

化学物質の分子サイズや  
代謝分解性に着目した  
生物濃縮性評価手法に関する研究

2022

宮田 知代子



# 目次

第1章 序論	
1.1 はじめに	1
1.2 濃縮度試験	2
1.3 濃縮度試験の代替法	4
1.4 本研究の目的と概要	5
第2章 鰓経由の濃縮性と分子サイズの関係	
2.1 緒言	7
2.2 材料と方法	9
2.3 結果と考察	14
2.4 結論	26
第3章 腸管膜経由の濃縮性と分子サイズの関係	
3.1 緒言	27
3.2 材料と方法	28
3.3 結果と考察	35
3.4 結論	41
第4章 代謝速度と濃縮性の関係	
4.1 緒言	42
4.2 材料と方法	43
4.3 結果と考察	51
4.4 結論	60
第5章 総括	62
引用文献	65
謝辞	79
本研究に関する原著論文	80



# 第1章 序論

## 1.1 はじめに

一般的な化学物質は、生物体内に取り込まれてもいずれは代謝、排泄等によって体外に排出される。しかしながら、ほとんど体外に排出されず、長期間に渡って生体内に蓄積される物質が存在する。このように生物が外界から取り込んだ化学物質を、環境中よりも高い濃度で生体内に蓄積する現象を生物濃縮という<sup>1)</sup>。高い生物濃縮性をもった化学物質は、下位生物では低濃度であったとしても、食物連鎖を介して環境中の数千倍から数万倍の高濃度で上位の捕食者に移行していき、捕食者の頂点に位置する野生生物やヒトにおける深刻な健康被害を引き起こす場合がある。このような生物濃縮性(Bioaccumulation)に加えて、環境中での残留性(Persistence)およびヒトやその他の生物への毒性(Toxicity)を兼ね備えた物質はPBT物質と総称され、世界各国で環境汚染物質として大きな社会的関心を集めてきた<sup>1,2)</sup>。代表的なPBT物質としては polychlorinated biphenyl (PCB) や dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)、ダイオキシン類等があり<sup>3)</sup>、一部の国々による取組では地球規模での環境汚染防止は困難で、国際的協調が必須である。これらPBT物質に関しては2001年に締結されたストックホルム条約にて製造および使用の廃絶・制限や含有廃棄物の適正処理等が規定されている<sup>4)</sup>。わが国においては、1930年代以降、熊本県水俣湾周辺を中心とする八代海沿岸で発生した水俣病の原因が、工場排水として環境中に排出された微量のメチル水銀化合物が体内に生物濃縮した魚介類を摂取したことによるものと判明した<sup>5)</sup>。このような化学物質による様々な公害問題が1950~60年代にかけて顕在化し、PCBが食用米ぬか油に混入したカネミ油症事件<sup>6,7)</sup>を直接の契機として、1973年に世界に先駆けて工業化学品の事前審査制度を備えた「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法)が制定された<sup>8)</sup>。化審法は人の健康を損なうおそれ又は動植物の生息・生育に支障を及ぼすおそれがある化学物質による環境汚染の防止を目的としており、年間1トン以上国内で製造・輸入する全ての化学物質について、PBT物質に該当するか否かを判定する評価スキームとなっている<sup>8)</sup>。化審法では最初に微生物による分解度試験を実施し、この分解度試験で「良

分解性」と判定されると、環境中に放出された場合でも速やかに無機化され、悪影響がない物質として後続試験の実施が免除される。しかしながら、この分解度試験では長期間にわたる人工培養によって自然環境中よりも分解活性が低下した微生物を使用し、かつ環境中に存在する化合物濃度よりもはるかに高い濃度（100 mg/L）での試験実施が義務付けられているため<sup>9)</sup>、自然環境中では分解可能な化学物質であっても多くのケースで「良分解性ではない」と判定されてしまう課題がある。このため、新規開発化合物の登録申請においては、事実上、後続の濃縮度試験の実施は必須となっている。この濃縮度試験で「高濃縮性ではない」と判定されると、哺乳動物（28日間反復投与毒性試験）や環境生物（魚類急性毒性試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、藻類生長阻害試験）に対するスクリーニング的な毒性試験を実施し、毒性の強さに応じて適切な管理を実施しながら製造・輸入が可能となるが、「高濃縮性」と判定された場合は、環境中排出量が低くとも長期間を経てヒトや環境生物に悪影響を与える可能性があるため、上市前に様々な長期毒性試験の実施が求められ、実質的には開発継続が困難となる。

## 1.2 濃縮度試験

濃縮度試験では、暴露方法の異なる二種類の試験（aqueous exposure test; 水暴露法または dietary exposure test; 餌暴露法）が OECD<sup>10)</sup>および化審法<sup>11)</sup>でガイドライン化されており、化学物質の物理化学的性状等を考慮していずれかを実施することとなっている（図 1-1）。

