

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16422

研究課題名(和文) 吸収過程を考慮した生理学的薬物動態モデルを基盤とする化学物質肝毒性評価法の確立

研究課題名(英文) Evaluation of hepatotoxicity of industrial chemicals based on intestinal absorption and physiologically based pharmacokinetic modelling

研究代表者

神矢 佑輔 (Kamiya, Yusuke)

昭和薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：20802945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト腸由来であるCaco-2細胞を用いて化学物質のin vitro消化管膜透過性と肝毒性発現リスクの関連性を調査した。化学物質の肝無作用量は、Caco-2細胞単層膜を介した膜透過係数値と有意な関連を示し、消化管膜透過性が肝臓毒性発現を規定する因子のひとつであることが示唆された。化学物質の肝最小作用量は肝臓に着目した簡易な生理学的薬物動態モデルにより記述された推定肝臓中濃度と有意な相関を示し、化学物質の肝毒性発現が体内動態と密接な関係にあることが示唆された。市販ソフトウェアで取得可能なin silico分子記述子を用い推定した化学物質の動態パラメータおよび体内動態は、実際の値を精度よく再現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

工業用に生産される化学物質のヒトに対するリスクは、化審法に従い実験動物を用いた反復経口投与による毒性試験の結果から種差や個人差を補正した値にて評価されている。しかし、化学物質の投与後、毒性発現に至るまでの体内動態はほとんど考慮されていない。一方、動物愛護やコストの削減の観点から、化学物質の毒性を評価し得る代替法に関する研究が広く行われている。本課題では、化学物質が生体に吸収される過程や、生体内でどのような運命を辿るかに着目した、新しい毒性評価方法に関する研究を行った。本研究で得られた知見は、従来の動物実験に取って代わる毒性評価手法開発の基盤情報となりうる極めて有意義なものである。

研究成果の概要(英文)：Apparent permeability coefficient values of industrial chemicals via Caco-2 cell monolayer, human intestinal epithelial cell line, showed a significant association with reported their hepatic no-observed effect level values in rats. The areas under the hepatic concentration-time curves after virtual oral administration of chemicals estimated using simplified physiologically based pharmacokinetic modelling were inversely associated with hepatic lowest-observed effect levels. These results suggest that intestinal permeability coefficients and simulating the hepatic levels of industrial chemicals are important to determine the onset of hepatotoxicity and risk assessment.

研究分野：薬物動態学

キーワード：消化管吸収性 薬物動態予測 化学物質 肝毒性評価 生理学的薬物動態モデル 一般化学物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

主として工業目的に生産・使用される化学物質の生体への毒性については、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法)に定められているげっ歯類への経口反復投与により、その投与量と組織毒性発現等の関連が調査される。しかし、化学物質の毒性発現リスクを考えるうえで、生体への吸収性や臓器分布などの体内動態はほとんど考慮されていない。一方、動物愛護の観点および実験時間やコストの削減のため、化学物質の毒性を評価し得る代替法に関する研究が広く行われている。医薬領域において、薬物の臓器への移行や代謝、排泄過程について、代謝消失速度などの生理学的情報および物質固有の生化学的情報に従い実態に即して記述する生理学的薬物動態(PBPK)モデルを活用した研究が広く行われている。この予測手法を化学物質に応用することで、体内動態の予測を伴う毒性発現リスク評価を行うことが期待できる。しかしながら、医薬の生理学的薬物動態モデルでは、生体内における代謝や分布過程について詳細に検討しているものの、物質が最初に生体内へと移行する吸収過程について詳細に考慮されている例は少ない。

2. 研究の目的

本研究では、これまで化学物質の毒性試験では考慮されていなかった、経口投与後の毒性発現リスクと消化管吸収性を含む体内動態について着目しその関連性を明らかとすること、さらに、未知物質においても適用可能な化学物質の新規肝毒性評価方法を確立することを目的とした。

以下の2段階のアプローチにて、新規毒性評価法の確立を目指した。

1) Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 消化管膜透過性評価

従来の毒性試験では、化学物質の投与量には言及されるが、投与されてから生体に入る過程である消化管吸収性に関しては考慮されていない。化学物質の消化管吸収性が推定可能となれば、真の全身曝露量が推定される。吸収されない(=生体内に入らない)ことが予測できれば、不要な動物実験の削減にもつながりうる。そこで、医薬領域で消化管吸収性の *in vitro* 評価に汎用されているヒト腸由来の Caco-2 細胞を用いて、化学物質の吸収性とその変動要因、ならびに毒性発現リスクとの関連性評価を実施した。

