルクロン酸抱合体は、ヒトの乳汁および尿中から検出されている(Marsee et al., 2006; Koch et al., 2007; Latini et al., 2009)。DINP や DBP のフタル酸ジアルキル体は、消化管内のリパーゼ等の各種加水分解酵素により MINP や MBP のフタル酸モノアルキル

体に速やかに変換され、消化管から吸収後、肝臓にてグルクロン酸抱合および酸化代謝反応等を受け尿中に排泄されることが報告されている(Albro et al., 1982; Silva et al., 2003; Ito et al., 2005; Herr et al., 2009; Choi et al., 2012; Zeman et al., 2013; Hsu et al., 2016; Koch et al., 2017)。DBP および MBP をラットおよびハムスターに投与した実験では、ラット尿中の MBP 濃度がハムスター尿中と比較して 3-4 倍高値を示すことが報告されている(Foster et al., 1983)。これらの遊離型 MBP の尿中濃度の種差は、ハムスターの生殖機能へ影響を及ぼさない要因となる可能性がある(Foster et al., 1983)。

本研究で、ヒト肝キメラマウスに経口投与された DINP は、MINP およびその酸化代謝物に変換され、速やかに尿中に排泄された。その一方で、対照マウス尿中の MINP およびその酸化代謝物の排泄量は、ヒト肝キメラマウスと比較して少なかったことより (Fig. I-6, 8)、ヒト肝キメラマウスと対照マウスでは DINP の体内動態に種差があることが示唆された。このことより、対照マウス体内では、MINP およびそのグルクロン酸抱合体は胆汁排泄を介した腸肝循環により体内滞留時間が延長することが推察された。

ヒト肝キメラマウスおよび対照マウスに経口投与された DBP は、MBP およびそのグルクロン酸抱合体に変換されたが、DINP の場合と比較して尿中へ排泄された量は低値であった (Fig. I-7, 9)。このことから、フタル酸ジエステル類側鎖炭素鎖の長短鎖の差異は、血中代謝消失に加えて胆汁中排泄および尿中排泄に影響を及ぼす可能性が推察された。簡易 PBPK モデルより出力した MINP およびその酸化代謝物のヒト肝キメラマウスおよび対照マウスの予測血中および尿中濃度は、実測血中および尿中濃度を概ね再現することが可能であった。このことより、簡易 PBPK モデルを用いて物質質量から生体内濃度を求める前向き

予測手法は、フタル酸ジエステル類の基質および代謝物を含めた血中濃度の再現に加えて、尿中濃度の予測を可能とした。

アニリンおよびジメチルアニリン誘導体はアミノ基の *N*-水酸化反応による血液毒性が報告されている(Lewalter and Korallus, 1985)。アニリンおよびジメチルアニリン誘導体それぞれの *N*-水酸化体は反応性が高いため検出が困難であり、本研究では未変化体に加えて *N*-水酸化体の代替代謝物として *N*-アセチル体および芳香環の水酸化体を主として検出した。アニリン、2,4-ジメチルアニリンおよび3,5-ジメチルアニリンそれぞれの未変化体のラット血漿中残存濃度は、2,5-ジメチルアニリンおよび2,6-ジメチルアニリンと比較して低値であり (Fig. I-10)、2,4-ジメチルアニリンおよび3,5-ジメチルアニリンの半定量したアセチル抱合体量が2,3-ジメチルアニリン、2,5-ジメチルアニリンおよび2,6-ジメチルアニリンのアセチル抱合体と比較して高値であった (Fig. I-11)。このことより、ベンゼン環のアミノ基の周辺の置換基の有無が血中の代謝消失に影響することが推察された。2,4-ジメチルアニリンは例外的に主として aminotoluic acid を含む 2,4-ジメチルアミノフェノールに変換された。そこで、アニリンおよびジメチルアニリン誘導体のヒト体内動態を詳細に調査することを目的とし、ラット血中の代謝消失の速やかなアニリンおよび代謝消失の緩やかな 2,6-ジメチルアニリンを代表とし、ヒト肝キメラマウスを用いた *in vivo* 代謝消失実験および各動物の酵素源を用いた *in vitro* 代謝消失実験を実施した。ヒト肝キメラマウス血中のアニリンおよび2,6-ジメチルアニリンの代謝消失推移はラットの場合と同様であったが、アニリンのヒト肝キメラマウス血中の  $C_{max}$  値は、ラット血中の  $C_{max}$  値と比較して、一桁程度高値であった (Fig. I-10, 12)。さらに、ラット肝 S9 を酵素源としたアニリンの代謝消失速度は、ヒト S9 を酵素源としたものと比較して

有意に高値を示した (Table I-6)。これらのことより、アニリンはラット生体内の肝 S9 画分における代謝消失が速やかに行われる可能性が示唆され、ヒト肝キメラマウス血中に一桁程度多く濃度として残存することが推察された。

ラット PBPK モデルより出力したジメチルアニリン誘導体未変化体の血中残存の AUC 値および血液 LOEL 値との関係を調査したところ、見かけ上の正の相関関係が認められた (Fig. I-14)。このことからジメチルアニリン誘導体の代謝過程においてベンゼン環 2 位のオルト位の置換基の有無が及ぼす、血液毒性が報告されている *N*-水酸化体の代替として補足可能な代謝物と判断されるアセチル抱合体生成速度への影響が推察された。

ブロモベンゼンおよび 1,2-ジブロモベンゼン投与後のヒト肝キメラマウス血漿中のヒトアルブミン mRNA 濃度が 1,4-ジブロモベンゼン投与後と比較して高値であったことから (Fig. I-13A)、ブロモベンゼンおよび 1,2-ジブロモベンゼンが及ぼすヒト肝臓の傷害の可能性が高いことが推察された。TBBPA を含むブロモベンゼン誘導体経口投与後のヒト肝キメラマウス血漿中に漏出したヒトアルブミン mRNA 濃度と各化学物質の  $CL_h$  値との間に正の相関関係が認められたことより (Fig. I-13B)、肝代謝消失が遅いことが血液中へのヒトアルブミンの漏出を抑える可能性が示唆され、ブロモベンゼン誘導体の活性代謝物生成が及ぼすヒト肝臓への傷害の可能性が推察された。このことより、簡易 PBPK モデルを用いて物質質量から生体内濃度を求める前向き予測手法は、ベンゼン環置換基の位置や数の変化が及ぼす生体内動態および毒性の影響を予測し得ることが推察された。

以上のことより、本研究で注目した低分子の化学物質を動物に単回経口投与

後の実測血漿中濃度を基に、簡易 PBPK モデルを用いて物質質量から生体内濃度を求める前向き予測手法は、化学物質の血中濃度の再現に加えて、肝中および尿中濃度の予測を可能とした。このような簡易 PBPK モデルを用いた前向き予測手法は、置換基の位置や数の変化および動物種差が及ぼす生体内動態および毒性の影響を予測し得ることが推察された。



## 第 II 章 ヒト由来の生体試料から検出され得る化学物質のリスク評価

### 第 1 節 緒言

第 I 章では、ヒト型モデル動物および簡易 PBPK モデルを活用し、注目した化学物質の物質質量から血中、肝中および尿中濃度を前向きに予測する手法を検証した。その結果、化学物質をラット、対照マウスおよびヒト肝キメラマウスに単回経口投与後の実測血漿中濃度を基に、簡易 PBPK モデルを用いて物質質量から生体内濃度を求める前向き予測手法は、化学物質の血中濃度の再現に加えて、肝中および尿中濃度の予測を可能とした。さらに、このような前向き予測手法は、置換基の位置や数の変化および動物種差が及ぼす生体内動態の影響および一部の化学物質の動物への毒性を評価し得ることが推察された。

スチレンとヒトのがん形態の因果関係を示す疫学的根拠は明らかではないが (Rueff et al., 2009)、国際がん研究機関はスチレンを発がん物質グループ B の揮発性有機化合物に指定している (Sexton et al., 2006)。2009-2010 年の米国疾病管理予防センター (CDC) から報告された 1320 名のヒト血液試料によるバイオモニタリング ([https://www.cdc.gov/exposurereport/data\\_tables.html](https://www.cdc.gov/exposurereport/data_tables.html)) より、スチレンはヒト血中から検出されており、血中濃度として最大 0.183 ng/mL のスチレンが検出されている。TBBPA は、ヒトでの潜在的な健康リスクが懸念されているが (Hakk and Letcher, 2003; Hays and Kirman, 2019; Wang et al., 2019)、近年、TBBPA およびその代謝物は、ヒト血中から濃度として検出されている (Hays and Kirman, 2019)。TBBPA は無毒性量 (NOAEL) および最小毒性量 (LOAEL) がそれぞれ 40 および 140 mg/kg/day と設定されており、これらの値に基づいて耐容一日摂取量 (TDI) が設定されている (Hays and Kirman, 2019)。フタル酸ジエステル類の

代謝物は、実験動物に限定した生殖毒性が報告されているが、1988年から継続的にヒト生体内から検出され続けている(Herr et al., 2009; Zeman et al., 2013; Koch et al., 2017)。アニリンおよびジメチルアニリン誘導体は、ヒトでの発がん性の可能性が報告されている(Chinthakindi and Kannan, 2022a)。アニリンおよびジメチルアニリン誘導体は一般的にペットとしてのイヌおよびネコの尿糞中から検出されていることに加えて、ヒトの尿中からも検出されている(Chinthakindi and Kannan, 2022b; Chinthakindi and Kannan, 2022a)。

このようにヒトの健康に影響を及ぼす可能性のある一般化学物質は、生活環境下に存在しており、ヒトは日々、それらに曝露され続けている。これら一般化学物質を意図的に体内へ取り込むことは少ないものの、近年高感度分析により、ヒトの血中および尿中等から種々の一般化学物質が濃度情報として予想外に検出されている。しかしながら、安全性が懸念される化学物質の経口曝露量の情報は十分ではない。以上の背景から、ヒト由来の生体試料から濃度として検出された上記化学物質に注目した。簡易 PBPK モデルによる後ろ向き予測手法を活用することで、ヒト生体試料中の化学物質の濃度から生活環境下でのヒト経口曝露量を推定し、各化学物質の TDI 値との比較からヒトへのリスクを評価することができると考えられる。本章では、ヒト血中および尿中由来の生体試料中から検出されたスチレン、TBBPA、DBP、DINP、アニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンの基質および代謝物に着目した。そこで、第 I 章で構築した各化学物質の動物 PBPK モデルからヒト PBPK モデルを構築した。次に、構築したヒト PBPK モデルを活用し、ヒト血中あるいは尿中より検出される化学物質の既報バイオモニタリング濃度から経口曝露量を予測し、ヒト体内動態を加味する化学物質のリスク評価を行うことを目的とした。