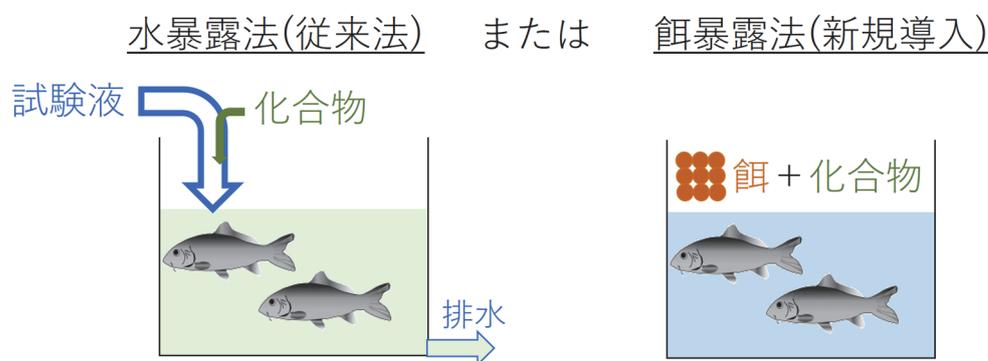


図 1-1. 濃縮度試験

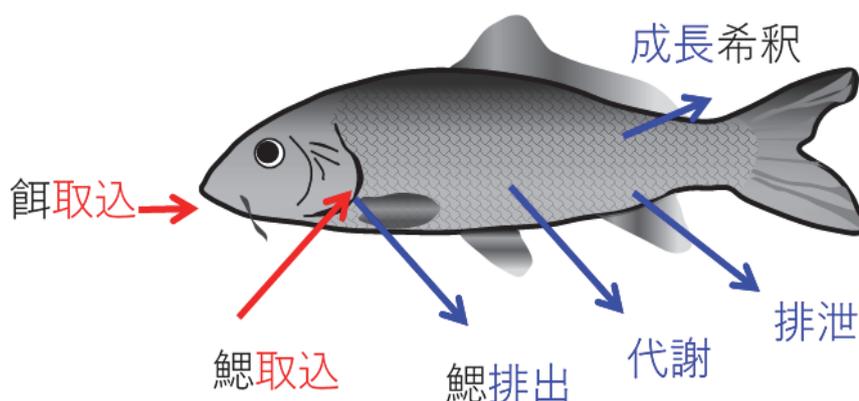
水暴露法では、化合物を一定濃度の流水条件下で魚（通常はコイ）に 28 日間以上暴露し、魚体中の化学物質濃度が定常状態に達したと判断された時点での魚体中濃度と水中濃度の比率から濃縮倍率 (Bioconcentration factor; BCF) を決定し、この BCF 値が 5000 以上になると「高濃縮性」と判定される。この試験は各種の予備検討を含めると半年～1 年程度を要する比較的長期の試験である。また、水溶解度未満かつ試験生物に影響がない低濃度で暴露する必要があるため、試験期間中を通して生物や試験装置の維持管理、定期的な微量分析作業が必須となり、試験費用の高額化 (800～1000 万円以上) につながっている。一方、水溶解度未満での暴露が技術的に困難な高疎水性化学物質への適用を想定し、餌暴露法が 2012 年に OECD によりテストガイドライン化され<sup>10)</sup>、2018 年に化審法でも採用された<sup>11)</sup>。これは、化学品規制における標準試験として餌暴露法が採用された世界初の事例である。この新試験では、餌に化学物質を混ぜ込んで魚に投与し、化学物質が環境中で餌経由の生物濃縮を起こす可能性を示す指標と考えられている濃縮倍率 (Biomagnification factor; BMF) を、魚体中濃度と餌中濃度の比率から算出する。しかしながら、この試験では水槽中に数十匹存在する各魚の餌摂取量を一定にコントロールすることが困難なため、水暴露法に比べて再現性の高い結果を得ることが難しく、日本以外の国における法規制においては未だ標準試験としては採用されていない。このような試験の不確実性や既存データの少なさを理由として、化審法への導入時には、確実に低濃縮性であるかどうかのみを判定可能な暫定基準値として  $BMF < 0.007$  が設定された<sup>12)</sup>。この暫定基準値は、食物連鎖網を介して濃縮するか否かの本質的な指標と考えられている「BMF が 1 以上」と比べると極めて保守的な値であり、標準試験として導入後の試験実施数は水暴露法に比べて伸び悩んでいる。また、水暴露または餌暴露によるこれらの生物試験は、化審法<sup>12)</sup>では年間 1 トン以上、欧州における化学物質の登録・評価・認可・制限に関する規制 (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals; REACH 規則)<sup>8)</sup>では年間 100 トン以上製造・輸入する化学物質については原則必須である。濃縮度試験の結果が新規化学物質の開発継続可否を左右する重要な位置づけであるにも関わらず、費用・期間の両面において高コストであることは、化合物開発のボトルネックとなっている。加えて、多数の脊椎動物を使用する試験であることから、動物愛護の観点からの批判もある。このような背景から、生物試験以外の方法で濃縮性を早期にかつ簡便に判定可能な代替法の活用が強く求められている。