2) 生理学的薬物動態モデルを基盤とする化学物質の体内動態評価

毒性試験において経口投与された化学物質の組織・臓器における毒性発現と物質の体内動態の関連を詳細に検討している例はほとんどない。そこで、医薬領域で体内動態評価手法として注目・活用されている生理学的薬物動態モデルを活用することで、化学物質の肝毒性発現リスクを体内動態推移をもって定量的に説明しうる、新たな肝毒性評価方法の確立を試みた。

3. 研究の方法

1) Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 消化管膜透過性の網羅的評価および未知物質の膜透過性予測

ヒト腸由来 Caco-2 細胞を多孔性フィルター上に培養し単層膜を形成させた。生体の消化管環境を模倣した条件にて、種々化学物質の膜透過性を評価した。物質の小腸吸収性に及ぼす変動要因を明らかにするために、得られた種々物質の膜透過性と *in silico* で得られる物理化学的パラメータ(物性値)を用いた重回帰分析により、膜透過性に影響する重要な物性値を見出した。膜透過性未知の物質にそれらを適用することで膜透過性を予測しうるかを検討し、未知物質の吸収性予測につなげることが可能かを検証した。

2) 生理学的薬物動態モデルを基盤とする化学物質の体内動態と肝毒性の関連および予測

一般化学物質、食品、医薬候補品など、多様な化学物質のラット血中濃度推移に関するデータを文献検索と一部自ら実施した実験より取得した。得られた血中濃度推移データを用いて、生理学的薬物動態モデル用の薬物動態パラメータを算出した。血中濃度を再現する生理学的薬物動態モデリングにより臓器中濃度が推定可能であるか、文献報告値を中心に検証した。未知物質の毒性発現を体内動態に基づいて予測するため、それら薬物動態パラメータを機械学習手法により予測可能であるかを検討、予測パラメータによる仮想経口投与後の生体内濃度推移を実測値と比較した。

4. 研究成果

Caco-2 細胞単層膜を介した薬物の透過性はヒト小腸吸収率 (Fa) を反映することが知られている。本研究においても医薬品の Caco-2 細胞膜透過係数 (P_{app}) 実測値は、報告されているヒト Fa 値と有意な相関を示したことから、本研究において得られる物質の Caco-2 細胞膜透過性は、小腸吸収性を反映するものであると考えられた (図 1A)。工業用の一般化学物質のうち、有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) にて肝無影響量 (NOEL) が明らかとなっている 29 の物質について、Caco-2 細胞での膜透過係数を決定し、肝 NOEL との関連性を評価した。調べた範囲において、Caco-2 細胞透過性と肝 NOEL 値は有意な相関関係にあった (図 1B)。*In vitro* 腸透過性の小さい物質は肝毒性発現リスクも小さい傾向にあることを示し、消化管からの吸収性が小さければ、肝毒性の発現リスクは小さいことを示唆した (Toxicol. Rep., 7, 149-154, 2020)。

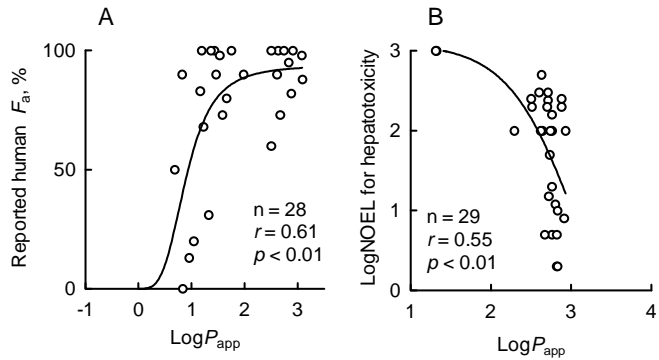


図 1. Relationships between values of $\log P_{app}$ and those of reported F_a of medicines (A) and hepatic NOEL of chemicals (B).