## 第2節 実験方法

### 2-1 簡易 PBPK モデルを用いた化学物質のヒト体内動態の前向き予測

ヒトの生体側の定数は、文献情報 (Ramsey and Andersen, 1984; Davies and Morris, 1993; Brown et al., 1997; Eriksson et al., 1998; Hurst et al., 1999; Clewell et al., 2000; Kato et al., 2008; Sweeney et al., 2008) より設定した (Table II-1)。腎血流量 ( $Q_r$ ) の値は肝血流量 ( $Q_h$ ) と同様の値とした。

**Table II-1. Physiological parameters in human**

Physiological parameters	Human
Body weight (kg)	70.0
Liver weight (g)	1500
$Q_h$ (L/h)	96.6
$Q_r$ (L/h)	96.6
$V_h$ (L)	1.5
$V_r$ (L)	0.280
$V_b$ (L)	4.90
$V_u$ (mL/day)	1500

ラットからヒトの PBPK モデル用入力パラメータ値を外挿する際、ラットとヒトの肝重量、肝血流量および体重の種差を考慮することに加えて、肝固有クリアランスの種差を考慮する必要がある。その際、1 g の臓器当たり 40 mg のミクロゾームタンパク質、ラットの体重 (0.25 kg) 当たり 10 g の肝重量、ヒトの体重 (70 kg) 当たり 1.5 kg の肝重量として、ラットおよびヒトのスチレン *in vitro* 肝代謝消失速度をそれぞれ算出した (Takano et al., 2010)。以下の式 (28) から式 (33) に示す単種アロメトリックスケーリング法を活用し、スチレンのラット PBPK モデル用入力パラメータ値からヒト PBPK モデル用入力パラメータ値を外挿した。

$$k_{a, human} = 0.744 \cdot k_{a, rodent} \quad \text{式 (28)}$$

$$k_{12, human} = 0.744 \cdot k_{12, rodent} \quad \text{式 (29)}$$

$$k_{21, human} = 0.744 \cdot k_{21, rodent} \quad \text{式 (30)}$$

$$V_{ss, human}(L) = V_{ss, rodent}(L) \cdot \frac{\text{Body weight}_{human}}{\text{Body weight}_{rodent}} \quad \text{式 (31)}$$

$$CL_{r, human} = \frac{CL_{r, rodent}}{\text{Body weight}_{rodent}^{(2)}} \cdot \text{Body weight}_{human}^{(2)} \quad \text{式 (32)}$$

$$CL_{h, int, human} = CL_{h, int, rodent} \times \frac{CL_{h, int, human, in vitro}}{CL_{h, int, rodent, in vitro}} \quad \text{式 (33)}$$

ラットの場合とは異なり、ヒト肝キメラマウスからヒトに外挿する際、肝固有クリアランスの種差を考慮する必要がない。そのため、TBBPA、TBBPA グルクロン酸抱合体、MINP、MINP 酸化的代謝物、MBP、MBP グルクロン酸抱合体、アニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンのヒト PBPK モデル用入力パラメータ値は、肝重量、肝血流量および体重の種差のみを考慮して外挿した (Emoto et al., 2009; Takano et al., 2010; Adachi et al., 2015; Miyaguchi et al., 2015; Nishiyama et al., 2015; Utoh et al., 2016; Shimizu and Yamazaki, 2017)。算出したヒト PBPK モデル用パラメータ値を **Table II-2** に示す。

各化学物質の物質固有記述子は、第 I 章第 2 節 2-6 項に示したものと同様の値を使用した。化学物質のヒトでの  $f_{u,p}$  値は動物と同様と仮定し、同じ値を使用した (**Table I-2**)。

DBP をヒトに仮想単回経口投与した際の MBP および MBP グルクロン酸抱合体の PBPK モデルは、**Fig. I-2A** に模式的に示すように第 I 章第 2 節 2-6 項に示した式 (13) から式 (21) の微分方程式に準じて設定した。DINP をヒトに仮想単回経口投与した際の MINP および MINP 酸化的代謝物の PBPK モデルは、**Fig. I-2B** に模式的に示すように第 I 章第 2 節 2-6 項に示した式 (13)、(14)、(16)、

(18)、(20)、(22) および (23) の微分方程式に準じて設定した。スチレンをヒトに仮想単回経口投与した際のスチレンの PBPK モデルは、**Fig. I-2E** に模式的に示すように第 I 章第 2 節 2-6 項に示した式 (13) から式 (17) の微分方程式に準じて設定した。TBBPA をヒトに仮想単回経口投与した際の TBBPA および TBBPA グルクロン酸抱合体の PBPK モデルは、**Fig. I-2C** に模式的に示すように第 I 章第 2 節 2-6 項に示した式 (13)、(14)、(16)、(18)、(20)、(24)、(25)、(26) および (27) の微分方程式に準じて設定した。アニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンをヒトに仮想単回経口投与した際のアニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンの PBPK モデルは、**Fig. I-2F** に模式的に示すように第 I 章第 2 節 2-6 項に示した式 (13)、(14)、(16)、(24) および (25) の微分方程式に準じて設定した。

## 2-2 簡易 PBPK モデルを用いた化学物質のヒト体内動態の後ろ向き予測

生活環境下での一般化学物質のヒトへの経口曝露は継続的であるが、一日一回の経口曝露であると仮定し、化学物質の経口曝露量を後ろ向きに予測した。第 II 章第 3 節で示す注目した化学物質の血中および尿中の既報ヒトバイオモニタリング濃度(Silva et al., 2003; Seckin et al., 2009; Koch et al., 2017; Hays and Kirman, 2019; Chinthakindi and Kannan, 2022b) を定常状態の濃度であると仮定し、これらの報告濃度が各 PBPK モデルより出力した化学物質の一日当たりの血中および尿中 AUC 値を 24 時間で除した平均濃度と一致するような経口曝露量を後ろ向きに推定した。統計学的解析は第 I 章第 2 節 2-7 項に準じた。

**Table II-2. Experimental and calculated parameters for human PBPK models from rat or humanized-liver mouse models by a scale-up strategy established in this study**

Parameter	Fraction absorbed × intestinal availability	Absorption rate constant	Transfer rate constant	Transfer rate constant	Volume of systemic circulation	Hepatic intrinsic clearance	Hepatic clearance	Renal clearance	
Symbol (unit)	$F_a \cdot F_g$	$k_a$ (1/h)	$k_{12}$ (1/h)	$k_{21}$ (1/h)	$V_1$ (L)	$CL_{h,int}$ (L/h)	$CL_h$ (L/h)	$CL_r$ (L/h)	
Styrene		1	17.8	1.91	1.26	6.90	466	38.3	0.0428
Tetrabromobisphenol A	0.0142		1.14	na	na	311	31200	28.0	0.088
Tetrabromobisphenol A glucuronide	na	na	na	na	na	25.9	145	0.834	0.151
Monoisononyl phthalate		1	1.12	na	na	270	457	2.23	0.397
Hydroxylated monoisononyl phthalate		na	na	na	na	54.8	57.7	1.39	2.57
Monobutyl phthalate		1	2.35	na	na	0.401	308	10.3	0.993
Monobutyl phthalate glucuronide		na	na	na	na	1.29	7.82	1.48	1.69
Aniline		1	2.69	na	na	116	92.2	32.8	0.811
2,6-Dimethylaniline	0.442		3.04	na	na	1320	50.9	13.8	0.303

na ; not available.

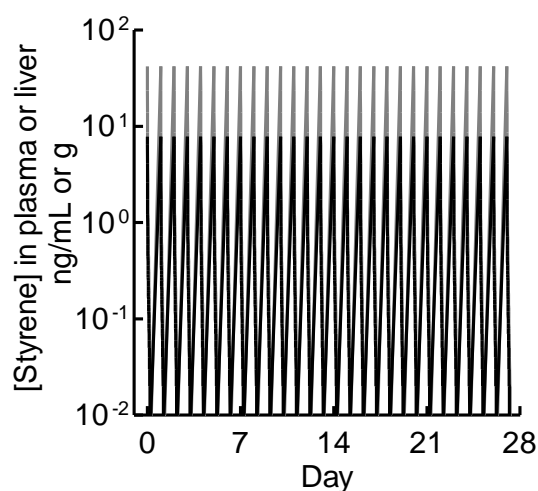
### 第3節 結果

#### 3-1 ヒト血中バイオモニタリング濃度を用いた化学物質の曝露量評価

ラットおよびヒト肝ミクロゾームを酵素源としたスチレンの *in vitro* 肝代謝消失速度を算出したところ、それぞれ 711 および 814 pmol/min/mg protein であり、ラットとヒトの代謝消失の種差は認められなかった。この結果より、スチレンのラット PBPK モデル用入力パラメータ値からヒト PBPK モデル用入力パラメータ値を算出し、スチレンのヒト PBPK モデルを構築した。2009-2010 年に CDC から報告された 1320 名の血液試料によるバイオモニタリング ([https://www.cdc.gov/exposurereport/data\\_tables.html](https://www.cdc.gov/exposurereport/data_tables.html)) より得られた、スチレンのヒト血中バイオモニタリング報告濃度の 50 および 95 パーセンタイル値は、それぞれ 0.03 以下および 0.132 ng/mL であった。構築したヒト PBPK モデルを用いて、これらの報告値を平均の血中濃度とした際のスチレン反復経口曝露量を後ろ向きに予測 (Reverse dosimetry) したところ、0.66 および 2.9  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と推定された (Table II-3)。推定した経口曝露量を用いてスチレンをヒトに 28 日間反復経口投与した際の血中および肝中仮想投与曲線を出力し、Fig. II-1 に図示する。出力したスチレンの肝中仮想投与曲線は血中仮想投与曲線と比較して高値を示し、ヒト体内においてスチレンの肝臓移行の可能性が示唆された (Fig. II-1)。