### 1.3 濃縮度試験の代替法

生物濃縮の過程は化学物質が水または餌から魚体の脂質組織に分配する現象と見なせるため、オクタノール/水系の分配挙動との類似性が高い。そこで、オクタノール/水分配係数 ( $\log K_{ow}$ ) が化学物質の疎水性を表す代表的な物理化学的指標として扱われており、BCF または BMF の対数値と良好な相関関係にあることが知られている<sup>13,14)</sup>。 $\log K_{ow}$  は化審法では 3.5 未満<sup>12)</sup>、欧州 REACH 規制では 3 未満<sup>15)</sup>であれば「高濃縮性ではない」と判断され、魚を用いた濃縮度試験は免除される。ただし、有機金属化合物、界面活性効果のある物質や、脂質分配以外のタンパク結合等によって生物体内に濃縮すると考えられる物質（パーフルオロアルキル化合物等）は適用範囲外とされており注意が必要である。一方、化学物質の分子が立体的にかさ高い場合は生体膜を透過できない、すなわち魚体内に取り込まれないために低濃縮性であることがこれまでに数多く報告されている<sup>16-18)</sup>。この現象は化学物質の疎水性のみでは説明が困難であるため、化審法では一部の例外物質を除き、分子量が 800 を超えれば「高濃縮性ではない」と判断され、動物試験が免除される<sup>19)</sup>。さらに、化審法では構造が類似して生物濃縮性が既知である化学物質からの類推等による判定も実施されており<sup>20)</sup>、異性体（幾何異性体等）あるいは基本骨格が同じで一部分が変化した物質の既存データを活用した効率的な評価も推進されている。一方、欧州 REACH 規制においては、様々な情報を網羅的に収集し、それら全てについて専門家判断による証拠の重みづけ（weight-of-evidence）を行って、水生生物のみならず、食物連鎖網を介した濃縮ポテンシャルを総合的に判断することが求められる。そのため、REACH 規制のガイダンス文書<sup>15)</sup>には上記の  $\log K_{ow}$  や分子量、類推評価に加えて濃縮倍率をエンドポイントとした多種の定量的構造的活性相関（QSAR）ツール<sup>22)</sup>や、分子の三次元構造を考慮した取込制限指標<sup>23)</sup>、代謝分解性を評価する簡易試験<sup>22)</sup>や人工膜を用いた模擬的な試験方法<sup>24, 25)</sup>など、さまざまな手法が記載されている。しかし、これらほとんどの代替法について、濃縮性を判定する明確な基準値は定義されておらず、評価者の科学的知識に委ねられている。そのため、登録物質によっては評価がぶれ、規制当局による審査の際に追加試験が課される場合もある。したがって、代替法を開発する際には、科学的根拠に基づいた評価基準を明確化することが重要である。

## 1.4 本研究の目的と概要

前節にて既存代替法の事例を示したが、魚個体を1つの媒体と考えた場合、濃縮倍率は、化学物質が魚体内に取り込まれる速度と、魚体内から減衰する速度の比から算出することができる<sup>26)</sup>。魚体内に取り込まれる経路としては、呼吸器である鰓を介した経路と、餌を消化する腸管を介した経路の二種類が考えられる。また、減衰する経路は、水に溶解して鰓から排出される過程、代謝により他の物質に変換されて消失する過程、糞尿として排泄される過程、魚の成長により見かけの体内濃度が減少する過程の四種類が主なものと考えられる(図1-2)。本研究では、鰓および腸管を介した二種類の取込過程および代謝による分解過程に着目し、化合物の取込量が少ない、あるいは速やかに代謝分解されれば低濃縮性と判定できる代替法の検討を行うこととした。



$$\text{濃縮倍率} = \frac{\text{鰓取込速度} + \text{餌取込速度}}{\text{鰓排出速度} + \text{代謝速度} + \text{排泄速度} + \text{成長希釈速度}}$$

図 1-2. 化学物質の魚体内への取込および減衰経路

第2章では、欧州 REACH 規制で採用されている分子の三次元構造を考慮した取込制限指標に着目し、この指標を専門知識なしに再現性高く算出可能な手法を開発した。また、現行では真空中の量子化学計算結果から水中における分子のかさ高さを推定しているのに対し、本研究では MD シミュレーションを用いて水中の分子構造を計算し、実際の系を反

映した新たな低濃縮性の評価指標の解析を行った。

第 3 章では、餌暴露法についても水暴露法と同様の分子サイズにもとづいた取込制限の閾値が存在するのではないかとの仮定のもと、*in vitro* 反転腸管法を魚に適用して分子量や分子サイズの異なる化学物質の膜透過性の効率的な評価を試みた。

第 4 章では、分子サイズが小さく生物体内に取り込まれた化学物質であっても、速やかに代謝されることが確認できれば低濃縮性と評価できることから、魚の肝臓組織を用いて代謝速度を測定し、従来の QSAR 予測値と比較して精緻な BCF 予測が実現可能かどうかの検証を行った。

## 第2章 鯰經由の濃縮性と分子サイズの関係

### 2.1 緒言

残留性(Persistence)・生物濃縮性(Bioaccumulation)・毒性(Toxicity)を有する化学物質(PBT物質)や残留性有機汚染物質(Persistent Organic Pollutants: POPs物質)は、環境中に排出された場合、ヒトをはじめとする高次生物や環境中生物に悪影響を及ぼす懸念が高いため、ストックホルム条約をはじめとする国内外の様々な規制により製造・輸入が厳しく制限されている<sup>27,28)</sup>。この中で生物濃縮性は、食物連鎖を介したヒトや環境生物中の化合物濃度の決定に寄与する重要な特性である。国内では1973年に成立した「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法)にもとづき、年間1トン以上製造または輸入される全ての化学物質について水生生物を対象とした濃縮度試験の実施が義務付けられている<sup>8)</sup>。欧州における化学物質の登録・評価・認可・制限に関する規制(Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals; REACH規則)では、事業者は原則として全登録化学物質について濃縮性の評価を実施する必要があり、特にEU域内における年間の製造・輸入数量が100トン以上の化学物質については、生物を用いた濃縮度試験が義務付けられている<sup>29)</sup>。なお、濃縮ポテンシャルが低いことが科学的に説明可能な物質、たとえば生体膜を透過する可能性が低いものや、水環境中の生物が直接または間接的に暴露する可能性が低い物質は生物濃縮度試験の対象外となっている<sup>29,30)</sup>。生物濃縮度試験は、化学物質を溶解させた水中で魚を一定期間飼育し、鰓膜を介して取り込まれた化学物質が魚体中で定常状態に達した際の魚体中濃度と水中濃度の比を求めることを目的とし、この比は生物濃縮性(Bioconcentration factor; BCF)として定義される<sup>10,11)</sup>。そして、このBCF値が5000を下回ると、その化学物質は濃縮性が低いとみなされる<sup>8,29)</sup>。