化学物質の消化管吸収性および経口肝毒性発現を評価する Caco-2 細胞膜透過係数を、構造活性相関等の手法を用いて透過係数あるいは吸収率を推定することが可能であれば、前述した吸収過程に着目した毒性発現リスクの予測手法がより簡便なものとなる。そこで、種々物質の構造情報から物性値計算ソフト (Sparc calculator, ARChem) により算出した種々の物性値 ($\log P$, pK_a 等) を用いて重回帰分析を行い、Caco-2 透過係数を予測可能か否か検証した。調べた範囲において、物質の分子量および消化管 pH 環境を考慮した 2 種の分配係数 ($\log D$) を組み合わせた重回帰分析で得られた回帰式による膜透過係数予測値は実測値を良好に再現し (図 2A)、未知物質の膜透過係数も精度よく予測した (図 2B)。以上より、構造情報を活用することで化学物質の *in vitro* 膜透過係数および経口吸収性については経口毒性をも予測しうることが示された (Toxicol. Rep., 7, 149-154, 2020)。

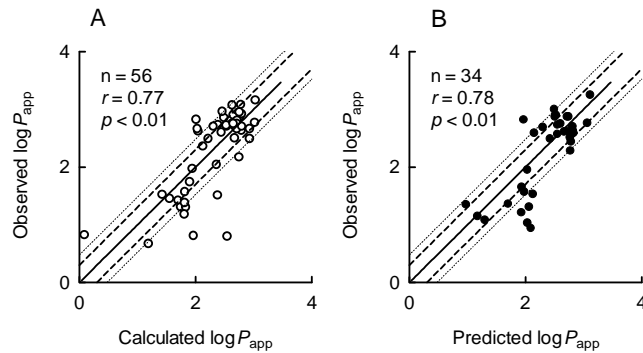


図 2. Relationships between observed and calculated $\log P_{app}$ values from multivariate linear regression analysis of 56 compounds (A) and predicted $\log P_{app}$ values of test 34 compounds (B).

工業用化学物質、食品、医薬候補品など 159 種物質のラット各血中濃度推移に関するデータを文献検索と実験により取得した。得られた血中濃度推移データを用いて、PBPK モデル用に各薬物動態パラメータを個別に算出した。薬物の体内動態を説明するのに広く使われている既存の 1-コンパートメントモデルと比較検討を行ったところ、血中濃度時間曲線下面積 (AUC) が良好に相関したことから、本 PBPK モデルの妥当性が確認された (図 3)。

本 PBPK モデルによる推定肝臓中濃度は、実際の濃度を再現可能であることが報告されている (J. Health Sci., 56, 566-575, 2010)。そこで、HESS において肝最小作用量 (LOEL) が報告されている化学物質 8 種について、PBPK モデルを活用して仮想投与後の肝臓中濃度推移を推定

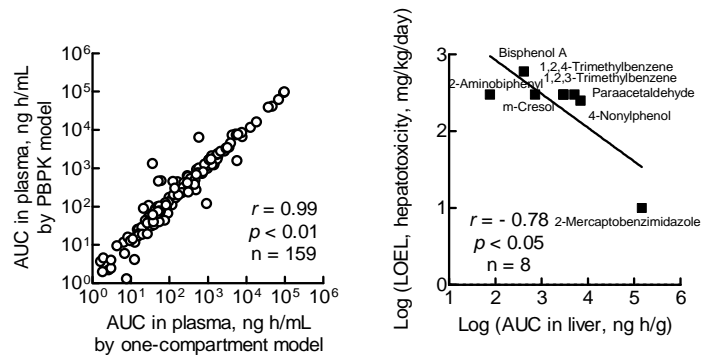


図 3. Correlation between AUC values in plasma of 159 compounds after virtual oral administration to rats estimated using one-compartment models and simplified PBPK models.

図 4. Inverse correlation between LOEL values for rat hepatotoxicity for eight compounds reported in HESS and liver AUC values estimated using PBPK models.

した。調べた範囲において、単回投与時の1日あたりの肝中濃度時間曲線下面積とそれぞれの肝最小作用量は有意な逆相関を示した(図4)。このことは、肝毒性発現に化学物質の肝臓中濃度が関与していることを示唆しており、臓器毒性発現リスクの推定に本PBPKモデルの活用が有用である可能性を示した(Chem. Res. Toxicol., 33, 1736-1751, 2020)。

PBPKモデリング手法による臓器毒性リスク推定の具体例として、毒性および環境汚染により使用が制限されている有機フッ素化合物ペルフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)の臓器中濃度の推定について検討した。論文報告されているラット血中PFOS濃度を本PBPKモデルにて再現した。本モデルにより推定した臓器中濃度は、報告されている肝臓および腎臓中濃度実測値と概ね一致した(図5)。このことは、肝臓および腎臓に着目した簡易なPBPKモデルにより、肝臓中のみならず腎臓中濃度も再現可能であることを示唆した(J. Toxicol. Sci., 45, 763-767, 2020)。

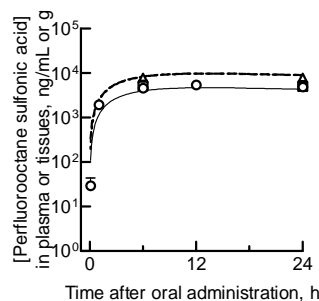


図5. Reported plasma (circle), hepatic (triangle), and renal (square) concentrations and estimated plasma (solid line), hepatic (broken line), and renal (dashed line) concentrations of PFOS using PBPK modeling after virtual oral dose.