ヒト肝キメラマウス PBPK モデル用入力パラメータ値から算出したヒト PBPK モデル用入力パラメータ値を基に、TBBPA およびそのグルクロン酸抱合体のヒト PBPK モデルを構築した。Heys ら (Hays and Kirman, 2019) より報告された TBBPA およびそのグルクロン酸抱合体を合計した総 TBBPA のヒト血中バイオモニタリング報告濃度の中央値および最大値は、それぞれ 0.1 および 0.8 ng/mL

であった。構築したヒト PBPK モデルを用いて、これらの報告値を平均のヒト血中濃度とした際の TBBPA 反復経口曝露量を後ろ向きに予測したところ、2 および 17  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と推定された (Table II-3)。推定した経口曝露量を用いて TBBPA をヒトに 28 日間反復経口投与した際の TBBPA およびそのグルクロン酸抱合体の血中および肝中仮想投与曲線を出力し、Fig. II-2 に図示する。

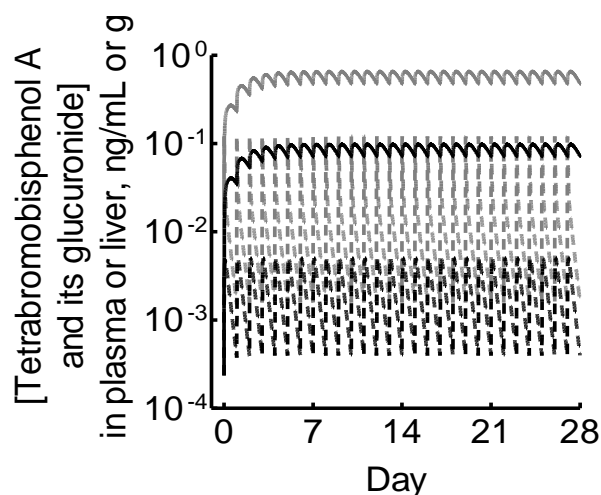


**Fig. II-1. Plasma (black line) and liver (gray line) concentrations of styrene in humans after repeated virtual oral doses of styrene (2.89  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) for 28 days as estimated using the PBPK model.** The dose of styrene was calculated using reverse dosimetry based on the 95th percentile values of reported blood styrene concentrations from human biomonitoring data in 2009-2010 published by the US Centers for Disease Control and Prevention. No accumulation of styrene in blood or plasma was evident.

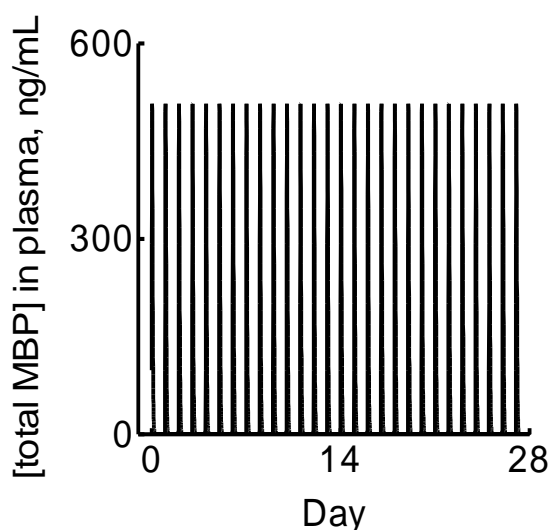
ヒト肝キメラマウスPBPKモデル用入力パラメータ値から算出したヒトPBPKモデル用入力パラメータ値を基に、DBPの見かけの親化合物および代謝物であるMBPおよびMBPグルクロン酸抱合体のヒトPBPKモデルを構築した。Silvaら(Silva et al., 2003)より報告されたMBPおよびそのグルクロン酸抱合体を合計した総MBPのヒト血中バイオモニタリング報告濃度の50および95パーセントイル値は、それぞれ14.4および38.2 ng/mLであった。構築したヒトPBPKモデルを用いて、これらの報告値を平均のヒト血中濃度とした際のDBP反復経口曝



露量を後ろ向きに予測したところ、13 および 34  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と推定された (Table II-3)。推定した経口曝露量を用いて DBP をヒトに 28 日間反復経口投与した際の MBP およびそのグルクロン酸抱合体の血中仮想投与曲線を出し、Fig. II-3 に図示する。



**Fig. II-2. Plasma (black) and liver (gray) concentrations of free tetrabromobisphenol A and its glucuronide (dashed and solid lines, respectively) in humans after repeated virtual oral doses of tetrabromobisphenol A (2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) for 28 days.** The dose of tetrabromobisphenol A was calculated by reverse dosimetry to obtain the daily intake that corresponded to the reported central tendencies of total tetrabromobisphenol A in plasma from human biomonitoring data.



**Fig. II-3. Plasma concentrations of total MBP (combined free and glucuronidated, solid lines) in humans after repeated virtual oral dose of DBP (34  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) for 14 days.** The dose of DBP was calculated by reverse dosimetry using the reported human biomonitoring data.

**Table II-3. Reverse dosimetry analyses using human PBPK models for chemicals daily intake after repeated virtual oral administrations for 14 or 28 days based on the reported human plasma mean/median and (95th/100th) concentrations of analyte in biomonitoring data**

Analyte in plasma	Reported biomonitoring, mean/median(95th/100th) concentrations in plasma, ng/mL	Chemical	Estimated daily doses by reverse dosimetry, mean/median (95th/100th) doses, µg/kg/day	TDI, µg/kg/day
Styrene	< 0.01 (0.13) <sup>a)</sup>	Styrene	< 0.1 (2.9)	7.7 <sup>b)</sup>
Total tetrabromobisphenol A	0.6 (0.80) <sup>c)</sup>	Tetrabromo-bisphenol A	2 (17)	73000 <sup>c)</sup>
Total monobutyl phthalate and its glucuronide	14 (38) <sup>d)</sup>	Dibutyl phthalate	13 (34)	10 <sup>e)</sup>

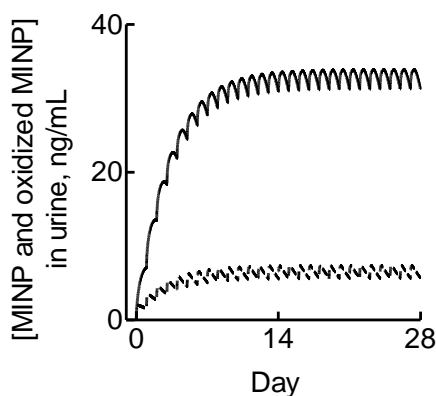
The reported plasma concentrations of analyte from biomonitoring in human and TDI values were taken from the literature (a, Human biomonitoring data in 2009-2010 published by the US CDC; b, WHO, 1996; c, Hays and Kirman, 2019; d, Silva et al., 2003; e, Seckin et al., 2009).

### 3-2 ヒト尿中バイオモニタリング濃度を用いた化学物質の曝露量評価

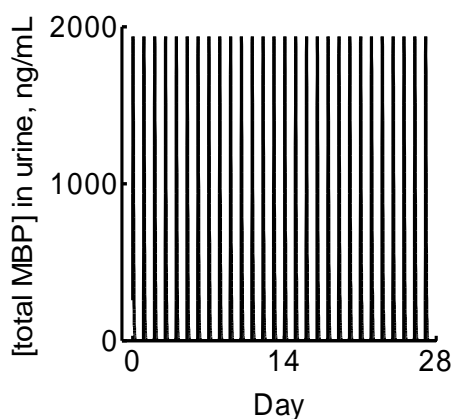
ヒト肝キメラマウスPBPKモデル用入力パラメータ値から算出したヒトPBPKモデル用入力パラメータ値を基に、DINPの見かけの親化合物および代謝物であるMINPおよびMINP酸化代謝物のヒトPBPKモデルを構築した。Kochら(Koch et al., 2017)より報告されたMINP酸化代謝物合計のヒト尿中バイオモニタリング報告濃度の50および95パーセンタイル値は、それぞれ5.3および33 ng/mLであった。構築したヒトPBPKモデルを用いて、これらの報告値を平均のヒト尿中濃度とした際のDINP反復経口曝露量を後ろ向きに予測したところ、それぞれ0.23および1.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ と推定された(Table II-4)。推定した経口曝露量を用いてDINPをヒトに28日間反復経口投与した際のMINPおよびその酸化代謝物の尿中仮想投与曲線を出力し、Fig. II-4に図示する。Silvaら(Silva et al., 2003)より報告されたMBPおよびそのグルクロン酸抱合体を合計した総MBPのヒト尿中バイオモニタリング報告濃度の50および95パーセンタイル値は、それぞれ30および149 ng/mLであった。第II章第3節3-1項で述べたMBPおよびMBPグルクロン酸抱合体のヒトPBPKモデルを用いて、これらの報告値を平均のヒト尿中濃度とした際のDBP反復経口曝露量を後ろ向きに予測したところ、それぞれ1.2および6.1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ と推定された(Table II-4)。推定した経口曝露量を用いてDBPをヒトに28日間反復経口投与した際のMBPおよびそのグルクロン酸抱合体の尿中仮想投与曲線を出力し、Fig. II-5に図示する。

ヒト肝キメラマウスPBPKモデル用入力パラメータ値から算出したヒトPBPKモデル用入力パラメータ値を基に、アニリンおよび2,6-ジメチルアニリンのヒトPBPKモデルを構築した。Sridharら(Chinthakindi and Kannan, 2022b)より報告されたアニリンならびに2,6-ジメチルアニリンのヒト尿中バイオモニタリング

