

(58) 金属の生体内輸送特性を考慮した 生理学的薬物動態モデルの構築

真見 一樹¹・北川 英隆^{1*}・中村 謙吾¹・佐々木 克典¹・中山 亜紀¹
米田 稔¹

¹京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻環境リスク工学講座 (〒615-8540 京都府西京区京都大学桂
Cクラスター)

* E-mail: kitagawa@risk.env.kyoto-u.ac.jp

生理学的薬物動態 (physiologically based pharmacokinetic) モデルはPBPKモデルと呼ばれる体内動態モデルであり、このモデルを用いることで標的臓器の推定や動物実験による毒性試験結果を標的器官における濃度等、薬物動態という科学的根拠に基づいたヒトへの外挿などが可能になる。このようなことから、PBPKモデルは健康リスク評価において重要な位置を占めており、化学物質や重金属などの有害物質に対する健康リスク評価を行う際に用いられる。しかし、PBPKモデルはもともと薬物開発のために開発されたモデルであり、薬物のような有機化合物を対象物質とする事が前提にある。また、有機物質と無機物質である重金属では体内での輸送形態が異なり、従来のPBPKモデルでは重金属の輸送形態が含まれていないためリスク評価を行うことが困難である。そこで、本研究では亜鉛を対象物質として、重金属の臓器内での輸送特性を組み込んだ膜透過型PBPKモデルの構築を試みた。その結果、膜透過型の方が従来の流量律速型よりも亜鉛の体内動態を良好に再現できた。

Key Words : PBPK model, Heavy metals, Transport form, Zinc

1. 序論

多くの化学物質が人々の生活のに利用されている。しかしその化学物質の中には毒性を含有しているものもあり、ごく少量で人体に健康被害を与えるものが存在する。有害物質による水質汚染や大気汚染は、環境基準の制定や、企業・一般大衆の環境意識の高まりにより1970年代と比べて大幅に改善されたものの、微量かつ多種類の化学物質を、人は現在も食物や飲料水・大気を通して体内に摂取している。低濃度であっても長期間にわたる化学物質への曝露は健康への影響を与える事に加えて^{1,2)}、感受性の強い胎児・乳幼児においては成人と異なる悪影響が発現することが指摘されている事からも³⁾、環境中の有害化学物質に対する健康リスク評価は依然として重要である。

PBPK (physiologically based pharmacokinetic) モデルは、実際の生体構造に基づいた構造を設定したコンパートメントモデルで、体内における化学物質の吸収、分布、代謝、排泄を予測し、臓器ごとの内部曝露量を算出することができる。このため、化学物質の潜在的な標的臓器の推測が可能である。また、生理学・解剖学・生化学等の

知見に基づいてパラメータを決定するため、動物からヒト、成人から幼児など異なる対象へ拡張することができる。米国環境庁(EPA)は、PBPKモデルを、年齢・遺伝的素因・疾患・体型などの個人の差異によって生じる不確実性を低減できるとしており⁴⁾、リスク評価において有用なツールであるとしている。他にも、体内動態評価モデルとしてコンパートメントモデルが挙げられるが、このモデルでは各コンパートメントに生理学的構造が含まれていないため、薬物などの挙動を適切に表現するには不十分であると考えられる。また、過塩素酸塩や有機水銀などの有機物質を対象にしたPBPKモデルは多く存在するが、無機物質を対象にしたPBPKモデルはほとんど存在しない。しかし、亜鉛やカドミウムなどの無機物質も人体に対して有害な影響を及ぼすことが分かっているため、無機物質の体内動態を評価する事も重要であると考えられる。

動物実験により得られた毒性試験の結果をヒトに外挿する際の体内動態の差異の把握や、化学物質の蓄積性や代謝などにおける幼児と成人との比較を行う際にもパラメータを変更することで容易に評価が可能となるPBPKモデルが有用である。このようにPBPKモデルは、健康

リスク評価において重要な位置を占めている。

化学物質による健康リスク評価と同様に、重金属における健康リスク評価も重要な課題である。

PBPK モデルは元来合成化学薬品の ADME(absorption, distribution, metabolism, elimination)を予測するための数値モデルである。薬学領域で発達した手法であるため、薬物などの有機化合物を対象物質にする事を前提にしている。対象物質が有機化合物である場合には、その脂溶性という特性から容易に生体膜を透過する事が出来るため、対象物質の脂溶性の程度を考慮することにより体内での各臓器への蓄積などの挙動を評価することができる。また、臓器内に到達したと同時に臓器内における薬物濃度は一様になるという瞬時拡散を仮定している⁹⁾。

一方で、無機物質である重金属は、一般に親水性であるため生体膜を容易に通過することが出来ず、臓器へ移行するにはチャネルやトランスポータなどの各金属特有の輸送経路や性質の似た金属の輸送経路を利用している⁹⁾。トランスポータによる輸送には、濃度勾配に逆らう能動輸送と、細胞膜を通過するためにトランスポータと結合し、輸送は濃度勾配に従う促進拡散が存在する。このため、臓器によっては瞬時拡散が仮定できず、臓器内で濃度勾配が存在することにより臓器中濃度が血中濃度と同じ挙動を示さない場合がある。従って、流量律速型モデルを用いて無機物質である重金属の生体内での挙動を把握するには限界があり、PBPK モデルを重金属に適用するためには能動輸送や受動輸送、チャネルやトランスポータなどの重金属に特有の輸送形態を検討し、それらを組み込むことでPBPKモデルの改良を行う必要があると考えられる。

重金属においては、胎児期に水銀に曝露されると神経障害が発生すること^{3,7)}やカドミウム曝露による体重減少や行動障害が生じること^{7,8)}、幼児期の鉛曝露が認知障

害を引き起こすこと^{7,9)}など、乳幼児は成人と異なる毒性が表れることが知られている。先述のとおりPBPKモデルは年齢や体型などの差異を考慮した上で、標的臓器における物質濃度の推定が可能であり、重金属等の健康リスク評価において非常に有用であると考えられる。