体内動態が未知である物質の肝毒性発現リスクを推定するために、PBPKモデルを活用する体内動態予測を試みた。上記159物質と同様のPBPKモデリング手法により、計246種の物質の血中濃度を再現する薬物動態パラメータを決定した。分子記述子計算ソフトMordred等を用いて多様な246物質の*in silico*分子記述子を算出した。それらのうち14~26種を用いた機械学習手法(LightGBMおよびnested cross-validation)により、PBPKモデルの吸収速度定数、分布容積および肝固有クリアランスの3種重要パラメータを精度よく推定することができた。一例として、吸収速度定数(k_a)の予測計算値と実測値との比較を示す(図6A)。推定した薬物動態パラメータ値を用いて、PBPKモデルにて1.0 mg/kg経口投与をシミュレーションしたところ、肝臓中の最高推定濃度(C_{max})ならびにAUCは、実測パラメータ由来のそれらと有意な相関を示した(図6B、C)。このことは、化学物質の構造情報を活用した*in silico*機械学習予測は、毒性および体内動態が未知の物質についても薬物動態パラメータの予測に基づいた生体内運命の予測が可能であることを示唆した(Chem. Res. Toxicol., 34, 507-513, 2021)。

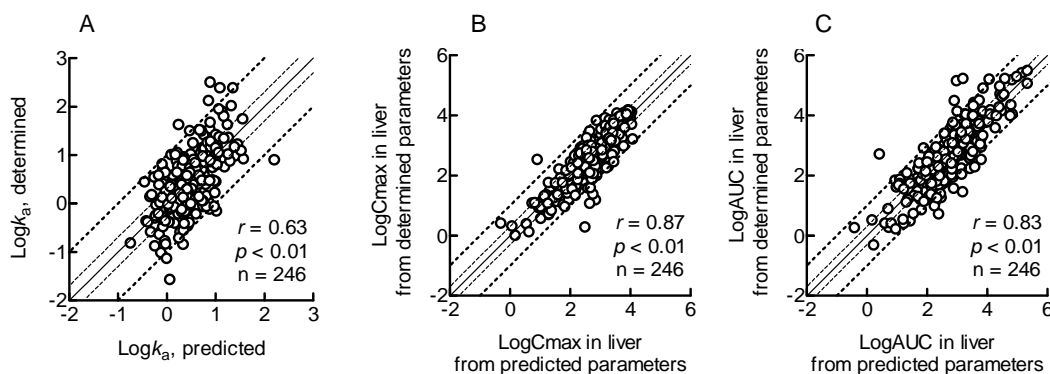


図6. Correlations between previously determined and predicted values of absorption rate constants (k_a) (A) and C_{max} (B) and AUC (C) values generated by PBPK models using traditionally determined and predicted values of input pharmacokinetic parameters for 246 chemicals.