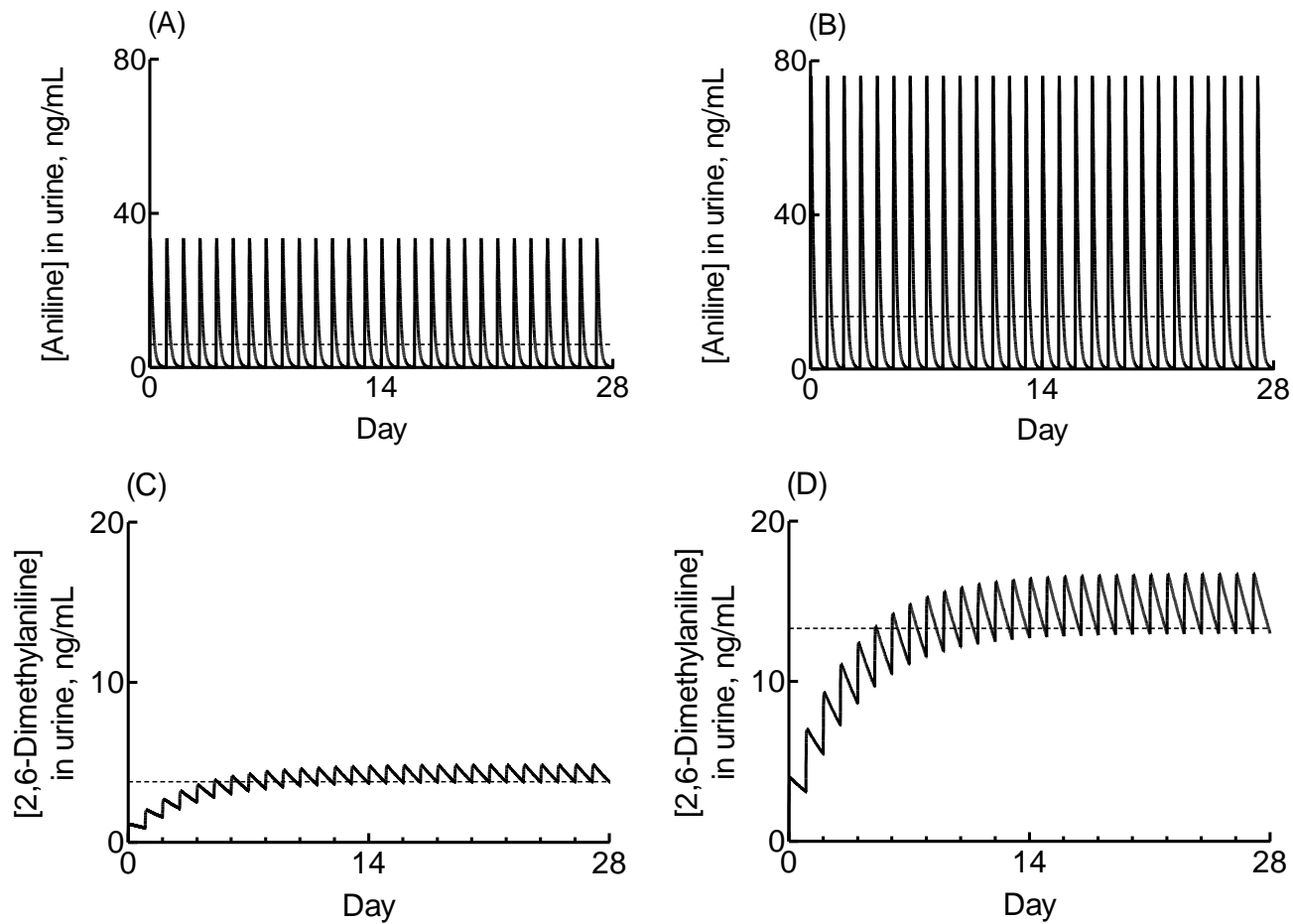
報告濃度の 50 および 95 パーセンタイル値は、それぞれ 6.0 および 13.7 ng/mL、ならびに 3.8 および 13.3 ng/mL であった。構築したヒト PBPK モデルを用いて、これらの報告値を平均のヒト尿中濃度とした際のアニリンおよび 2,6-ジメチルアニリン反復経口曝露量を後ろ向きに予測したところ、それぞれ 11 および 26  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、ならびに 8.3 および 29  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と推定された (Table II-4)。推定した経口曝露量を用いてアニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンをヒトに 28 日間反復経口投与した際のアニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンの尿中仮想投与曲線を出力し、Fig. II-6 に図示する。



**Fig. II-4. Human urinary concentrations of MINP and oxidized MINP after virtual administration of multiple doses of 1.4 mg/kg/day DINP for four weeks.** Solid and dashed lines show the PBPK model results for MINP and oxidized MINP, respectively.



**Fig. II-5. Urinary concentrations of total MBP (combined free and glucuronidated, solid lines) in humans after repeated virtual oral dose of DBP (13  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) for 28 days.** The dose of DBP was calculated by reverse dosimetry using the reported human biomonitoring data.



**Fig. II-6. Human urinary concentrations (solid lines) of aniline (A and B) and 2,6-dimethylaniline (C and D) after repeated virtual oral doses for 28 days.** The doses of aniline and 2,6-dimethylaniline were calculated by reverse dosimetry to obtain the daily intake [A, 11; B, 26; C, 8.3; and D, 29  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , respectively] that corresponded to the reported 50th (A and C) and 95th (B and D) percentiles of human urinary biomonitoring data (dashed lines) [A, 6.0; B, 13.7; C, 3.8; D, 13.3 ng/mL, respectively].

**Table II-4. Reverse dosimetry analyses using human PBPK models for chemicals daily intake after repeated virtual oral administrations for 14 or 28 days based on the reported human urinary mean/median and (95th/100th) concentrations of analyte in biomonitoring data**

Analyte in urine	Reported biomonitoring, mean/median (95th) concentrations in urine, ng/mL	Chemical	Estimated daily doses by reverse dosimetry, mean/median (95th) doses, $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$	TDI, $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$
Sum of oxidized monoisononyl phthalate	5.3 (33) <sup>a)</sup>	Diisononyl phthalate	0.23 (1.4)	150 <sup>b)</sup>
Total monobutyl phthalate and its glucuronide	30 (149) <sup>c)</sup>	Dibutyl phthalate	1.2 (6.1)	5-10 <sup>d)</sup>
Aniline	6.0 (13.7) <sup>e)</sup>	Aniline	11 (26)	7 <sup>e)</sup>
2,6-Dimethylaniline	3.8 (13.3) <sup>e)</sup>	2,6-Dimethylaniline	8.3 (29)	Not available

The reported plasma concentrations of analyte from biomonitoring in human and TDI values were taken from the literature (a, Koch et al., 2017; b, European Food Safety Authority, EFSA J., 2005; c, Silva et al., 2003; d, Seckin et al., 2009; e, Chinthakindi and Kannan, 2022b).

### 3-3 PBPK モデル用入力パラメータ値と既報バイオモニタリング濃度の関係

スチレン、TBBPA および DBP の推定した単位経口曝露量当たりの各検出物質の血中バイオモニタリング報告濃度値と、各検出物質の肝クリアランス値の関係を調査したところ、見かけの負の相関関係 ( $r = -0.93$ ) が認められた (Fig. II-7A)。同様に、DINP、DBP、アニリンおよび2,6-ジメチルアニリンの推定した単位経口曝露量当たりの各検出物質の尿中バイオモニタリング報告濃度値と、各検出物質の肝クリアランス値の関係を調査したところ、同様に見かけの負の相関関係 ( $r = -0.75$ ) が認められた (Fig. II-7B)。ともに例数が限られており、算出された相関係数は有意ではなかったものの、見かけ上の負の相関関係が示唆された。

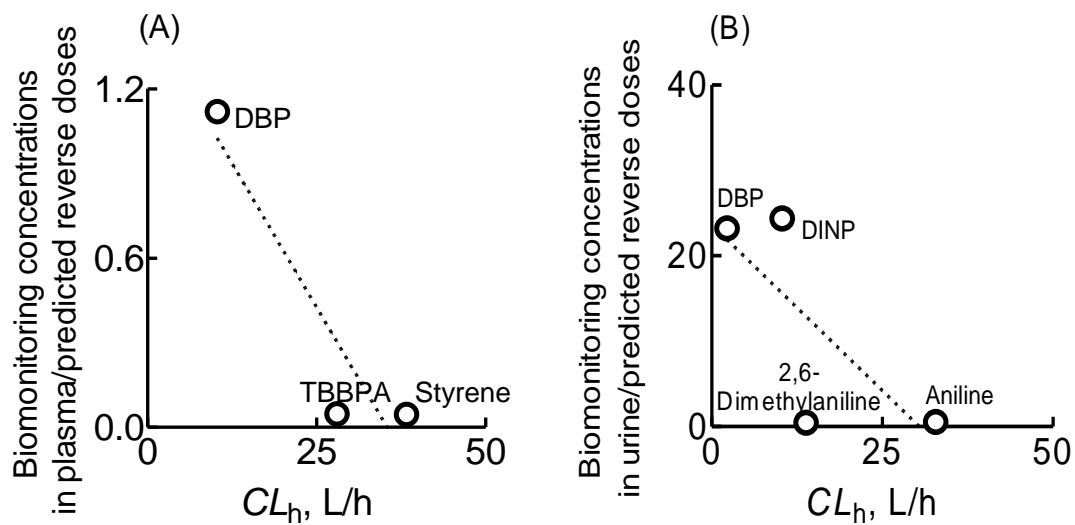


Fig. II-7. Relationship between biomonitoring concentrations in plasma (A) or urine (B) of estimated reverse doses and the hepatic clearance of analytes.

#### 第4節 考察

本章では、スチレンはラット PBPK モデルより、TBBPA とその代謝物、DBP とその代謝物、DINP とその代謝物、アニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンはヒト肝キメラマウス PBPK モデルより、単種アロメトリックスケーリング法を用いてヒト PBPK モデルを構築した。これらヒト PBPK モデルを用いて、報告された各化学物質の血中もしくは尿中バイオモニタリング報告濃度から、反復仮想投与時の経口曝露量を後ろ向きに推定し、各化学物質の現行 TDI 値と比較することで、生活環境下でのヒトでの安全性リスクを評価した。

2009-2010 年、米国 CDC の報告 ([https://www.cdc.gov/exposurereport/data\\_tables.html](https://www.cdc.gov/exposurereport/data_tables.html)) より、スチレンはヒト血中から最大で 0.183 ng/mL もの濃度として検出されている。このスチレンのヒト血中バイオモニタリング報告濃度から推定したスチレン経口曝露量は 2.9  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であった。現行スチレンの TDI 値は、1996 年に世界保健機関(WHO)より 7.7  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と設定されている(WHO., 1996)。推定したスチレンの経口曝露量は、現行 TDI 値と比較して同程度の桁数であることが認められた (**Table II-3**)。このことより、生活環境下でのスチレンの曝露により、ヒトに悪影響を及ぼす可能性が推察された。

TBBPA は、ヒトでの潜在的な健康リスクが懸念されており(Hakk and Letcher, 2003; Hays and Kirman, 2019; Wang et al., 2019)、代謝物を含む TBBPA はヒト血中から最大で 0.8 ng/mL もの濃度として検出されている(Hays and Kirman, 2019)。この TBBPA のヒト血中バイオモニタリング報告濃度から推定した TBBPA 経口曝露量は 17  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であった。現行 TBBPA の TDI 値は 73000  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と設定されている(Hays and Kirman, 2019)。推定した TBBPA の経口曝露量は、現行