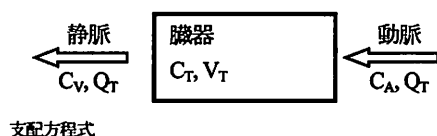
以上のような背景から重金属元素を対象物質とするPBPKモデルの構築を目的として、本研究では、対象物質として亜鉛を選択し、亜鉛の輸送特性を考慮したPBPKモデルの構築とその有用性の検討を行った。亜鉛は微量必須元素である一方で、過剰摂取によって人体に有害な影響が生じる可能性がある。したがってリスク評価を行う必要があると考えられ、そのためには体内動態を評価する必要がある。ただし、タンパクと結合した状態の亜鉛とフリーの亜鉛の量の差が十分に大きい場合、結合率を考慮する必要はないと考え、今回のモデルではタンパク結合率については考慮しなかった。

2. 亜鉛を対象としたPBPKモデルの構築

(1) 流量律速型モデルと膜透過型モデルの基本構造

PBPKモデルにおける臓器コンパートメントの一般的な構造及び支配方程式の例を図-1に示す。この場合、各臓器への対象物質の分配は血流量に支配され、臓器中濃度の推移は血中濃度と同様の傾向を示す。本論文では、この従来型のPBPKモデルを以後流量律速型と記述する。

一部の有機物質においては、チャネルやトランスポータなどの細胞の能動的な輸送形態による分布傾向を示す物質が存在する。そのような物質を評価する際には、図-2に示す膜透過機構を考慮したコンパートメントを導入したPBPKモデルが利用されることがある¹⁰⁾。この場合、臓器を複数のサブコンパートメントに分けてサブコンパートメント間での物質輸送を考慮することで臓器内の濃度勾配を表現し、臓器ごとの薬物動態の差異を再現する。サブコンパートメント間の物質輸送においては、チャネルやトランスポータなどによる促進拡散に基づく飽和型の輸送機構が予想される場合にはミカエリス-メンテン型の収支式を追加する。本論文では、このようなコンパートメントを含むPBPKモデルを以後、膜透過型と記述する。



支配方程式

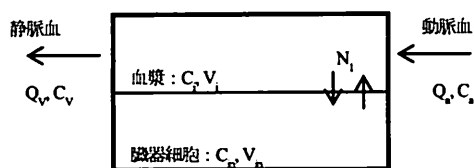
$$V_T \frac{dC_T}{dt} = Q_T (C_A - C_V)$$

$$P_T = \frac{C_T}{C_V}$$

V_T : 臓器体積(L) C_T : 薬物濃度(mg/L)

Q_T : 血流量(L/h) P_T : 分配係数(-)

図-1 PBPKモデルにおけるコンパートメント
(流量律速型)



$$\text{臓器血流: } V_i \frac{dC_i}{dt} = Q(C_a - C_v) - N_1$$

$$\text{臓器細胞: } V_{in} \frac{dC_{in}}{dt} = N_1$$

$$N_1 = PA(C_i - \frac{C_{in}}{P_{in}}) \text{ or/and } N_1 = \frac{J_m \times C_i}{K_m + C_i} - \frac{J_m \times C_{in}}{K_m + C_{in}}$$

V: 臓器体積(L) C: 薬物濃度(mg/L)

Q: 血流量(L/min) P_{in} : 分配係数(-)

PA: 膜透過係数(L/min) N_1 : 膜間移動量(mg/min)

J_m : 最大移動速度(mg/min)

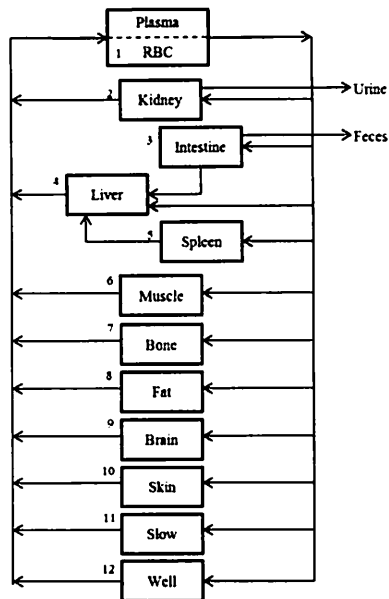
K_m : ミカエリス定数(mg/L)

図-2 PBPK モデルにおけるコンパートメント
(膜透過型)

(2) 垂鉛の流量律速型 PBPK モデルの構造

まず、構築した垂鉛の流量律速型 PBPK モデルの構造について述べる。本モデルは、Merill らの、ラットを対象にした過塩素酸イオンの PBPK モデル¹⁰⁾を参考に構築した。

本モデルでは、人体を血液(血漿:Plasma, 血球:RBC), 肝臓(Liver), 腎臓(Kidney), 腸(Intestine), 骨(Bone), 筋肉(Muscle), 脾臓(Spleen), 脂肪(Fat), 脳(Brain), 皮膚(Skin), その他の血流が多い臓器(Well), その他の血流が少ない臓器(Slow)の12のコンパートメントに分け、それぞれのコンパートメント間は血流により接続した。なお、血液は血漿と血球に分け、臓器中へは血漿中の垂鉛のみが移動するとした。垂鉛の80%以上が血漿中のタンパク質と結合した状態で存在し、その状態で各臓器に移動するからである¹¹⁾。また、脾臓、腸から流出する血流は他の臓器と異なり、門脈と呼ばれる血流に集められて肝臓に流入する。その後、肝臓の血流と一緒に肝臓から流出し、他の血流と合流する。本モデルでもこの挙動を再現するために、脾臓と腸から流出する血流は肝臓へと流入する構造とした。体外への排出については、腎臓から尿中へと排出される経路と腸から糞便中へと排泄される経路の2経路により行われるとした。この流量律速型モデルの構造及び支配方程式(3a)~(3f)を図-3に示す。