生物濃縮度試験は多額の費用と期間が必要な上、多数の実験動物を必要とするため、開発期間の短縮のみならず動物愛護の観点からも、試験数の削減が求められている。そこで、1973年以降に実施された種々化学物質の生物濃縮度試験結果を利用して、化学物質のオクタノール-水分配係数(logKow)や分子量(MW)などの物理化学的なパラ

メータから生物濃縮性を予測する手法が開発されてきた<sup>31)</sup>。これらの予測手法の中には、生物が化学物質を取り込む際の生体膜の透過過程に着目し、分子サイズが大きい、すなわち、かさ高い分子は膜を透過できないという発想から、分子の大きさを取り込み制約の要因として想定するものがある<sup>17-18,31-33)</sup>。例えば、化審法においては、分子量が800を超える化学物質は生物濃縮性が低いと評価され、生物試験の免除が認められている<sup>28,34)</sup>また、欧州 REACH 規則では、Mekenyan らが分子の大きさを定義する立体的要因として提案した  $D_{\max\text{ aver}}$  というパラメータにもとづき<sup>23,35)</sup>、 $D_{\max\text{ aver}} > 17.4 \text{ \AA}$  を低濃縮性 ( $\text{BCF} < 5000$ ) の証拠の1つ (weight-of-evidence) として採用している<sup>36)</sup>。 $D_{\max\text{ aver}}$  は、化学物質のエネルギー面上での局所的安定構造をその内部に包含することができる最小の球の直径 ( $D_{\max}$ ) の算術平均値として定義される。この  $D_{\max\text{ aver}}$  は、Mekenyan らが提唱した新たなパラメータであり、彼らが開発した商用ソフトウェア「OASIS」によってのみ算出することが可能である<sup>15,37)</sup>。 $D_{\max\text{ aver}}$  は化合物の立体的かさ高さを表す代表的な指標であるが、単独では生物濃縮度試験を免除するには不十分と考えられており<sup>15,36)</sup>、現在のところ EU 以外の国では承認されていない。 $D_{\max\text{ aver}}$  の信頼性に関する大きな問題の1つは、魚類への生物濃縮度試験は水環境下で行われるにも関わらず、真空中での立体構造に基づいて算出されていることである<sup>23,35)</sup>。水中における分子構造の算出には、周囲の大量の水分子との相互作用を考慮する必要があるため、量子化学計算において膨大な計算コストがかかる。このため OASIS では、真空中と水中での分子の安定構造の違いを考慮し、真空中で最も安定な立体構造から+20 kcal/mol 以内の局所安定構造を全て選択してその平均値を  $D_{\max\text{ aver}}$  として濃縮性評価に用いることを提案した<sup>23)</sup>。しかしながら、この「+20 kcal/mol 以内の安定構造の平均値」という近似が正しいかどうかの科学的な検証 (例：実際の水中での安定構造を真空中での安定構造と比較するなど) はなされていない。加えて、OASIS ソフトウェアで  $D_{\max\text{ aver}}$  を精度よく計算するためには、安定構造の発生・収束に用いられている各種パラメータ (number of permanent population, number of children, mutation/crossover ratio, generation times 等) を化合物の構造にあわせて適切に入力する必要があり、専門的な知識が必要である<sup>38)</sup>。

そこで本研究では、上記のような専門的な知識がなくとも、Mekenyan らと同等の真空中における  $D_{\max\text{ aver}}$  を算出できる新たな手法の開発を検討した。この手法は、真空中でエネルギー的に安定な局所安定構造群を生成する市販プログラムと、生成された局所安定構造群から  $D_{\max}$  を計算する独自プログラムの組み合わせで構成されている。さ

らに本研究では、分子動力学 (MD) シミュレーション法を導入して、水中における分子の動的挙動を再現し、水中で分子が取り得る構造の  $D_{\max}$  値を、真空中での  $D_{\max}$  値と比較した。最後に、信頼性の高い実測 BCF 値のデータを活用し、1665 物質について水中での MD シミュレーションを実施して、生物濃縮性が低い、すなわち BCF が 5000 未満であると判断可能な新たな分子サイズ閾値の解析を試みた。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 真空中の分子サイズ計算手法

化合物の三次元初期構造は CHEM3D Ver.18 (PerkinElmer Informatics, USA) を用いて作成した。この初期構造を HyperChem 8.0.6 (Hypercube, USA) に入力し、Monte Carlo Multiple Minimum (MCMM) search algorithm<sup>39)</sup>により分子内の二面角を 120 度ずつ回転させて、種々の三次元構造群を生成させた。計算コストを考慮し、三次元構造の数が 500 万個を超えた時点で生成を停止させることとした。化合物の二面角が 14 個の場合の生成可能な全構造数は約 500 万個 ( $3^{14}=4,782,969$ ) であるため、14 個以上の二面角数を持つ化合物に対しても上限が 500 万個で十分であるかどうかは事前に検証することとし、自由度の高い分子を選定して  $D_{\max}$  値が 3Å 以上異なる 5 種類の初期構造を HyperChem に入力し、再現性を確認した。