TDI 値と比較して 3 桁程度低値であることが認められた (Table II-3)。このことより、生活環境下での TBBPA の曝露は認められるものの、日常摂取量に換算した場合、ヒトに悪影響を及ぼす可能性は低いことが推察された。

フタル酸ジエステル類 DBP および DINP は、実験動物に限定した生殖毒性が報告されている(Oishi and Hiraga, 1980; Gray et al., 1982; Kluwe et al., 1983; Hellwig et al., 1997; Wine et al., 1997; Silva et al., 2003; Koch et al., 2006)。一般集団の成人被験者の生体試料中の DBP 代謝物濃度から推定された DBP の推定一日摂取量は 1996 年以降減少傾向を示し、2003 年は  $1.9 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と推定された(Wittassek et al., 2007)。DBP の TDI 値は、2005 年に欧州食品安全委員会により  $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と設定された(Seckin et al., 2009)。2005 年の米国の研究では、モデリング計算を用いた一般集団の DBP の推定一日曝露量の 95 パーセンタイル値は  $2.68 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であることが報告された(Marsee et al., 2006)。カプセル剤の腸溶性コーティングに使用される DBP (3.6 mg) は、欧州での DBP の TDI 値である  $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  よりも高い曝露を引き起こす可能性があることと示唆されたことから、現行 DBP の TDI 値は、日本食品安全委員会より  $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と設定されている(Seckin et al., 2009)。DBP 代謝物はヒト血中から最大で  $38 \text{ ng}/\text{mL}$  もの濃度として検出されており(Silva et al., 2003)、この DBP 代謝物のヒト血中バイオモニタリング報告濃度から推定した DBP 経口曝露量は  $34 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であった。この推定した経口曝露量は、現行 DBP の TDI 値である  $5\text{-}10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と比較して超過することが認められた (Table II-3)。このことより、DBP の新規製品への使用規制がされているものの、報告されている化学物質の使用状況が継続するならば、DBP がヒトに悪影響を及ぼす可能性は高いことが推察された。

DBP 代謝物はヒト血中と同様に尿中から  $149 \text{ ng}/\text{mL}$  もの濃度として検出され

ている(Silva et al., 2003)。この DBP 代謝物のヒト尿中バイオモニタリング報告濃度から推定した DBP 経口曝露量は 6.1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であった。この推定した経口曝露量は、上述した現行 DBP の TDI 値と比較して、同程度もしくは一部超過する可能性が認められた (Table II-4)。このことより、生活環境下での DBP の曝露により、ヒトに悪影響を及ぼす可能性は高いことが推察された。

ドイツ人尿中バイオモニタリングより、DINP 代謝物は 1988 年から継続的に検出されていることから(Herr et al., 2009; Zeman et al., 2013; Koch et al., 2017)、現行 DINP の TDI 値は、欧州食品安全委員会により 150  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と設定されている。ヒト尿中バイオモニタリング報告濃度から推定した DINP 経口曝露量は 1.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であり、現行 DINP の TDI 値と比較して 100 倍程度低値であることが認められた (Table II-4)。このことより、生活環境下での DINP の曝露により、ヒトに悪影響を及ぼす可能性は低いことが推察された。

アニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンは一般的にペットとしてのイヌおよびネコの尿糞中から検出されていることに加えて、ヒト尿中から 13.7 および 13.3  $\text{ng}/\text{mL}$  もの濃度として検出されている (Chinthakindi and Kannan, 2022b; Chinthakindi and Kannan, 2022a)。これらのヒト尿中バイオモニタリング報告濃度から推定したアニリンおよび 2,6-ジメチルアニリン経口曝露量はそれぞれ、26 および 29  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であった。現行アニリンの TDI 値は、米国環境保護庁より 7.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と設定されている(Chinthakindi and Kannan, 2022b)。推定したアニリンの経口曝露量は、現行アニリンの TDI 値と比較して超過することが認められた (Table II-4)。2,6-ジメチルアニリンの TDI 値は設定されていないが、現行アニリンの TDI 値と比較した場合、推定した 2,6-ジメチルアニリンの経口曝露量は、TDI 値を超過することが認められた (Table II-4)。これらのことより、生

活環境下でのアニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンの曝露により、ヒトに悪影響を及ぼす可能性は高いことが推察された。

本研究にて、特に注目したフタル酸ジエステル類、アニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンに関して、以下に記述する。DBP 代謝物は本研究にて唯一、血中および尿中の両バイオモニタリング報告濃度を収集できた化学物質である。血中および尿中バイオモニタリング報告濃度から推定した経口曝露量は、どちらも現行 DBP の TDI 値と同程度もしくは超過することが認められた。実験動物に限定した生殖毒性の観点から、炭素側鎖の短い DBP は炭素側鎖の長い DINP および DEHP 等に代替され始めており、DBP の使用は一部規制がなされている(Oishi and Hiraga, 1980; Gray et al., 1982; Kluwe et al., 1983; Hellwig et al., 1997; Wine et al., 1997; Silva et al., 2003; Koch et al., 2006)。しかしながら、2017 年度に我が国の環境省環境保健部環境リスク評価室より発表された化学物質のヒトへの曝露量モニタリング調査(<https://www.env.go.jp/chemi/kenkou/monitoring.html>)より、ヒト尿中から DBP 代謝物が平均で 48.1 ng/mL 検出されたと報告されており、最大でその約 100 倍もの DBP 代謝物の検出が報告されている。これらのことより、DBP が一部の日本人にも悪影響を及ぼす可能性は高いと推察された。DBP の代替として使用されている DINP の安全性調査を目的として、2007 年 Koch ら(Koch and Angerer, 2007)により、1.27 mg/kg の標識化した DINP を一般集団に経口投与した研究が行われ、ヒト尿中へ排泄される DINP 代謝物の挙動が調査された。本研究にて推定した DINP 経口曝露量は、現行 TDI 値と比較して低値であったことから、生活環境下において DINP がヒトに悪影響を及ぼす可能性は低いことが推察された。

以上のことから、化学物質の既報バイオモニタリング濃度から経口曝露量を

後ろ向きに推定する本手法は、フタル酸ジエステル類、アニリンおよびジメチルアニリン誘導体等のリスク評価を可能としたことに加えて、化学物質の工業使用規制に関する科学的根拠の情報になり得ることが示唆された。これら推定経口曝露量および既報バイオモニタリング濃度に影響を及ぼすと思われる薬物動態パラメータ値を明らかにするために、各化学物質の推定した単位経口曝露量当たりの各検出物質の血中および尿中バイオモニタリング報告濃度値と、各検出物質の肝クリアランス値の関係を調査したところ、見かけの負の相関関係が認められた (**Fig. II-7A, B**)。このことより、生活環境下におけるヒトへの化学物質の曝露量は様々であるが、ヒト血中および尿中に化学物質が濃度として検出される要因の一つに、個別化学物質の遅い肝代謝消失が関与する可能性が推察された。

次に本研究で算出したヒト PBPK モデル用入力パラメータ値より、2,6-ジメチルアニリンの  $CL_h$  値はアニリンの  $CL_h$  値と比較して約 3 倍低値であり、推定した経口曝露量を用いて 28 日間反復投与時の 2,6-ジメチルアニリン尿中仮想投与曲線には蓄積性が認められたことから、2,6-ジメチルアニリンはヒト生体内に蓄積する可能性が示唆され、リスクの可能性も高くなることが推察された。

以上の知見より、本章をまとめると、ヒト PBPK モデルを用いてヒト血中あるいは尿中より検出される化学物質の既報バイオモニタリング濃度から経口曝露量を求める後ろ向き予測手法は、注目した化学物質の生活環境下でのヒト経口曝露量の予測を可能とした。ヒト型モデル動物および簡易 PBPK モデルを用いた後ろ向き予測手法は、アニリン等をはじめとするベンゼン環構造を母核とした一般化学物質の肝代謝消失を加味したヒト体内動態を考慮するリスク評価を可能とし得ることを示唆した。

## 総括

生活環境下では、ヒトの健康に影響を及ぼすおそれのある様々な一般化学物質が存在し、日々ヒトは一般化学物質に曝露され続けている。近年高感度分析により、ヒトの血中および尿中等から種々の一般化学物質が濃度情報として検出されるが、安全性が懸念される化学物質の経口曝露量の情報は十分ではない。このような化学物質の多様なリスクは、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）に基づき、一般にげっ歯類に経口投与した際の生死や組織への影響等の結果から、体重当たりの投与量を用いて評価される。しかし、これらの評価には、動物とヒトとの間の種差が画一的に取り扱われ、それらの生体内動態の差異はほとんど考慮されていない。

以上の背景から、化学物質の経口曝露量および生体内濃度を双方向に繋ぎ、ヒト体内動態を考慮した複合的な化学物質のリスク評価手法が重要である。ヒト型モデル動物である免疫不全マウスにヒト肝細胞を移植したヒト肝キメラマウスは、肝臓の種差を考慮することなくヒト型肝代謝を再現でき、薬物動態研究等に広く利用され始めている。複雑な PBPK モデルは、極めて煩雑ながらも医薬領域での活用が始められている。ヒト肝キメラマウスと消化管吸収 ( $k_a$ )、全身循環分布容積 ( $V_1$ ) および肝代謝消失 ( $CL_{h, int}$ ) に着目した簡易 PBPK モデルを組み合わせることは、化学物質の経口曝露量と生体内濃度を双方向に予測し、体内動態を考慮したリスク評価の新汎用手法となる可能性がある。そこで本研究では、ヒト型モデル動物および簡易 PBPK モデルを活用し、ヒト由来生体試料から検出され得る化学物質を取り上げ、血中、肝中および尿中濃度を予測し、ヒト体内動態を加味する化学物質のリスク評価手法の検討を目的とした。