$$RBC: V_1 \frac{dC_1}{dt} = PA_1(C_P - \frac{C_1}{P_1}) \quad (3a)$$

$$Plasma: V_P \frac{dC_P}{dt} = \sum_{i=2}^{12} Q_i \frac{C_i}{P_i} - PA_1(C_P - \frac{C_1}{P_1}) - \sum_{i=2}^{12} Q_i C_P \quad (3b)$$

$$Kidney: V_2 \frac{dC_2}{dt} = Q_2(C_P - \frac{C_2}{P_2}) - R_{Ur} C_2 \quad (3c)$$

$$Liver: V_4 \frac{dC_4}{dt} = Q_4(C_P - \frac{C_4}{P_4}) + Q_3 \frac{C_3}{P_3} + Q_5 \frac{C_5}{P_5} + C_P Q_P - (Q_3 + Q_5) \frac{C_4}{P_4} \quad (3d)$$

$$Intestine: V_3 \frac{dC_3}{dt} = Q_3(C_P - \frac{C_3}{P_3}) - R_{F3} C_3 \quad (3e)$$

$$etc: V_i \frac{dC_i}{dt} = Q_i(C_P - \frac{C_i}{P_i}) \quad (i=5 \sim 12) \quad (3f)$$

V: 臓器体積(L) C: 臓器中垂鉛濃度(mg/L) Q: 血流量(L/min)

P: 分配係数(-) R: 排泄係数(L/min) PA: 膜透過係数(L/min)

p: 血漿 1: 血球 2: 腎臓 3: 腸 4: 肝臓 5: 脾臓

図-3 垂鉛の流量律速型 PBPK モデルの構造及び支配方程式

(3) 流量律速型 PBPK モデルに用いたパラメータ

ラットの各臓器の重量および血流量はBrownら¹²⁾が報告している値を利用した。腎臓、肝臓、骨、筋肉、脾臓の分配係数は、Houseら¹³⁾が行った、 $ZnCl_2$ をラットに投与し、臓器中及び血漿中垂鉛濃度を測定した実験結果から96時間後の臓器・血漿濃度比を用いて決定した。96時間後の値を用いたのは、実験中の測定結果の中で最大時間である96時間後には臓器と血漿は平衡状態に近い状態であると考えても問題ないと判断したためである。その他の臓器の分配係数に関しては、Houseらの実験結果を基にフィッティングして決定した。排泄係数に関しても同様にフィッティングにより決定した。

表-1 流量律速型 PBPK モデルに用いたパラメータ
(血流量, 臓器重量, 分配係数)

Tissue	Blood flow** (mL)	Weight** (g)	Partition Coefficient(-)
RBC		9.9 (3.3)	2.8
Plasma	110 (100)	12.3 (4.1)	-
Liver	2.64 (2.4)	10.2 (3.4)	13.4
Intestine	13.42 (12.2)	23.1 (7.7)	13*
Kidney	15.51 (14.1)	2.1 (0.7)	12.4
Skin	6.38 (5.8)	57 (19)	2.7*
Muscle	30.58 (27.8)	121.2 (40.4)	2.5
Fat	7.7 (7)	21 (7)	0.5*
Bone	13.42 (12.2)	21.9 (7.3)	9
Spleen	3.08 (2.8)	0.6 (0.2)	8.6
Brain	2.2 (2)	1.8 (0.6)	1.5*
Well	7.7 (7)	2.4 (0.8)	0.5*
Slowly	7.37 (6.7)	16.5 (5.5)	0.1*

*Fitting により求めた値

**0内は%表示

表-2 流量律速型 PBPK モデルに用いたパラメータ (排泄係数)

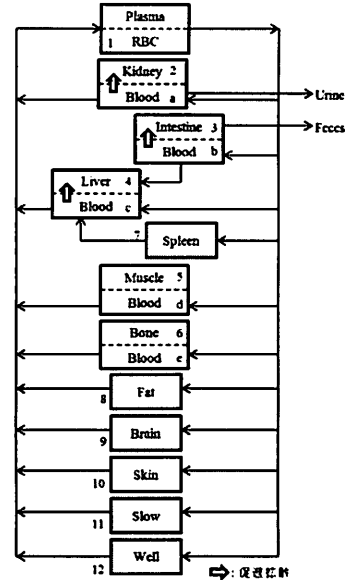
Egestion	Excretion rate (L/min)
Urine	0.00008
Feces	0.01

流量律速型 PBPK モデルに用いたパラメータの内, 血流量, 臓器重量, 分配係数の値を表-1 に, 排泄係数の値を表-2 に示す.

(4) 亜鉛の膜透過型 PBPK モデルの構造

次に, 構築した亜鉛の膜透過型 PBPK モデルについて述べる. 本モデルでも流量律速型と同様に, 人体を 12 のコンパートメントに分けた構造としたが, その内肝臓, 腎臓, 腸, 骨, 筋肉の 5 つのコンパートメントについてはサブコンパートメントを設定して膜透過型で表現した. 骨及び筋肉を膜透過型コンパートメントに変更したのは, これらの臓器中の亜鉛濃度の変化が血中の亜鉛濃度の時間変化とは異なる傾向を示しており¹³⁾, トランスポータ等を介した促進拡散が行われたと考えられるためである. また, 肝臓, 腎臓, 腸に関しては, 肝臓, 腎臓, 腸のそれぞれの細胞を用いた *in vitro* 試験において細胞内への亜鉛の移動速度が濃度に対してミカエリス型の飽和曲線を示すことが分かっている^{14),15),16)}. これはトランスポータやアミノ酸などが亜鉛の分布に関係して, 飽和型

の促進拡散が生じているためだと考えられる. 従って, 肝臓, 腎臓, 腸については, ミカエリス-メンテン型の収支式を追加してサブコンパートメント間の物質輸送を表現した. その他の 7 つのコンパートメントについては, 流量律速型モデルと同様の構造とした. 本研究で構築した亜鉛の膜透過型 PBPK モデルの構造を図-4 に, 支配方程式を(4a)~(4k)に示す.