以上、本研究課題の遂行により得られた、Caco-2細胞を用いた*in vitro*消化管膜透過性評価およびPBPKモデルを基盤とする化学物質の*in silico*体内動態評価を活用する化学物質の新規肝毒性評価手法に関する知見が、動物を用いる毒性試験の代替手法に関する研究において有用な情報となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kamiya Yusuke, Takaku Hiroka, Yamada Rio, Akase Chisato, Abe Yuto, Sekiguchi Yuko, Murayama Norie, Shimizu Makiko, Kitajima Masato, Shono Fumiaki, Funatsu Kimito, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Determination and prediction of permeability across intestinal epithelial cell monolayer of a diverse range of industrial chemicals/drugs for estimation of oral absorption as a putative marker of hepatotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology Reports	6. 最初と最後の頁 149 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxrep.2020.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa Shin-ichiro, Shimizu Makiko, Kamiya Yusuke, Uehara Shotaro, Suemizu Hiroshi, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Increased plasma concentrations of an antidiabetic drug pemafibrate co-administered with rifampicin or cyclosporine A in cynomolgus monkeys genotyped for the organic anion transporting polypeptide 1B1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 354 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2020.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kamiya Yusuke, Otsuka Shohei, Miura Tomonori, Yoshizawa Manae, Nakano Ayane, Iwasaki Miyu, Kobayashi Yui, Shimizu Makiko, Kitajima Masato, Shono Fumiaki, Funatsu Kimito, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Physiologically Based Pharmacokinetic Models Predicting Renal and Hepatic Concentrations of Industrial Chemicals after Virtual Oral Doses in Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 1736 ~ 1751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura Tomonori, Kamiya Yusuke, Hina Shiori, Kobayashi Yui, Murayama Norie, Shimizu Makiko, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Metabolic profiles of coumarin in human plasma extrapolated from a rat data set with a simplified physiologically based pharmacokinetic model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 695 ~ 700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.45.695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kamiya Yusuke, Yanagi Mayu, Hina Shiori, Shigeta Kazuki, Miura Tomonori, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Plasma, liver, and kidney exposures in rats after oral doses of industrial chemicals predicted using physiologically based pharmacokinetic models: A case study of perfluorooctane sulfonic acid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 763 ~ 767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.45.763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura Tomonori, Shimizu Makiko, Uehara Shotaro, Yoshizawa Manae, Nakano Ayane, Yanagi Mayu, Kamiya Yusuke, Murayama Norie, Suemizu Hiroshi, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 33
2. 論文標題 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	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 3048 ~ 3053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00387	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamiya Yusuke, Handa Kentaro, Miura Tomonori, Yanagi Mayu, Shigeta Kazuki, Hina Shiori, Shimizu Makiko, Kitajima Masato, Shono Fumiaki, Funatsu Kimito, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 34
2. 論文標題 In Silico Prediction of Input Parameters for Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Models for Estimating Plasma, Liver, and Kidney Exposures in Rats after Oral Doses of 246 Disparate Chemicals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 507 ~ 513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00336	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura Tomonori, Uehara Shotaro, Shigeta Kazuki, Yoshizawa Manae, Kamiya Yusuke, Murayama Norie, Shimizu Makiko, Suemizu Hiroshi, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Metabolic Profiles of Tetrabromobisphenol A in Humans Extrapolated from Humanized-Liver Mouse Data Using a Simplified Physiologically Based Pharmacokinetic Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 522 ~ 528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00358	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura Tomonori, Kamiya Yusuke, Uehara Shotaro, Murayama Norie, Shimizu Makiko, Suemizu Hiroshi, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 51
2. 論文標題 Hepatotoxicological potential of P-toluic acid in humanised-liver mice investigated using simplified physiologically based pharmacokinetic models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Xenobiotica	6. 最初と最後の頁 636 ~ 642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00498254.2021.1908643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kamiya Yusuke, Takaku Hiroka, Yamada Rio, Yamazaki Hiroshi
2. 発表標題 Determination of permeability across Caco-2 cell monolayer and development of predictable equations for oral absorbability of general chemical substances
3. 学会等名 12th International ISSX Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神矢佑輔、大村明日香、関口佑子、赤瀬千聡、阿部雄人、庄野文章、山崎浩史
2. 発表標題 培養ヒトおよびラット腸細胞を用いた一般化学物質の膜透過性および動物肝無毒性指標の関連
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村山典恵、柳麻由、岩崎美友、小林由惟、中野彩音、三浦智徳、神矢佑輔、庄野文章、山崎浩史
2. 発表標題 一般化学物質のラット血中濃度推移情報と生理学的薬物動態モデルを活用した予測肝中濃度と臓器毒性
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 關口佑子、神矢佑輔、大村明日香、赤瀬千聡、阿部雄人、庄野文章、船津公人、山崎浩史
2. 発表標題 多様な一般化学物質および医薬品の培養ヒト小腸上皮膜透過係数の予測
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重田和樹、村山典恵、吉沢愛映、大西潮、大塚昌平、神矢佑輔、庄野文章、山崎浩史
2. 発表標題 腎を独立させた生理学的薬物動態モデルで予測した一般化学物質のラット組織中濃度と臓器毒性
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miura Tomonori, Kamiya Yusuke, Kitajima Masato, Shono Fumiaki, Yamazaki Hiroshi
2. 発表標題 Prediction of pharmacokinetic profiles of food chemicals/drugs for estimation of oral absorption and plasma concentrations as putative markers of toxicological potential
3. 学会等名 34th JSSX Annual Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤瀬千聡、神矢佑輔、関口佑子、阿部雄人、山崎浩史
2. 発表標題 一般化学物質の培養ヒト腸細胞膜透過性と肝毒性発現との関連および予測
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------