第 I 章では、合成樹脂原料スチレン、工業用溶媒ブロモベンゼン誘導体、可塑剤フタル酸エステル類および合成中間体アニリン誘導体等に注目し、酸解離定数および油水分配係数等の物質固有記述子を算出した。化合物の血中タンパク質非結合率および血球血漿分配率等を既報計算式より求め、PBPK モデル用入力パラメータ値に利用した。注目した化学物質をラットおよびヒト肝キメラマウスに経口投与した際の血漿中濃度を分離分析により実測した。得られた実測血漿中濃度を基に、PBPK モデル用入力パラメータ値 ( $k_a$ ,  $V_1$ , および  $CL_{h, int}$ ) をフィッティング計算により算出し、動物 PBPK モデルを構築した。これら動物モデルより出力した化学物質の血中仮想投与曲線は実測血中濃度を再現した。血中濃度と同時に出力できる化学物質の肝中濃度を検証するため、ブロモベンゼン誘導体経口投与 2 時間後のヒト肝キメラマウスの肝臓を摘出し、1 時点にて実測したところ、PBPK モデルが出力する肝中仮想投与曲線と概ね一致した。併せて出力される尿中濃度を実証するため、ヒト肝キメラマウスにフタル酸ジイソノニル経口投与後の尿試料を実測したところ、一次代謝物であるフタル酸モノエステル体および側鎖の酸化的代謝物が分離定量され、実測尿中濃度は動物 PBPK モデルより出力した予測尿中濃度結果と概ね同様であった。以上より、注目化学物質の動物血中濃度を基に、簡易 PBPK モデルを用いて物質質量から生体内濃度を求める前向き予測手法は、化学物質の血中濃度の再現に加え、肝中および尿中濃度の予測を可能とした。

第 II 章では、注目した化学物質におけるヒト肝キメラマウスの PBPK モデル用入力パラメータ値を外挿し、ヒト PBPK モデルを構築した。フタル酸ジイソノニルエステル、フタル酸ジブチルエステル、アニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンの既報ヒト尿中バイオモニタリング濃度から、ヒト PBPK モデルを用いて

経口曝露量を後ろ向きに予測し、TDI 値と比較した。フタル酸ジイソノニルの予測経口曝露量は TDI 値を下回っていた一方、フタル酸ジブチルエステル、アニリンおよび 2,6-ジメチルアニリンの予測経口曝露量は TDI 値と同程度もしくは超過することが示唆された。別途各化学物質の単位経口曝露量当たりの既報血中もしくは尿中バイオモニタリング濃度および肝クリアランス値との関係を調査したところ、それぞれ見かけの逆相関の関係が認められた。これらのことより、生活環境下におけるヒトへの化学物質曝露量は様々であるが、ヒト血中もしくは尿中に化学物質が濃度として検出される要因の一つに、個別物質の遅い肝代謝消失があると推察された。以上より、ヒト血中あるいは尿中より検出される化学物質の既報バイオモニタリング濃度からヒト PBPK モデルを用いて経口曝露量を求める後ろ向き予測手法は、化学物質の肝代謝消失を加味したヒト体内動態を考慮するリスク評価を可能としうることを示唆した。

以上のことより、ヒト型モデル動物および簡易 PBPK モデルを組合わせた本研究は、化学物質の動物血中濃度推移を基に、血中濃度の再現に加えて肝中および尿中濃度を予測することを可能とし、化学物質の動物への経口曝露量から生体試料中濃度を前向きに予測する手法となることを明らかにした。さらに本研究は、生活環境下における化学物質のヒト生体試料中濃度からヒト PBPK モデルを用いて経口曝露量を後ろ向きに予測することを可能とし、肝代謝消失を加味したヒト体内動態を考慮するリスク評価手法となり得ることを示唆した。以上、ヒト型モデル動物および小腸、肝臓、全身循環および/または腎からなる簡易 PBPK モデルを活用し、化学物質のヒト経口曝露量および生体内濃度を双方向に予測する本研究成果は、着目したアニリン等をはじめとするベンゼン環構造を母核とした類縁化学物質等のヒト肝代謝消失を考慮するリスク評価の新

手法となることが期待される。



## 本論文内容の誌上発表

本論文の内容は以下の原著論文に発表した。

- 1) Miura T. et al., Human plasma and liver concentrations of styrene estimated by combining a simple physiologically based pharmacokinetic model with rodent data, *J. Toxicol. Sci.*, 44, 543-538, 2019
- 2) Miura T. et al., Different hepatic concentrations of bromobenzene, 1,2-dibromobenzene, and 1,4-dibromobenzene in humanized-liver mice predicted using simplified physiologically based pharmacokinetic models as putative markers of toxicological potential, *Chem. Res. Toxicol.*, 33, 3048-3053, 2020
- 3) Miura T. et al., Metabolic profiles of tetrabromobisphenol A in humans extrapolated from humanized-liver mouse data using a simplified physiologically based pharmacokinetic model, *Chem. Res. Toxicol.*, 34, 522-528, 2021
- 4) Miura T. et al., Human urinary concentrations of monoisononyl phthalate estimated using physiologically based pharmacokinetic modeling and experimental pharmacokinetics in humanized-liver mice orally administered with diisononyl phthalate, *Xenobiotica*, 49, 513-520, 2019
- 5) Miura T. et al., Steady-state human pharmacokinetics of monobutyl phthalate predicted by physiologically based pharmacokinetic modeling using single-dose data from humanized-liver mice orally administered with dibutyl phthalate, *Chem. Res. Toxicol.*, 32, 333-340, 2019
- 6) Miura T. et al., Differences in pharmacokinetics and haematotoxicities of aniline and its dimethyl derivatives orally administered in rats, *Biol. Pharm. Bull.*, 44, 1784-1789, 2021
- 7) Miura T. et al., Forward and reverse dosimetry for aniline and 2,6-dimethylaniline in humans extrapolated from humanized-liver mouse data using simplified physiologically based pharmacokinetic models, *J. Toxicol. Sci.*, 47, 531-538, 2022.

## 謝辞

本研究の遂行および本論文を作成するにあたり、終始御丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました昭和薬科大学薬物動態学研究室教授 山崎浩史先生に深甚なる謝意を表しますと共に、篤く御礼申し上げます。

本論文の主査としてのご審査を賜りました昭和薬科大学薬理学研究室教授 渡邊泰男先生、副査としてご審査を賜りました同薬物治療学研究室教授 水谷 顕洋先生および微生物学研究室教授 金本 大成先生に深く感謝致します。

さらに本研究に多くの御助言および御支援をいただきました公益財団法人実験動物中央研究所 末水洋志先生および上原正太郎先生、株式会社 LSI メディエンス 岩田宏先生、後藤優知先生および坂井紀文先生、株式会社新日本科学 戸田亜希子先生および可塑剤工業会の皆様、ならびに昭和薬科大学薬物動態学研究室准教授 清水万紀子先生、同講師 村山典恵先生、特任助教 神矢佑輔先生（現琉球大学病院薬剤部薬剤師）および特任助教 安達昂一郎先生に厚く御礼申し上げます。

最後に、主論文の共著者である昭和薬科大学薬物動態学研究室 草間崇史氏、水野紗和氏、中里真悠子氏、吉沢愛映氏、中野彩音氏、重田和樹氏および柳麻由氏ならびに本研究の遂行に種々御協力、御便宜を図って戴きました同研究室の皆様にご心より感謝と御礼を申し上げます。

本研究は日本薬学会長井記念薬学研究奨励（N-192903）および日本学術振興会特別研究員奨励（202021210）の支援を受けました。ここに記し、謝意を述べます。

## 参考文献

- Adachi K, Suemizu H, Murayama N, Shimizu M, and Yamazaki H (2015) Human biofluid concentrations of mono(2-ethylhexyl)phthalate extrapolated from pharmacokinetics in chimeric mice with humanized liver administered with di(2-ethylhexyl)phthalate and physiologically based pharmacokinetic modeling. *Environ Toxicol Pharmacol* **39**:1067-1073.
- Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL, Jordan S, and Matthews HB (1982) Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ Health Perspect* **45**:19-25.
- Alwis KU, Blount BC, Britt AS, Patel D, and Ashley DL (2012) Simultaneous analysis of 28 urinary VOC metabolites using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI/MSMS). *Anal Chim Acta* **750**:152-160.
- Boogaard PJ, de Kloe KP, Wong BA, Sumner SC, Watson WP, and van Sittert NJ (2000) Quantification of DNA adducts formed in liver, lungs, and isolated lung cells of rats and mice exposed to (14)C-styrene by nose-only inhalation. *Toxicol Sci* **57**:203-216.
- Borghoff SJ, Wikoff D, Harvey S, and Haws L (2016) Dose- and time-dependent changes in tissue levels of tetrabromobisphenol A (TBBPA) and its sulfate and glucuronide conjugates following repeated administration to female Wistar Han Rats. *Toxicol Rep* **3**:190-201.
- Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, and Beliles RP (1997) Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health* **13**:407-484.
- Bugosen S, Mantilla ID, and Tarazona-Vasquez F (2020) Techno-economic analysis of aniline production via amination of phenol. *Heliyon* **6**:e05778.
- Chakrabarti S (1991) Potential tolerance against bromobenzene-induced acute hepatotoxicity due to prior subchronic exposure. *Arch Toxicol* **65**:681-684.
- Chinthakindi S and Kannan K (2021) Primary aromatic amines in indoor dust from 10 countries and associated human exposure. *Environ Int* **157**:106840.
- Chinthakindi S and Kannan K (2022a) Urinary and fecal excretion of aromatic amines in pet dogs and cats from the United States. *Environ Int* **163**:107208.
- Chinthakindi S and Kannan K (2022b) Variability in urinary concentrations of primary aromatic amines. *Sci Total Environ* **831**:154768.
- Choi K, Joo H, Campbell JL, Jr., Clewell RA, Andersen ME, and Clewell HJ, 3rd (2012) In vitro metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by various tissues and cytochrome P450s of human and rat. *Toxicol In Vitro* **26**:315-322.
- Clewell HJ, 3rd, Gentry PR, Covington TR, and Gearhart JM (2000) Development of a physiologically based pharmacokinetic model of trichloroethylene and its metabolites for use in risk assessment. *Environ Health Perspect* **108 Suppl 2**:283-305.
- Csanady GA, Kessler W, Hoffmann HD, and Filser JG (2003) A toxicokinetic model for styrene and its metabolite styrene-7,8-oxide in mouse, rat and human with special emphasis on the lung. *Toxicol Lett* **138**:75-102.
- Davies B and Morris T (1993) Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res* **10**:1093-1095.