$$RBC: V_1 \frac{dC_1}{dt} = PA_1(C_P - \frac{C_1}{\bar{A}}) \quad (4a)$$

$$Plasma: V_P \frac{dC_P}{dt} = \sum_{i=1}^{12} Q_i C_i + \sum_{i=7}^{12} Q_i \frac{C_i}{\bar{A}} - PA_1(C_P - \frac{C_1}{\bar{A}}) - \sum_{i=2}^{12} Q_i C_P \quad (4b)$$

$$Kidney: V_2 \frac{dC_2}{dt} = PA_2(C_u - \frac{C_2}{\bar{A}}) + \frac{J_m \times C_u}{K_m + C_u} \quad (4c)$$

$$Kidney(blood): V_u \frac{dC_u}{dt} = Q_u(C_P - C_u) - PA_2(C_u - \frac{C_2}{\bar{A}}) - \frac{J_m \times C_u}{K_m + C_u} - R_{ex}, C_u \quad (4d)$$

$$Liver: V_4 \frac{dC_4}{dt} = PA_4(C_P - \frac{C_4}{\bar{A}}) + \frac{J_m \times C_P}{K_m + C_P} \quad (4e)$$

$$Liver(blood): V_c \frac{dC_c}{dt} = Q_c C_P + Q_c C_h + Q_7 \frac{C_7}{\bar{A}} - (Q_c + Q_h + Q_7) C_c - PA_4(C_c - \frac{C_4}{\bar{A}}) - \frac{J_m \times C_P}{K_m + C_P} \quad (4f)$$

$$Intestine: V_3 \frac{dC_3}{dt} = PA_3(C_h - \frac{C_3}{\bar{A}}) + \frac{J_m \times C_h}{K_m + C_h} - R_{ex}, C_3 \quad (4g)$$

$$Intestine(blood): V_h \frac{dC_h}{dt} = Q_h(C_P - C_h) - PA_3(C_h - \frac{C_3}{\bar{A}}) - \frac{J_m \times C_h}{K_m + C_h} \quad (4h)$$

$$Bone, Muscle: V_j \frac{dC_j}{dt} = PA_j(C_j - \frac{C_j}{\bar{A}}) \quad (i = 5, 6 \quad j = d, e) \quad (4i)$$

$$Bone, Muscle(blood): V_j \frac{dC_j}{dt} = Q_j(C_P - C_j) - PA_j(C_j - \frac{C_j}{\bar{A}}) \quad (i = 5, 6 \quad j = d, e) \quad (4j)$$

$$etc: V_i \frac{dC_i}{dt} = Q_i(C_P - \frac{C_i}{\bar{A}}) \quad (i = 7-12) \quad (4k)$$

V: 臓器体積(L) C: 臓器中亜鉛濃度(mg/L) Q: 血流量(L/min)

P: 分配係数(-) J_m: 最大移動速度(mg/min)

K_m: ミカエリス定数(mg/L) PA: 膜透過係数(L/min)

R: 排泄係数(L/min) ρ: 血漿 1: 血球 2: 腎臓 3: 腸

4: 肝臓 5: 筋肉 6: 骨 7: 脾臓 a-e: 各臓器の細胞外部の血漿部分

図-4 亜鉛の膜透過型 PBPK モデルの構造及び支配方程式

(5) 膜透過型 PBPK モデルに用いたパラメータ

各臓器の重量と血流量, 排泄係数に関しては, 流量律速型モデルで用いた値と同じ値を用いた。

膜透過型に変更した5つのコンパートメントで必要となる各臓器の細胞外容積の割合は, Tsuji ら¹⁷⁾の値を用いた。また, 膜透過係数は House ら¹³⁾の実験データにフィッティングすることで決定した。ミカエリス-メンテン型の収支式を追加した肝臓, 腎臓, 腸においては, ミカエリス定数と最大移動速度が必要になる。肝臓に関しては Taylor ら¹⁴⁾が行ったラットの肝細胞を用いた実験での報告値を用いた。腎臓, 腸に関しても同様に, Oestreicher¹⁵⁾, Kaur¹⁶⁾がそれぞれラットの腎細胞・小腸細胞を用いて行った実験における報告値を用いた。

ここで, 小腸細胞及び腎細胞における亜鉛イオンの最大移動速度の報告値を本モデルに適用するためには, 臓器中のタンパク含有率を用いて単位換算を行う必要がある。Oestreicher, Kaur らの実験では, ラットの臓器中のタンパク質含有量が報告されていなかったため, ICRP によるヒト臓器中のタンパク質含有率の報告値¹⁸⁾で代用して換算を行った。ICRP の報告では, 肝臓のタンパク含有率が 14 %, 腎臓のタンパク含有率が 17 %としている。

表-3 膜透過型 PBPK モデルに用いたパラメータ
(血流量, 臓器重量, 細胞外容積の割合, 分配係数)

Tissue	Blood Flow*** (mL)	Weight*** (g)	Partition coefficient(-)
RBC		9.9 (3.3)	2.8
Plasma	110 (100)	12.3 (4.1)	
Skin	6.38 (5.8)	57 (19)	2.7**
Muscle	30.58 (27.8)	121.2 (40.4)	2.5
		0.13*	
Liver	2.64 (2.4)	10.2 (3.4)	13.4
		0.19*	
Intestine	13.42 (12.2)	23.1 (7.7)	13**
		0.12*	
Bone	13.42 (12.2)	21.9 (7.3)	9
		0.17*	
Fat	7.7 (7)	21 (7)	0.5**
Spleen	3.08 (2.8)	0.6 (0.2)	8.6
Kidney	15.51 (14.1)	2.1 (0.7)	12.4
		0.16*	
Brain	2.2 (2)	1.8 (0.6)	1.5**
Slowly	7.37 (6.7)	16.5 (5.5)	0.1**
Well	7.7 (7)	2.4 (0.8)	0.5**

*数字は細胞外容積の割合を示す

**Fitting により求めた値

***0内は%表示

表-4 膜透過型 PBPK モデルに用いたパラメータ
(最大移動速度, ミカエリス定数, 膜透過係数)