MMCM search algorithm で生成した三次元構造群について、自由エネルギー勾配法を用いて構造最適化を行った。この構造最適化は 2 種類の計算方法で段階的に実施した。第一段階では、分子力学法 (MM+力場)<sup>40)</sup>を用い Polak-Ribiere Conjugate Gradient 法<sup>41)</sup>により、三次元構造群を粗く最適化した。第二段階目では、分子力学法で得られた局所安定構造それぞれを、半経験的分子軌道法 (AM1/6-31G+)<sup>15)</sup>で Polak-Ribiere Conjugate Gradient<sup>41)</sup>によって再度最適化した。なお、両最適化過程における Polak-Ribiere Conjugate Gradient のエネルギー勾配の収束閾値は、いずれも 0.01 kcal/Å mol に設定した。

これら二段階による構造最適化の後、OASIS で  $D_{\max\text{aver}}$  を算出するのと同様の前処理として、最安定構造よりもポテンシャルエネルギーが 20 kcal/mol 以上高い局所安定構造を除外した<sup>15)</sup>。これとは別に、構造的が著しく類似している局所安定構造も除外した。構造上の類似性は、各構造の両端にある 2 つの原子間の二乗平均平方根距離の計算

によって確認した。二乗平均平方根距離の差が  $0.1\text{\AA}$  以下であれば、これらの局所安定構造は類似度が高いと判断し、いずれか 1 つを選択して他の構造は除外した。このようにして得られた三次元安定構造群は、以後「全局所安定構造」と表記する。この構造群を用いて  $D_{\max\text{ aver}}$  を算出し、OASIS の値と比較した。

全局所安定構造の中には、ポテンシャルエネルギー面の同一の谷の緩やかな底辺付近に局所安定構造が複数存在する場合がある。これらの近接する局所安定構造は構造的な類似性が高く、 $D_{\max\text{ aver}}$  を計算する際に偏った重みを与える可能性が高い。そこでこれらの構造は Excel ソフトの Visual Basic Application (VBA) を用いた独自プログラムによって除外した。具体的には、式 (2-1) に従い全局所安定構造の中からランダムに選択した 2 構造について、それぞれ対応する 2 つの原子の間の二乗平均平方根距離を計算した。

$$d = \sqrt{\sum_{i,j} (\Delta x_{ij}^A - \Delta x_{ij}^B)^2} \quad (2-1)$$

ここで、 $\Delta x_{i,j}^A$  と  $\Delta x_{i,j}^B$  は局所的安定構造 A、B の原子 i と j の間の距離を示しており、d 値が小さいほど 2 つの構造間の類似性が高いことを示す。全局所安定構造の全構造ペアについて d 値を算出し、d 値が小さい組み合わせの場合、1 つを選択して他は除外した。d 値が小さい順に除外を繰り返し、最終選抜される局所安定構造群の数を調整した。このようにして選別された局所安定構造群を、「選抜安定構造」と表記する。最終選抜数が 10、30、50、100、200 となる選抜安定構造からそれぞれ  $D_{\max\text{ aver}}$  を算出し、OASIS の値と比較した。

### 2.2.2 水中の分子サイズ計算手法

化学物質の初期の 3 次元構造は CHEM3D を用いて作成し、Material Studio 2018 (BIOVIA, USA) を用いた MD シミュレーションにより、化学物質の水中の三次元構造を算出した。Forcite モジュールを用いて 2000 個の水分子を含む密度  $1.0\text{ g/cm}^3$  の立方体 (各辺  $39.1\text{\AA}$ ) を作成し、MD シミュレーションを実施することとした。このサイ

ズは、Mekenyan らが提唱する低濃縮性の  $D_{\max \text{ aver}}$  閾値である  $17.4 \text{ \AA}$  の 2 倍以上であり、一般的な化学物質のシミュレーションを行うには十分なサイズと考えられる。この水分子を含む立方体の中に計算対象とする化合物を挿入し、Forcite モジュールの Smart algorithm と Condensed-Phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation Studies (COMPASS) II 力場を用いてエネルギー最小化を行った<sup>42)</sup>。エネルギー最小化後に Material Studio の Forcite モジュールの NTP ensemble を用いて、1.0 fs 毎の時間ステップでの MD シミュレーションを実施した。水中シミュレーションは Nosé-Hoover thermostat と Berendsen barostat<sup>43-45)</sup>を用い、温度は 298 K、圧力は  $1 \times 10^5 \text{ Pa}$  で維持した。水中でのシミュレーション時間は 10、100、200、500、2000 ps まで実施した後、原則 1 ps 毎に分子の三次元構造座標を抽出し、抽出した各構造について  $D_{\max}$  計算を行った。MD シミュレーションにおいては、 $D_{\max}$  値の再現性と計算コストを考慮し、最適な計算時間を決定した。

### 2.2.3 分子サイズパラメータ $D_{\max}$ の算出方法

2.2.1 および 2.2.2 で算出した真空中および水中での構造の全原子の座標から、VBA を用いた独自 Excel プログラムを用いて、構造内の全原子の van der Waals 半径<sup>46)</sup> を含む球の直径 (すなわち  $D_{\max}$ ) を算出した。 $D_{\max}$  は真空中の「全局所安定構造」、「選抜安定構造」、および「水中の安定構造群」のそれぞれについて計算した。各構造群の  $D_{\max \text{ aver}}$  は  $D_{\max}$  の算術平均から、 $D_{\max \text{ max}}$  と  $D_{\max \text{ min}}$  は構造群中の  $D_{\max}$  の最大値と最小値からそれぞれ決定した。