- Dekant W and Bridges J (2016) Assessment of reproductive and developmental effects of DINP, DnHP and DCHP using quantitative weight of evidence. *Regul Toxicol Pharmacol* **81**:397-406.
- Dodd DE, Pluta LJ, Sochaski MA, Banas DA, and Thomas RS (2013) Subchronic hepatotoxicity evaluation of bromobenzene in Fischer 344 rats. *J Appl Toxicol* **33**:370-377.
- Emoto C, Murayama N, Rostami-Hodjegan A, and Yamazaki H (2009) Utilization of estimated physicochemical properties as an integrated part of predicting hepatic clearance in the early drug-discovery stage: Impact of plasma and microsomal binding. *Xenobiotica* **39**:227-235.
- Emoto C, Shimizu M, Tanaka T, and Yamazaki H (2021) Feasibility of physiologically based pharmacokinetic simulations for assessing pediatric patients after accidental drug ingestion: A case study of a 1.4-year-old girl who ingested alprazolam. *Drug Metab Pharmacokinet* **39**:100394.
- Eriksson T, Bjorkman S, Roth B, Bjork H, and Høglund P (1998) Hydroxylated metabolites of thalidomide: formation in-vitro and in-vivo in man. *J Pharm Pharmacol* **50**:1409-1416.
- Foster PM, Cook MW, Thomas LV, Walters DG, and Gangolli SD (1983) Differences in urinary metabolic profile from di-n-butyl phthalate-treated rats and hamsters. A possible explanation for species differences in susceptibility to testicular atrophy. *Drug Metab Dispos* **11**:59-61.
- Fukami T, Katoh M, Yamazaki H, Yokoi T, and Nakajima M (2008) Human cytochrome P450 2A13 efficiently metabolizes chemicals in air pollutants: naphthalene, styrene, and toluene. *Chem Res Toxicol* **21**:720-725.
- Goncalves LL, Beland FA, and Marques MM (2001) Synthesis, characterization, and comparative <sup>32</sup>P-postlabeling efficiencies of 2,6-dimethylaniline-DNA adducts. *Chem Res Toxicol* **14**:165-174.
- Gray TJ, Rowland IR, Foster PM, and Gangolli SD (1982) Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicol Lett* **11**:141-147.
- Hakk H and Letcher RJ (2003) Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants--a review. *EnvironInt* **29**:801-828.
- Hartman JH, Boysen G, and Miller GP (2012) CYP2E1 metabolism of styrene involves allostery. *Drug Metab Dispos* **40**:1976-1983.
- Hartman JH, Boysen G, and Miller GP (2013) Cooperative effects for CYP2E1 differ between styrene and its metabolites. *Xenobiotica* **43**:755-764.
- Hartman JH, Letzig LG, Roberts DW, James LP, Fifer EK, and Miller GP (2015) Cooperativity in CYP2E1 metabolism of acetaminophen and styrene mixtures. *Biochem Pharmacol* **97**:341-349.
- Hasegawa M, Kawai K, Mitsui T, Taniguchi K, Monnai M, Wakui M, Ito M, Suematsu M, Peltz G, Nakamura M, and Suemizu H (2011) The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional. *Biochem Biophys Res Commun* **405**:405-410.
- Hays SM and Kirman CR (2019) Biomonitoring Equivalents (BEs) for tetrabromobisphenol A. *Regul Toxicol Pharmacol* **102**:108-114.
- Heijne WH, Slitt AL, van Bladeren PJ, Groten JP, Klaassen CD, Stierum RH, and van Ommen B (2004) Bromobenzene-induced hepatotoxicity at the transcriptome level. *Toxicol Sci* **79**:411-422.
- Heijne WH, Stierum RH, Slijper M, van Bladeren PJ, and van Ommen B (2003)

- Toxicogenomics of bromobenzene hepatotoxicity: a combined transcriptomics and proteomics approach. *Biochem Pharmacol* **65**:857-875.
- Hellwig J, Freudenberger H, and Jackh R (1997) Differential prenatal toxicity of branched phthalate esters in rats. *Food Chem Toxicol* **35**:501-512.
- Herr C, zur Nieden A, Koch HM, Schuppe HC, Fieber C, Angerer J, Eikmann T, and Stilianakis NI (2009) Urinary di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)--metabolites and male human markers of reproductive function. *Int J Hyg Environ Health* **212**:648-653.
- Hsu JY, Hsu JF, Chen YR, Shih CL, Hsu YS, Chen YJ, Tsai SH, and Liao PC (2016) Urinary exposure marker discovery for toxicants using ultra-high pressure liquid chromatography coupled with Orbitrap high resolution mass spectrometry and three untargeted metabolomics approaches. *Anal Chim Acta* **939**:73-83.
- Huang SM and Rowland M (2012) The role of physiologically based pharmacokinetic modeling in regulatory review. *Clin Pharmacol Ther* **91**:542-549.
- Hurst R, Bao Y, Ridley S, and Williamson G (1999) Phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase activity of human serum albumin. *Biochem J* **338 ( Pt 3)**:723-728.
- Ito Y, Yokota H, Wang R, Yamanoshita O, Ichihara G, Wang H, Kurata Y, Takagi K, and Nakajima T (2005) Species differences in the metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in several organs of mice, rats, and marmosets. *Arch Toxicol* **79**:147-154.
- Jenkins FP, Robinson JA, Gellatly JB, and Salmond GW (1972) The no-effect dose of aniline in human subjects and a comparison of aniline toxicity in man and the rat. *Food Cosmet Toxicol* **10**:671-679.
- Kamiya Y, Handa K, Miura T, Ohori J, Kato A, Shimizu M, Kitajima M, and Yamazaki H (2022) Machine learning prediction of the three main input parameters of a simplified physiologically based pharmacokinetic model subsequently used to generate time-dependent plasma concentration data in humans after oral doses of 212 disparate chemicals. *Biol Pharm Bull* **45**:124-128.
- Kamiya Y, Handa K, Miura T, Ohori J, Shimizu M, Kitajima M, Shono F, Funatsu K, and Yamazaki H (2021) An updated in silico prediction method for volumes of systemic circulation of 323 disparate chemicals for use in physiologically based pharmacokinetic models to estimate plasma and tissue concentrations after oral doses in rats. *Chem Res Toxicol* **34**:2180-2183.
- Kamiya Y, Otsuka S, Miura T, Takaku H, Yamada R, Nakazato M, Nakamura H, Mizuno S, Shono F, Funatsu K, and Yamazaki H (2019) Plasma and hepatic concentrations of chemicals after virtual oral administrations extrapolated using rat plasma data and simple physiologically based pharmacokinetic models. *Chem Res Toxicol* **32**:211-218.
- Kamiya Y, Otsuka S, Miura T, Yoshizawa M, Nakano A, Iwasaki M, Kobayashi Y, Shimizu M, Kitajima M, Shono F, Funatsu K, and Yamazaki H (2020) Physiologically based pharmacokinetic models predicting renal and hepatic concentrations of industrial chemicals after virtual oral doses in rats. *Chem Res Toxicol* **33**:1736-1751.
- Kato M, Shitara Y, Sato H, Yoshisue K, Hirano M, Ikeda T, and Sugiyama Y (2008) The quantitative prediction of CYP-mediated drug interaction by physiologically based pharmacokinetic modeling. *Pharm Res* **25**:1891-1901.
- Kirman CR, Sweeney LM, Meek ME, and Gargas ML (2003) Assessing the dose-

- dependency of allometric scaling performance using physiologically based pharmacokinetic modeling. *Regul Toxicol Pharmacol* **38**:345-367.
- Kluwe WM, Haseman JK, and Huff JE (1983) The carcinogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in perspective. *J Toxicol Environ Health* **12**:159-169.
- Koch HM and Angerer J (2007) Di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine after a single oral dose of deuterium-labelled DINP. *Int J Hyg Environ Health* **210**:9-19.
- Koch HM, Becker K, Wittassek M, Seiwert M, Angerer J, and Kolossa-Gehring M (2007) Di-n-butylphthalate and butylbenzylphthalate - urinary metabolite levels and estimated daily intakes: pilot study for the German Environmental Survey on children. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **17**:378-387.
- Koch HM, Preuss R, and Angerer J (2006) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl* **29**:155-165; discussion 181-155.
- Koch HM, Ruther M, Schutze A, Conrad A, Palmke C, Apel P, Bruning T, and Kolossa-Gehring M (2017) Phthalate metabolites in 24-h urine samples of the German Environmental Specimen Bank (ESB) from 1988 to 2015 and a comparison with US NHANES data from 1999 to 2012. *Int J Hyg Environ Health* **220**:130-141.
- Koen YM, Gogichaeva NV, Alterman MA, and Hanzlik RP (2007) A proteomic analysis of bromobenzene reactive metabolite targets in rat liver cytosol in vivo. *Chem Res Toxicol* **20**:511-519.
- Krishnan K and Johanson G (2005) Physiologically-based pharmacokinetic and toxicokinetic models in cancer risk assessment. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* **23**:31-53.
- Latini G, Wittassek M, Del Vecchio A, Presta G, De Felice C, and Angerer J (2009) Lactational exposure to phthalates in Southern Italy. *Environ Int* **35**:236-239.
- Lau SS and Monks TJ (1988) The contribution of bromobenzene to our current understanding of chemically-induced toxicities. *Life Sci* **42**:1259-1269.
- Lewalter J and Korallus U (1985) Blood protein conjugates and acetylation of aromatic amines. New findings on biological monitoring. *Int Arch Occup Environ Health* **56**:179-196.
- Lof A, Gullstrand E, and Byfalt Nordqvist M (1983) Tissue distribution of styrene, styrene glycol and more polar styrene metabolites in the mouse. *Scand J Work Environ Health* **9**:419-430.
- Lof A, Gullstrand E, Lundgren E, and Nordqvist MB (1984) Occurrence of styrene-7,8-oxide and styrene glycol in mouse after the administration of styrene. *Scand J Work Environ Health* **10**:179-187.
- Marsee K, Woodruff TJ, Axelrad DA, Calafat AM, and Swan SH (2006) Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance. *Environ Health Perspect* **114**:805-809.
- Miura T, Kamiya Y, Uehara S, Murayama N, Shimizu M, Suemizu H, and Yamazaki H (2021) Hepatotoxicological potential of P-toluic acid in humanised-liver mice investigated using simplified physiologically based pharmacokinetic models. *Xenobiotica* **51**:636-642.
- Miyaguchi T, Suemizu H, Shimizu M, Shida S, Nishiyama S, Takano R, Murayama N, and Yamazaki H (2015) Human urine and plasma concentrations of bisphenol A extrapolated from pharmacokinetics established in in vivo experiments with chimeric mice with humanized liver and semi-physiological pharmacokinetic