Tissue	Velocity ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Michaelis Constants(μM)	Permeability** (L/min)
RBC	-	-	0.2
Liver	32	56	0.7
Intestine	1000	1600	0.03
Kidney	93	87000	0.3
Muscle	-	-	0.2
Bone	-	-	0.15

**Fitting により求めた値

表-5 Jain ら及び Dunn らの行った投与実験の詳細

対象	体重 (g)	投与量 (μg)	投与方法	測定期間
ラット (Jain ら)	334.5~689	1-2 μg	静脈注射	3 週間
ラット (Dunn ら)	~200	1.5 μg	静脈注射	1 日間

なお, 腸のタンパク含有率は ICRP の報告にはなかったため, 15 %と仮定して換算を行った。

膜透過型 PBPK モデルに用いたパラメータの内, 血流量臓器重量, 細胞外容積の割合, 分配係数の値を表-3に, 最大移動速度, ミカエリス定数, 膜透過係数の値を表-4に示す。なお, 上述の通り, 排泄係数は表-2に示した流量律速型モデルに用いた値と同じ値を用いた。

3. 結果

(1) 計算結果の検証

構築したそれぞれの PBPK モデルによる計算結果を実測データと比較することでモデルの検証を行った。モデルの検証には, ラットに放射能でラベルした硫酸亜鉛を投与して24時間後から3週間後までの各臓器中の亜鉛濃度を報告している Jain ら¹⁹⁾のデータ及び投与量や曝露経路などの実験条件が近く投与後すぐから24時間後までの亜鉛の動態データを報告している Dunn ら²⁰⁾のデータを用いた。Jain ら及び Dunn らの実験の詳細を表-5に示す。

本モデルでは, 1 μg の亜鉛をラットの静脈中に投与したとして, 投与後 500 時間までのシミュレーションを行った。体質の差に関しては, 体重により血流量や臓器重量を変化させることで考慮可能である。各臓器の密度は1程度であるため, 臓器重量と臓器体積は等しいものとした。以下では, シミュレーションの結果を実測データ

と比較することで、本研究で構築した亜鉛の流量律速型 PBPK モデル、膜透過型 PBPK モデルそれぞれの検証を行う。なお、検証結果を示す図-5、図-6 においては、図中の実線がシミュレーション結果を、点が実測値を表すものとする。

a) 流量律速型 PBPK モデルの計算結果の検証

血漿、肝臓、腎臓中亜鉛濃度の、流量律速型 PBPK モデルによる計算結果と Dunn らの実測データとの比較を図-5 (0~24 時間) に、流量律速型 PBPK モデルによる計算結果と Jain らの実測データとの比較を図-6 (24~500 時間) にそれぞれ示す。図-5、図-6 より、ある程度時間

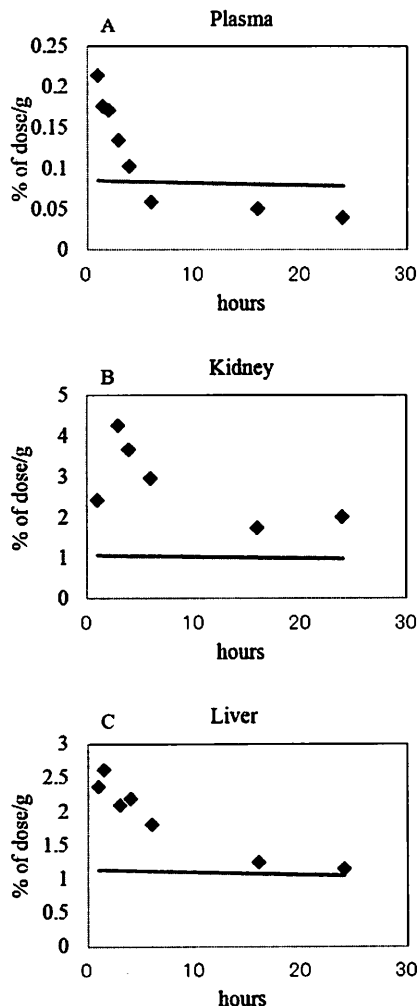


図-5 流量律速型 PBPK モデルによる計算結果と Dunn らの実測値の比較 (0~24 時間)

- A: 血漿中亜鉛濃度の計算結果と実測値
- B: 腎臓中亜鉛濃度の計算結果と実測値
- C: 肝臓中亜鉛濃度の計算結果と実測値

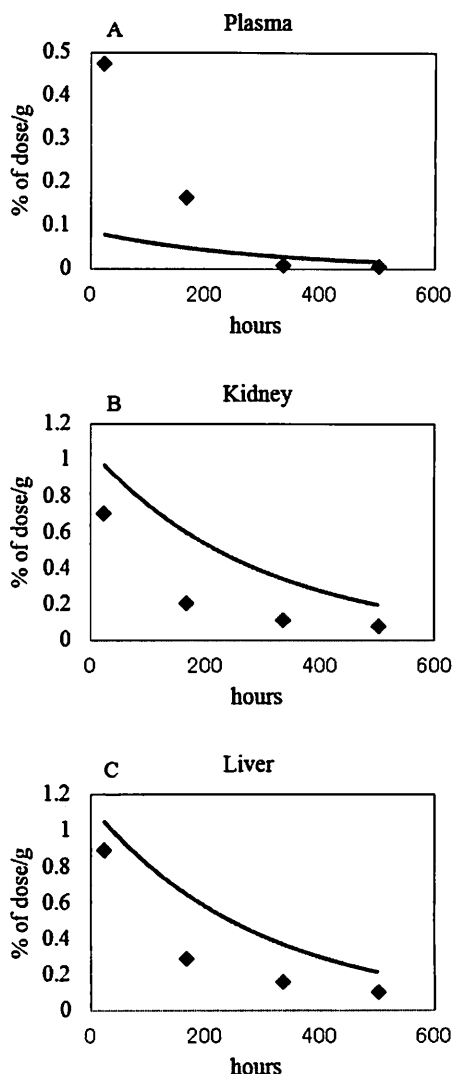


図-6 流量律速型 PBPK モデルによる計算結果と Jain らの実測値の比較 (24~500 時間)