独自 Excel プログラムでは、まず球の中心を決定し、次に球の中心から最も遠い原子のファンデルワールス半径を含む端までの距離を計算し、それを 2 倍することで  $D_{\max}$  を求める<sup>47)</sup>。球の中心を求める手順を以下に記載する。まず 3 次元座標の原点に移動点を設定し、その移動点を原点から最も遠い原子 ( $x_1$ ) に向かって  $(h_{x_1} + v_{x_1}) / 2$  の距離分移動させる。ここで、 $h_{x_1}$  は原点から原子  $x_1$  までの距離、 $v_{x_1}$  は原子  $x_1$  のファンデルワールス半径とする。次に、移動した箇所から最も遠い原子 ( $x_2$ ) に向かって、 $(h_{x_2} + v_{x_2}) / 2$  の距離分移動させる。ここで、先ほどと同様、 $h_{x_2}$  は原点から原子  $x_2$  までの距離、 $v_{x_2}$  は原子  $x_2$  のファンデルワールス半径とする。この操作をあらかじめ設定しておいた回数 ( $y$  回) 繰り返す。 $y$  回の移動が完了後、移動距離を  $(h_{x_i} + v_{x_i}) / 2^2$  に変更し、到達後の移動点から最も遠い原子まで  $(h_{x_i} + v_{x_i}) / 2^2$  分移動するという操作を、同じく  $y$  回繰り返

す。この操作を繰り返すことで、最も遠い原子までの移動距離 $(h_{xi}+v_{xi})/2^n$ が減少していき、移動点は徐々に球の真の中心に近づく。本検討では、1回の移動距離が $1 \times 10^{-6}$  Å以下になった時点で球中心に収束したと判断した。また、本方法を何回か試行し、移動距離変更前の移動回数  $y$  を 20 に設定すると、短時間で再現性良く球の中心が求められることがわかった。

## 2.2.4 評価化合物

UK Environmental Agency が作成した濃縮性に関する分子サイズ指標の報告書<sup>37)</sup>では、形状と大きさが異なる 69 種類の化学物質が取り扱われており、ビフェニルエーテル、ポリクロロアルカン、ポリスルフィド、スチリルフェノール、第一級アルコール、色素材料、および同一カテゴリーにはまとめることのできない多様な 29 種の化学物質から成っている(表 2-1)。これらの化合物の真空中および水中での  $D_{max}$  値を算出し、両者を比較した。

独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) は 1974 年から 2017 年までに実施された生物濃縮度試験の BCF 実測値を公表している<sup>48,49)</sup>。全ての試験は OECD Test Guideline 305 (I)<sup>10)</sup>または化審法ガイドライン<sup>11)</sup>に準拠しており、OECD Principles of Good Laboratory Practice<sup>50)</sup>の下で測定された信頼性の高い値である。本研究では、低濃縮性 (BCF <5000) を示す化合物の分子サイズの閾値を見極めるため、これら BCF 実測値を有する化合物の水中での  $D_{max}$  を算出し解析することとした。なお、水中でイオン化する化合物については、分子サイズを過大評価しないよう解離型の構造から  $D_{max}$  を計算した。また、閾値を適切に設定するために、公表された BCF 値を全て解析には用いず、以下のような選抜を行った。すなわち化合物が混合物である場合は報告書を精査し、化合物の構造式が特定された BCF 値は採用し、その他の BCF 値は解析から除外した。1つの化合物について2種類以上の実測 BCF 値が得られた場合は、可能な限り保守的な解析を行うため、最も高い BCF 値を採用した。無機物質や重金属を含む有機物質は、魚類への取り込みメカニズムが鰓膜を介した受動的な拡散とは異なるため解析の対象外とした<sup>51,52)</sup>。複数の  $CF_2$  構造を含むパーフルオロアルキル系化合物 (PFAS 類) は、血液中等に存在するタンパク質との特異的な結合により生物体内に濃縮する事例が多数報告されている<sup>53-55)</sup>。このような特殊なメカニズムによって体内に取り込まれる PFAS 類については、単純な分子サイズ ( $D_{max}$  値) が取り込み制約要因にならない可

表 2-1. 分子サイズの計算に用いた化合物

化合物群	代表的な構造	化合物数
Biphenyl ethers		11
Polychlorinated alkanes		22
Polysulphides		6
Styrylphenols		5
Primary alcohols		2
Pigments		3
Other chemicals		29

可能性があるため今回の解析から除外した。また、分子サイズが明らかに小さく濃縮懸念が低い化合物 (BCF<100 かつ分子量<100) は、計算コスト削減のため解析対象から除外した。以上の結果、本研究では 1665 種類の化学物質について水中での  $D_{max}$  値を算出した。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 真空中での分子サイズ計算結果

真空中での  $D_{max}$  値は、2.2.1 で記載した HyperChem とオリジナルのプログラムの組み合わせを用いて、UK Environmental Agency の報告書<sup>37)</sup>に記載されている 69 種の化合物について算出した。図 2-1(A)に各化学物質の回転可能な二面角の総数を示す。