- modeling. *Regul Toxicol Pharmacol* **72**:71-76.
- Murayama N, Suemizu H, Uehara S, Kusama T, Mitsui M, Kamiya Y, Shimizu M, Guengerich FP, and Yamazaki H (2018) Association of pharmacokinetic profiles of lenalidomide in human plasma simulated using pharmacokinetic data in humanized-liver mice with liver toxicity detected by human serum albumin RNA. *J Toxicol Sci* **43**:369-375.
- Niaz K, Mabqool F, Khan F, Ismail Hassan F, Baeri M, Navaei-Nigjeh M, Hassani S, Gholami M, and Abdollahi M (2017) Molecular mechanisms of action of styrene toxicity in blood plasma and liver. *Environ Toxicol* **32**:2256-2266.
- Nishiyama S, Suemizu H, Shibata N, Guengerich FP, and Yamazaki H (2015) Simulation of human plasma concentrations of thalidomide and primary 5-hydroxylated metabolites explored with pharmacokinetic data in humanized TK-NOG mice. *Chem Res Toxicol* **28**:2088-2090.
- Oishi S and Hiraga K (1980) Effects of phthalic acid monoesters on mouse testes. *Toxicol Lett* **6**:239-242.
- Palmiotto G, Pieraccini G, Moneti G, and Dolara P (2001) Determination of the levels of aromatic amines in indoor and outdoor air in Italy. *Chemosphere* **43**:355-361.
- Pauluhn J (2004) Subacute inhalation toxicity of aniline in rats: analysis of time-dependence and concentration-dependence of hematotoxic and splenic effects. *Toxicol Sci* **81**:198-215.
- Poulin P and Theil FP (2002) Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. II. Generic physiologically based pharmacokinetic models of drug disposition. *J Pharm Sci* **91**:1358-1370.
- 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.
- Rueff J, Teixeira JP, Santos LS, and Gaspar JF (2009) Genetic effects and biotoxicity monitoring of occupational styrene exposure. *Clin Chim Acta* **399**:8-23.
- Sakuratani Y, Zhang HQ, Nishikawa S, Yamazaki K, Yamada T, Yamada J, Gerova K, Chankov G, Mekenyan O, and Hayashi M (2013) Hazard Evaluation Support System (HESS) for predicting repeated dose toxicity using toxicological categories. *SAR QSAR Environ Res* **24**:351-363.
- Sayre RR, Wambaugh JF, and Grulke CM (2020) Database of pharmacokinetic time-series data and parameters for 144 environmental chemicals. *Sci Data* **7**:122.
- Schauer UM, Volkel W, and Dekant W (2006) Toxicokinetics of tetrabromobisphenol A in humans and rats after oral administration. *Toxicol Sci* **91**:49-58.
- Seckin E, Fromme H, and Volkel W (2009) Determination of total and free mono-n-butyl phthalate in human urine samples after medication of a di-n-butyl phthalate containing capsule. *Toxicol Lett* **188**:33-37.
- Sexton K, Adgate JL, Fredrickson AL, Ryan AD, Needham LL, and Ashley DL (2006) Using biologic markers in blood to assess exposure to multiple environmental chemicals for inner-city children 3-6 years of age. *Environ Health Perspect* **114**:453-459.
- Shimizu M and Yamazaki H (2017) Human plasma and urinary metabolic profiles of trimethylamine and trimethylamine N-oxide extrapolated using a simple physiologically based pharmacokinetic model. *J Toxicol Sci* **42**:485-490.
- Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, Kato K, Malek NA, Hodge CC, Hurtz D, 3rd, Calafat AM, Needham LL, and Brock JW (2003) Glucuronidation patterns of common urinary

- and serum monoester phthalate metabolites. *Arch Toxicol* **77**:561-567.
- Stabbert R, Schafer KH, Biefel C, and Rustemeier K (2003) Analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**:2125-2132.
- Suemizu H, Sota S, Kuronuma M, Shimizu M, and Yamazaki H (2014) Pharmacokinetics and effects on serum cholinesterase activities of organophosphorus pesticides acephate and chlorpyrifos in chimeric mice transplanted with human hepatocytes. *Regul Toxicol Pharmacol* **70**:468-473.
- Sweeney LM, Thrall KD, Poet TS, Corley RA, Weber TJ, Locey BJ, Clarkson J, Sager S, and Gargas ML (2008) Physiologically based pharmacokinetic modeling of 1,4-Dioxane in rats, mice, and humans. *Toxicol Sci* **101**:32-50.
- Szymanska JA, Bruchajzer E, Sporny S, and Piotrowski JK (1998) Changes in selected indicators of liver impairment after repeated administration of mono- and polybromobenzenes in mice. *Bull Environ Contam Toxicol* **61**:22-30.
- Szymanska JA and Piotrowski JK (2000) Hepatotoxicity of monobromobenzene and hexabromobenzene: effects of repeated dosage in rats. *Chemosphere* **41**:1689-1696.
- Szymanska JA, Sapota A, Wesolowski W, Czernski B, and Piotrowski JK (2002) Comparison of tissue distribution and metabolism of 1,2- and 1,4-dibromobenzenes in female rats. *Int J Occup Med Environ Health* **15**:375-383.
- Takano R, Murayama N, Horiuchi K, Kitajima M, Kumamoto M, Shono F, and Yamazaki H (2010) Blood concentrations of acrylonitrile in humans after oral administration extrapolated from in vivo rat pharmacokinetics, in vitro human metabolism, and physiologically based pharmacokinetic modeling. *Regul Toxicol Pharmacol* **58**:252-258.
- Takeuchi A, Namera A, Sakui N, Yamamoto S, Yamamuro K, Nishinoiri O, Endo Y, and Endo G (2019) Direct methyl esterification with 2,2-dimethoxypropane for the simultaneous determination of urinary metabolites of toluene, xylene, styrene, and ethylbenzene by gas chromatography-mass spectrometry. *J Occup Health* **61**:82-90.
- Tanaka K, Kiyosawa N, Watanabe K, and Manabe S (2007) Characterization of resistance to bromobenzene-induced hepatotoxicity by microarray. *J Toxicol Sci* **32**:129-134.
- Tsukada A, Suemizu H, Murayama N, Takano R, Shimizu M, Nakamura M, and Yamazaki H (2013) Plasma concentrations of melengestrol acetate in humans extrapolated from the pharmacokinetics established in in vivo experiments with rats and chimeric mice with humanized liver and physiologically based pharmacokinetic modeling. *Regul Toxicol Pharmacol* **65**:316-324.
- Turner M, Mantick NA, and Carlson GP (2005) Comparison of the depletion of glutathione in mouse liver and lung following administration of styrene and its metabolites styrene oxide and 4-vinylphenol. *Toxicology* **206**:383-388.
- Uchimura T, Kato M, Tachibana T, Arai S, Nabuchi Y, Saito K, and Kinoshita H (2008) New method for the simultaneous estimation of intrinsic hepatic clearance and protein binding by matrix inhibition. *Biopharm Drug Dispos* **29**:7-16.
- Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, and Suemizu H (2021) Oxidative metabolism and pharmacokinetics of the EGFR inhibitor BIBX1382 in chimeric NOG-TKm30 mice transplanted with human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* **41**:100419.
- Utoh M, Suemizu H, Mitsui M, Kawano M, Toda A, Uehara S, Uno Y, Shimizu M,



- Sasaki E, and Yamazaki H (2016) Human plasma concentrations of cytochrome P450 probe cocktails extrapolated from pharmacokinetics in mice transplanted with human hepatocytes and from pharmacokinetics in common marmosets using physiologically based pharmacokinetic modeling. *Xenobiotica* **46**:1049-1055.
- Wambaugh JF, Hughes MF, Ring CL, MacMillan DK, Ford J, Fennell TR, Black SR, Snyder RW, Sipes NS, Wetmore BA, Westerhout J, Setzer RW, Pearce RG, Simmons JE, and Thomas RS (2018) Evaluating in vitro-in vivo extrapolation of toxicokinetics. *Toxicol Sci* **163**:152-169.
- Wang J, Zhao X, Wang Y, and Shi Z (2019) Tetrabromobisphenol A, hexabromocyclododecane isomers and polybrominated diphenyl ethers in foodstuffs from Beijing, China: Contamination levels, dietary exposure and risk assessment. *Sci Total Environ* **666**:812-820.
- WHO. (1996) Guidelines for Drinking-Water Quality, Second Edition Volume 2: *Health Criteria and Other Supporting Information*, Pb. 486-494, Geneva.
- Wine RN, Li LH, Barnes LH, Gulati DK, and Chapin RE (1997) Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspect* **105**:102-107.
- Withey JR (1976) Quantitative analysis of styrene monomer in polystyrene and foods including some preliminary studies of the uptake and pharmacodynamics of the monomer in rats. *Environ Health Perspect* **17**:125-133.
- Wittassek M, Wiesmuller GA, Koch HM, Eckard R, Dobler L, Muller J, Angerer J, and Schluter C (2007) Internal phthalate exposure over the last two decades--a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg Environ Health* **210**:319-333.
- Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, and Uno T (1981) A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn* **4**:879-885.
- Yamashita M, Suemizu H, Murayama N, Nishiyama S, Shimizu M, and Yamazaki H (2014) Human plasma concentrations of herbicidal carbamate molinate extrapolated from the pharmacokinetics established in in vivo experiments with chimeric mice with humanized liver and physiologically based pharmacokinetic modeling. *Regul Toxicol Pharmacol* **70**:214-221.
- Yamazaki H, Suemizu H, Mitsui M, Shimizu M, and Guengerich FP (2016) Combining chimeric mice with humanized liver, mass spectrometry, and physiologically-based pharmacokinetic modeling in toxicology. *Chem Res Toxicol* **29**:1903-1911.
- Zeman FA, Boudet C, Tack K, Floch Barneaud A, Brochot C, Pery AR, Oleko A, and Vandentorren S (2013) Exposure assessment of phthalates in French pregnant women: results of the ELFE pilot study. *Int J Hyg Environ Health* **216**:271-279.
- Zhang J, Bai R, Zhou Z, Liu X, and Zhou J (2017) Simultaneous analysis of nine aromatic amines in mainstream cigarette smoke using online solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **409**:2993-3005.
- Zhou SF (2009) Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: part II. *Clin Pharmacokinet* **48**:761-804.