- A: 血漿中亜鉛濃度の計算結果と実測値
- B: 腎臓中亜鉛濃度の計算結果と実測値
- C: 肝臓中亜鉛濃度の計算結果と実測値

が経過した後の臓器中濃度については、流量律速型 PBPK モデルの計算結果は実測データに見られる亜鉛濃度の推移を良好に再現できているものの、投与後ごく初期に実測値に見られるピークを再現する事が出来ておらず、この傾向は血漿、肝臓、腎臓全てにおいて同様である。

b) 膜透過型 PBPK モデルの計算結果の検証

血漿、肝臓、腎臓中亜鉛濃度の、膜透過型 PBPK モデ

ルによる計算結果と Dunn らの実測データとの比較を図-7 (0~24 時間) に、膜透過型 PBPK モデルによる計算結果と Dunn らの実測データとの比較を図-8 (24~500 時間) にそれぞれ示す。図-7、図-8 より、腎臓中濃度で初期のピークに過小傾向が見られるものの、膜透過型 PBPK モデルの計算結果は、ある程度時間が経過した後の血鉛濃度の推移と、投与後初期に実測値に見られるピークの両者を再現することが出来ている。

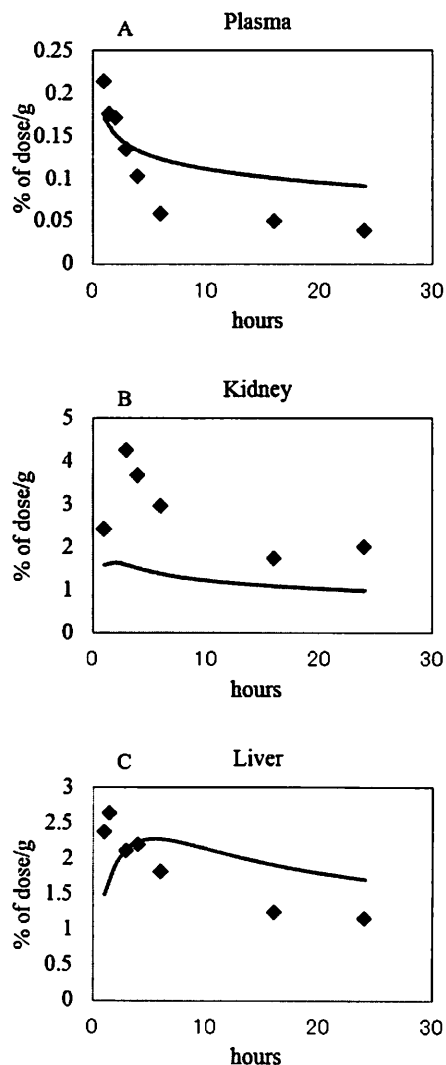


図-7 膜透過型 PBPK モデルによる計算結果と Dunn らの実測値の比較 (0~24 時間)

- A: 血漿中亜鉛濃度の計算結果と実測値
- B: 腎臓中亜鉛濃度の計算結果と実測値
- C: 肝臓中亜鉛濃度の計算結果と実測値

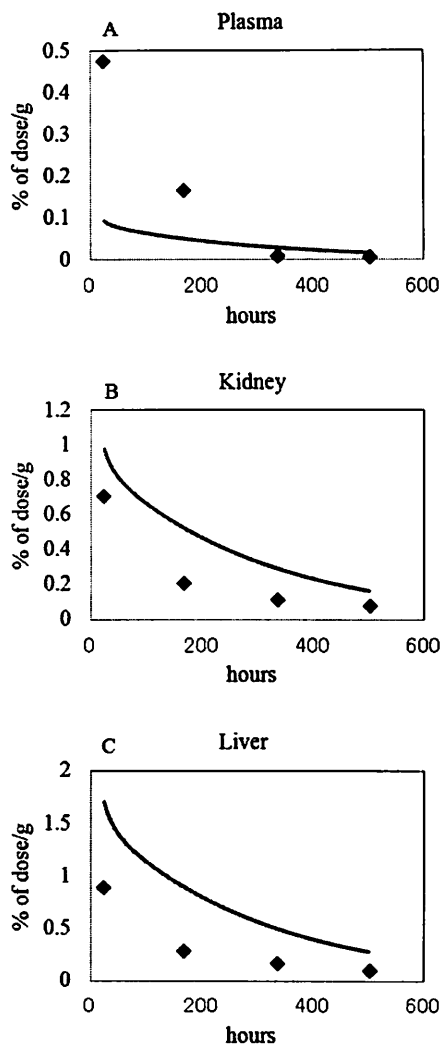


図-8 膜透過型 PBPK モデルによる計算結果と Jain らの実測値の比較 (24~500 時間)

- A: 血漿中亜鉛濃度の計算結果と実測値
- B: 腎臓中亜鉛濃度の計算結果と実測値
- C: 肝臓中亜鉛濃度の計算結果と実測値

(2) 流量律速型モデルと膜透過型モデルの比較

図-5、図-6 と図-7、図-8 を比較すると、流量律速型 PBPK モデルよりも膜透過型 PBPK モデルの方が、投与後 1 時間後に見られる臓器中亜鉛濃度のピークをよく再現できている。この実測値のピークは亜鉛の各臓器への拡散速度が大きいために生じており、その後の減少は排泄速度の方が拡散速度より大きくなったためだと考えられる。

一方で、ある程度時間が経過すると流量律速型 PBPK モデルと膜透過型 PBPK モデルの予測値の間に大きな差は見られない。このことから、亜鉛の体内動態を把握するにあたっては、長期間にわたる体内動態評価を行う際には流量律速型 PBPK モデルでも十分評価可能であるが、曝露直後の臓器中濃度の時間推移や、最大濃度を評価するには膜透過型 PBPK モデルを用いる必要があると考えられる。従って、投与後初期のピーク値及びある程度時間が経過した後の濃度推移のどちらも評価可能な膜透過型 PBPK モデルの方が汎用性が高く、有用であると考えられる。