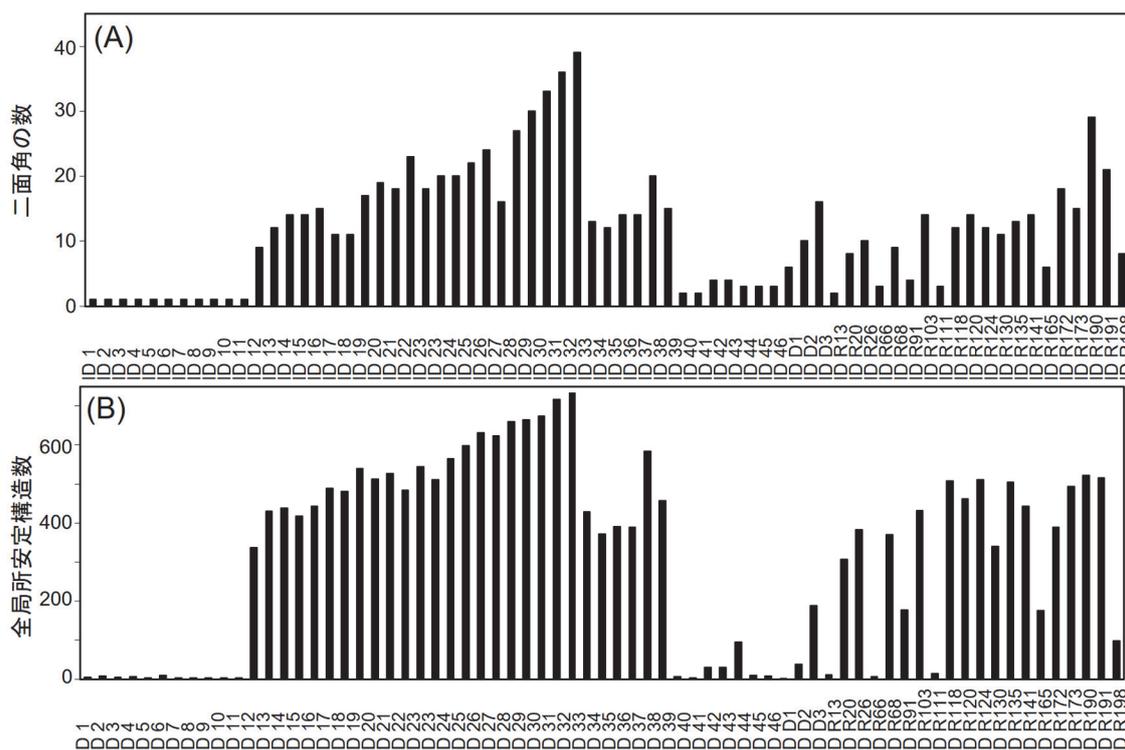


図 2-1. 69 物質の二面角数 (A) と真空中での「全局所安定構造」の数 (B)

今回使用した化学物質の二面角数は1から最大39であり、自由度が高い化合物が多数含まれる。そのため、これらの二面角を回転して得られた三次元構造群からエネルギー的に安定な局所安定構造群を得るためには、5分から最長2週間の計算時間を要した。図2-1(B)に得られた「全局所安定構造」の数を示す。回転二面角の数が多く、すなわち自由度の高い化合物のほど最終的に得られる局所安定構造群の数は増加し、最終的に1~717個からなる「全局所安定構造」が得られた。ポリクロロアルカンであるID33 ( $C_{30}H_{49}Cl_{13}$ ) は、今回計算した69物質の中で回転自由度が最も高く、最大数の局所安定構造が得られた。図2-2にID33について得られた局所安定構造の例を示す。 $D_{max}$ の値は、図2-2に示すように、最小 ( $D_{max\ min}$ ) 17.8 Å から最大 ( $D_{max\ max}$ ) 38.9 Å の範囲にあった。ID33の最安定構造の $D_{max}$ 値、すなわち $D_{max\ stable}$ は23.2 Åであり、得られた「全局所安定構造」の $D_{max}$ の算術平均値 ( $D_{max\ aver}$ ) は26.4 Åであった。

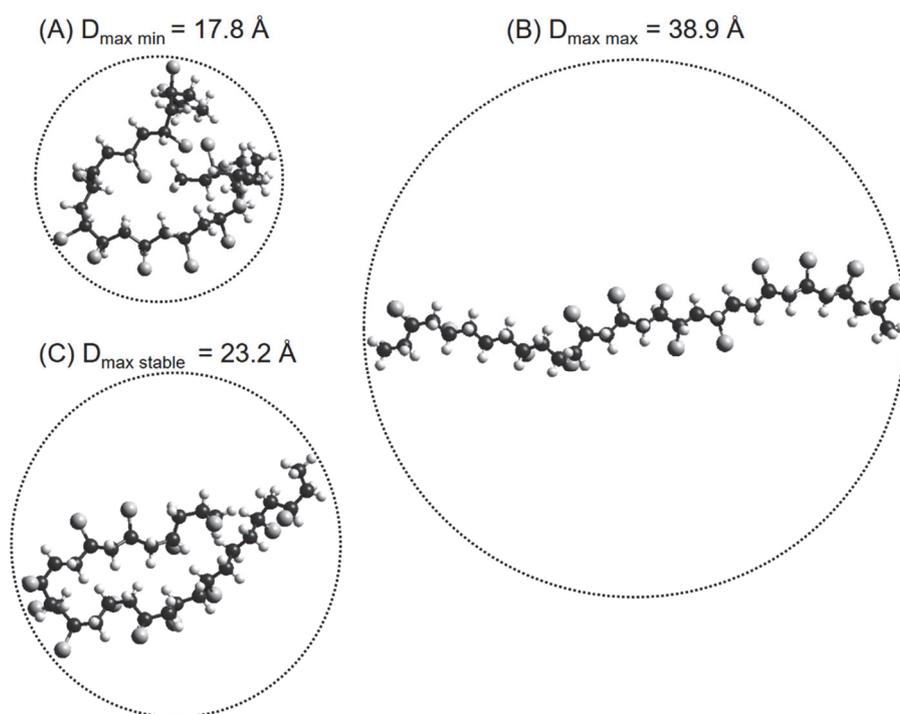


図2-2. ID33 ( $C_{30}H_{49}Cl_{13}$ ) の真空中での局所安定構造とその $D_{max}$ 値の一例

真空中での局所安定構造群の計算では、ChemDraw で任意に作成した初期三次元構造を HyperChem で解析し、最大 500 万個の三次元構造を生成し、それぞれを最適化した。この 500 万個という構造数がポテンシャルエネルギー面上を網羅的にカバーするのに十分な数であるかどうかを検証するために、特に自由度の高い分子を用いて再現性の評価を行った。具体的には、69 種の評価化合物中で分子内の二面角数が 14 以上のポリクロロアルカン（すなわち ID29 から ID33）を用い、それぞれの化合物について  $D_{\max}$  値がそれぞれ 3 Å 以上異なる 5 つの初期構造を人為的に作成後、HyperChem により「全局所安定構造」を計算し、 $D_{\max\text{ aver}}$  を算出した結果を表 2-2 に示す。