4. 考察

本研究では亜鉛の膜透過型 PBPK モデルを構築し、流量律速型モデルとの比較を行った。その結果、膜透過型モデルの方が流量律速型モデルよりも実測データをよく再現することが出来た。実際に、それぞれのモデルの計算結果を用いて誤差二乗和を算出して比較したところ、流量律速型は $36.4 \mu\text{g}^2$ 、膜透過型は $28.4 \mu\text{g}^2$ となっており、膜透過型モデルを用いることで計算結果が改善されたと言え、重金属の体内動態評価にあたって種々の輸送機構を組み込んだモデルを構築することの重要性が示された。

その一方で、図7 (B) を見るに膜透過型モデルにおいても腎臓中濃度の計算結果は投与後初期のピークを過少に評価している。これは、肝臓、腸と比べて、腎臓ではミカエリス定数に対して亜鉛の最大移動速度がかなり小さい値となっているために、腎臓細胞内への亜鉛の移行量が少ない計算結果となったためではないかと考えられる。この過小評価の要因としては、本モデルで考慮しなかった輸送機構の存在が考えられる。

亜鉛は、血漿中ではほとんどイオン形で存在せず、各種タンパクと結合して存在している。血漿中に存在する亜鉛の約 2/3 がアルブミンと結合しており^{21), 22)}、残りの 1/3 のほとんどが α_2 -マクログロブリンと結合している^{22), 23), 24)}。亜鉛は血漿中でアミノ酸とも結合することが知られているが、アミノ酸と結合している亜鉛量は血漿中の全亜鉛の 2 % にも満たない²⁵⁾。しかし、アミノ酸が増加することによって、亜鉛の細胞への取り込み量が増加することが分かっており、アミノ酸も亜鉛の臓器中への移行に関与していると指摘されている²⁵⁾。このように、亜鉛の臓器中への移行には多くのタンパクが関わっており、複雑な輸送機構が予想される。また、本モデルでは単純拡散及び促進拡散による受動輸送のみを考慮し、濃度勾配に逆らう能動輸送を考慮していない。更には、腸における吸収は亜鉛の体内動態を考える上で重要であり、

亜鉛の摂取量によって腸での吸収率が変化することが報告されている²⁶⁾他、銅などの他の金属がミカエリス定数に影響を与える事で亜鉛の吸収に関与するという報告もある²⁶⁾。栄養状態や亜鉛の曝露量などにより亜鉛のトランスポーターの発現量は変化するが、この発現量の変化がどの程度影響を及ぼすのかについて考慮するだけのデータが得られなかったため、発現量の変化をモデル内で考慮する必要があるかどうかは今後の検討課題の一つとした。

亜鉛の細胞への取り込み量は単純なミカエリス型の飽和曲線を示すという *in vitro* 試験の結果^{14), 15), 16)}が報告されていることから、本研究で構築した、ミカエリス-メンテン型の収支式を組み込んだ膜透過型モデルには一定の妥当性があると考えられるが、将来的な知見の蓄積に合わせて上述の様々な輸送機構を考慮したモデルへと拡張することで、更に正確な体内動態の再現が期待できる。

このモデルをリスク評価に利用した場合には、体内動態の差が考慮可能になる、あるいは *in vitro* 試験からリスク評価を行う場合に必要な各臓器濃度を推定する事が可能になると考えられる。

また、膜透過型モデルにおいてもパラメータは基本的に生理学的、解剖学的な知見に基づいて決定し得るため、比較的容易に実験動物からヒトへの外挿が実現でき、本研究の成果をヒト健康リスク評価に適用することが期待される。このように、動物からヒトへ拡張する際には体重や各臓器体積及び血流量などのパラメータを変更する必要があると考えられる。さらに、成人から幼児への拡張には上記の体重や血流量などのパラメータに加えて、代謝（排泄係数）の差も考慮する必要があると考えられる。

5. 結論

膜透過型 PBPK モデルの方が実測データをよく再現できているが、これは亜鉛に特有の輸送形態を考慮したためだと考えられる。したがって、重金属などを対象とする場合には輸送形態を考慮したモデルを構築する必要があると考えられる。

本研究では、重金属の輸送特性に着目して PBPK モデルの改良を試み、亜鉛を対象物質として膜透過型 PBPK モデルを構築した。その結果、特に投与後初期に見られるピークの再現に威力を発揮し、従来の流量律速型 PBPK モデルよりも実測データをよく再現する事ができた。すなわち、亜鉛に特有の輸送形態を考慮することで亜鉛の体内動態を良好に再現することができたとと言える。従って、重金属を対象とした体内動態評価を行う際には、

本研究と同様に輸送形態を考慮したモデルを構築する必要があると言える。

今後、本研究で考慮しなかった輸送機構についても調査を続け、必要に応じて膜透過型 PBPK モデルを更に拡張してより正確な体内動態モデルの確立を目指すと共に、亜鉛以外の重金属への応用を試みたい。また、ヒト細胞を用いた実験によりヒトのパラメータを求め、ヒト PBPK モデルへの外挿を行うことでヒトにおける重金属の体内動態評価法を確立し、ヒト健康リスク評価への貢献を目指したい。

参考文献

- 1) Pi J.B., He Y.Y., Bortner C., Huang J., Liu J., Zhou T., Qu W., North S.L., Kasprzak K.S., Daiwan B.A., Chignell C.F. and Waalkes M.P.: Low level, long-term inorganic arsenite exposure causes generalized resistance to apoptosis in cultured human keratinocytes: Potential role in skin co-carcinogenesis, *International Journal of Cancer*, Vol. 116, No. 1, pp. 20-26, 2005.
- 2) Lotti M.: Low-level exposures to organophosphorus esters and peripheral nerve function, *Muscle and Nerve*, Vol. 25, No. 4, pp. 492-504, 2002.
- 3) Miller M.D., Marty M.A., Arcus A., Brown J., Morry D. and Sandy M.: Difference between children and adults: Implications for risk assessment at California EPA, *International Journal of Toxicology*, Vol. 21, No. 5, pp. 403-418, 2002.
- 4) US EPA : Approaches for the application of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models and supporting data in risk assessment (Final Report)
- 5) Liu L., Sandy P.K.: An integrated approach to model hepatic drug clearance, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 29, No. 3-4, pp. 215-230, 2006.
- 6) 岡田泰伸 and 清野進.: チャネルとトランスポーター その働きと病気, メジカルビュー社, 1997.
- 7) Abadin H.G., Hibbs B.F., and Pohl H.R.: Breast-feeding exposure of infants to cadmium, lead and mercury: A public health viewpoint, *Toxicology and Industrial Health*, Vol. 13, No. 4, pp 495-517, 1997.
- 8) Dorea J.G., Donangelo C.M.: Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead, *Clinical Nutrition*, Vol. 25, No. 3, 2006.
- 9) Bellinger D.C.: Interpreting the Literature on Lead and Child Development: The neglected role of the "Experimental System", *Neurotoxicology and Teratology*, Vol. 17, No. 3, pp. 201-212, 1995.
- 10) Merrill E.A., Clewell R.A., Gearhart J.M., Robinson P.J., Sterner T.R., Kyung O. Yu, Mattie D.R., and Fisher J.W.: PBPK Predictions of perchlorate distribution and its effect on thyroid uptake of radioiodide in the male rat, *Toxicological Sciences*, Vol.73, No. 2, pp. 256-269, 2003.
- 11) Foote J.W., Delves H.T.: Albumin bound and alpha2-macroglobulin bound zinc concentrations in the sera of health adults, *Journal of Clinical Pathology*, Vol. 37, No. 9, pp. 1050-1054, 1984.
- 12) Brown R.P., Delp M.D., Lindsted S.L., Rhomberg L.R., and Beliles R.P.: Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models, *Toxicology and Industrial Health*, Vol. 13, No. 4, pp. 407-484, 1997.
- 13) House W.A. and Wastney M.E.: Compartmental analysis of zinc kinetics in mature male rats, *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, Vol. 273, No. 3, pp. R1117-R1125, 1997.
- 14) Taylor J.A. and Simons T.J.B.: The mechanism of zinc uptake by cultured rat liver cells, *Journal of Physiology-London*, Vol. 474, No. 1, pp. 55-64, 1994.
- 15) Oestreicher P. and Cousins R.J.: Zinc uptake by basolateral membrane vesicles from rat small intestine, *Journal of Nutrition*, Vol. 119, No. 4, pp. 639-646, 1989.
- 16) Kaur J., Sharma N., Attri S., Gogia L. and Prasad R.: Kinetic characterization of zinc transport process and its inhibition by cadmium in isolated rat renal basolateral membrane vesicles: *In vitro* and *In vivo* studies, *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 283, No. 1-2, pp. 169-179, 2006.
- 17) Tsuji A., Nishide K., Minami H., Nakashima E., Terasaki T., and Yamana T.: Physiologically based pharmacokinetic model for cefazolin in rabbits and its preliminary extrapolation to man, *Drug Metabolism and Disposition*, Vol. 13, No. 6, pp. 729-739, 1985.
- 18) ICRP.: Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection, 2002.
- 19) Jain R.K., Gerlowski L.E., Weissbrod J.M., Wang J. and Pierson R.N., Jr.: Kinetics of uptake, distribution, and excretion of zinc in rats, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 9, No. 4, pp. 347-361, 1981.
- 20) Dunn M.A. and Cousins R.J.: Kinetics of zinc metabolism in the rat: effect of dibutyryl cAMP, *American Journal of Physiology*, Vol. 256, No. 3, pp. E420-E430, 1989.
- 21) Vikbladh I.: Studies on zinc in blood .1., *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, Vol. 2,

- No. 2, pp. 143-148, 1950.
- 22) Parisi, A.F. and Vallee B.L.: Isolation of a zinc alpha2-macroglobulin from human serum, *Biochemistry*, Vol. 9, No. 12, pp. 2421-&, 1970.
- 23) Ballatori N.: Mechanisms of metal transport across liver cell plasma membranes, *Drug metabolism reviews*, Vol. 23, No. 1&2, pp. 83-132, 1991.
- 24) Giroux E.L., Durieux M., and Schechter P.J.: A study of zinc distribution in human serum, *Bioinorganic Chemistry*, Vol. 5, No. 3, pp. 211-218, 1976.
- 25) Smith K.T., Cousins R.J., Sirbon B.L. and Failla M.L.: Zinc absorption and metabolism by isolated, vascularly perfused rat intestine, *Journal of Nutrition*, Vol. 108, No. 11, pp. 1849-1857, 1978.
- 26) Kingsley B.S., and Frazier J.M.: Cadmium transport in isolated perfused rat liver: zinc-cadmium competition, *American Journal Physiology*, Vol. 236, No. 3, pp C139-C143, 1979.

(2011.5.30受付)

Development of PBPK Model for Heavy Metals Based on Biological Metal Transports

Kazuki MANAMI¹, Hidetaka KITAGAWA¹, Kengo NAKAMURA¹
Katunori SASAKI¹, Aki NAKAYAMA¹ and Minoru YONEDA¹

¹Dept. of Urban Environmental Engineering, Kyoto University

Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model enables us to predict target organs or extrapolation from animal experiment data to human for toxic assessment. PBPK model is an important part of health risk assessment, and it is used to assess health risk of harmful substances such as chemical substances. However, PBPK model is created for drug development, and the target is originally organic synthetic compound, but not heavy metals. Although active transport is generally responsible for the distribution in a body of metals, commonly-used PBPK model does not include the active transportation in that structure. That makes difficult to estimate the target organs and the concentrations of heavy metals. In this study, We constructed the PBPK model for a heavy metal, Zinc, which includes active transportation mechanism. Comparing observed values of tissues and the simulated calculation by the PBPK models, we found the PBPK model including active transportation mechanism is able to predict time-dependent change of Zn concentrations better than the commonly-used PBPK model.