表 2-2. 異なる 5 構造から真空中の  $D_{\max\text{ aver}}$  を計算した時の変動結果

化合物 ID	構造式	二面角の数	全局所安定構造数	最安定構造のエネルギー (kcal/mol)	$D_{\max\text{ aver}}$ 値 (Å)
ID29	$C_{22}H_{37}Cl_9$	27	648 ~ 659	32.2 ~ 32.3	$21.77 \pm 0.02$
ID30	$C_{24}H_{40}Cl_{10}$	30	657 ~ 666	37.5 ~ 37.8	$23.40 \pm 0.03$
ID31	$C_{26}H_{43}Cl_{11}$	33	660 ~ 674	39.9 ~ 40.1	$23.63 \pm 0.02$
ID32	$C_{28}H_{46}Cl_{12}$	36	661 ~ 672	36.2 ~ 36.3	$24.87 \pm 0.04$
ID33	$C_{30}H_{49}Cl_{13}$	39	698 ~ 717	50.3 ~ 50.6	$26.35 \pm 0.02$

全局所安定構造数は、各入力構造におけるポテンシャルエネルギー面の形状や収束条件によってその幅が異なるが、最安定構造のエネルギーと  $D_{\max\text{ aver}}$  の差は、いずれの化合物についても 0.3 kcal/mol および  $\pm 0.04$  Å 以内に収まっていた。この結果から、二面角が 14 個以上の自由度の高い化合物であっても、500 万個の三次元構造を生成すれば、得られた  $D_{\max\text{ aver}}$  の値は初期入力構造に依存しないことが示された。これは、本計算手法に則れば、初期構造に依存せず、かつ煩雑なパラメータの設定なしに同等の結果を得ることが可能であることを意味する。

本研究で採用した真空中での  $D_{\max\text{ aver}}$  の計算手法の再現性が高いことが確認できたため、UK Environmental Agency の報告書に記載された 69 種の化合物について、本手法と OASIS の計算結果との比較を行った。図 2-3 にその結果を示す。図 2-3A に示すように、「全局所安定構造」から計算した  $D_{\max\text{ aver}}$  と OASIS で算出した  $D_{\max\text{ aver}}$  には良好

な相関性があり、直線回帰式の傾きは 0.992、決定係数 ( $R^2$ ) は 0.985 であった。ただし、化合物によってはポテンシャルエネルギー面が緩やかな場合、収束閾値 (すなわち 0.01 kcal/Å mol) を満たす範囲で複数の類似安定構造が算出される可能性がある。これらの類似局所安定構造が  $D_{\max \text{ aver}}$  の計算に含まれた場合、平均値に過度な重みづけを与えることになる。そこで、このような影響を排除するために、式(2-1)で定義される  $d$  値がある一定値以下の組み合わせの場合、一方の構造を残しもう一方を削除することにし、最終的な「選抜安定構造」の数を調整した。図 2-3B,C,D は、「選抜安定構造」の数が 30、100、および 200 の場合の本手法の  $D_{\max \text{ aver}}$  値と、OASIS の値を比較したものである。図 2-3C で示す「選抜安定構造」の数が 100 の場合、OASIS の  $D_{\max \text{ aver}}$  値と最も高い一致性を示し、直線回帰式の傾きは 0.996、決定係数( $R^2$ )は 0.996 であった。一方、「選抜安定構造」の数を 200 にした場合、100 の時よりも OASIS との一致性が低下した (図 2-3D)。これは、構造館の類似性の基準が甘すぎて、類似構造の除去が効率的に行えなかったためと考えられる。一方、「選抜安定構造」の数を 50 以下に減らした場合 (図 2-3B)にはより極端な最大数 30 個の事例を示した)、主要な構造まで除外されてしまい OASIS との一致度が低下したと考えられる。最も一致性の高い 100 個の安定構造から算出した  $D_{\max \text{ aver}}$  と OASIS で算出した  $D_{\max \text{ aver}}$  の差は、69 物質全て  $\pm 0.60$  Å 以内に対し、「全局所安定構造」を考慮した  $D_{\max \text{ aver}}$  の差は  $\pm 1.17$ Å 以内と大きかった。これらの結果を踏まえ、以後の検討では各化学物質の選抜安定構造の最大数は 100 個に設定することとした。

以上の検討で、これまで OASIS でしか計算できなかった特殊なパラメータである  $D_{\max \text{ aver}}$  を、別の手法で再現できることが確認された。本手法においては、全ての計算入力値が明確に定義されており、化学物質の初期コンフォーメーションにも影響されない再現性の高い計算結果が得られている。このように特別な専門知識がなくとも、OASIS と同等の計算を再現性高く実施可能な手法は、分子サイズによる濃縮性評価の議論を容易かつ一般化でき、有用であると考えられる。

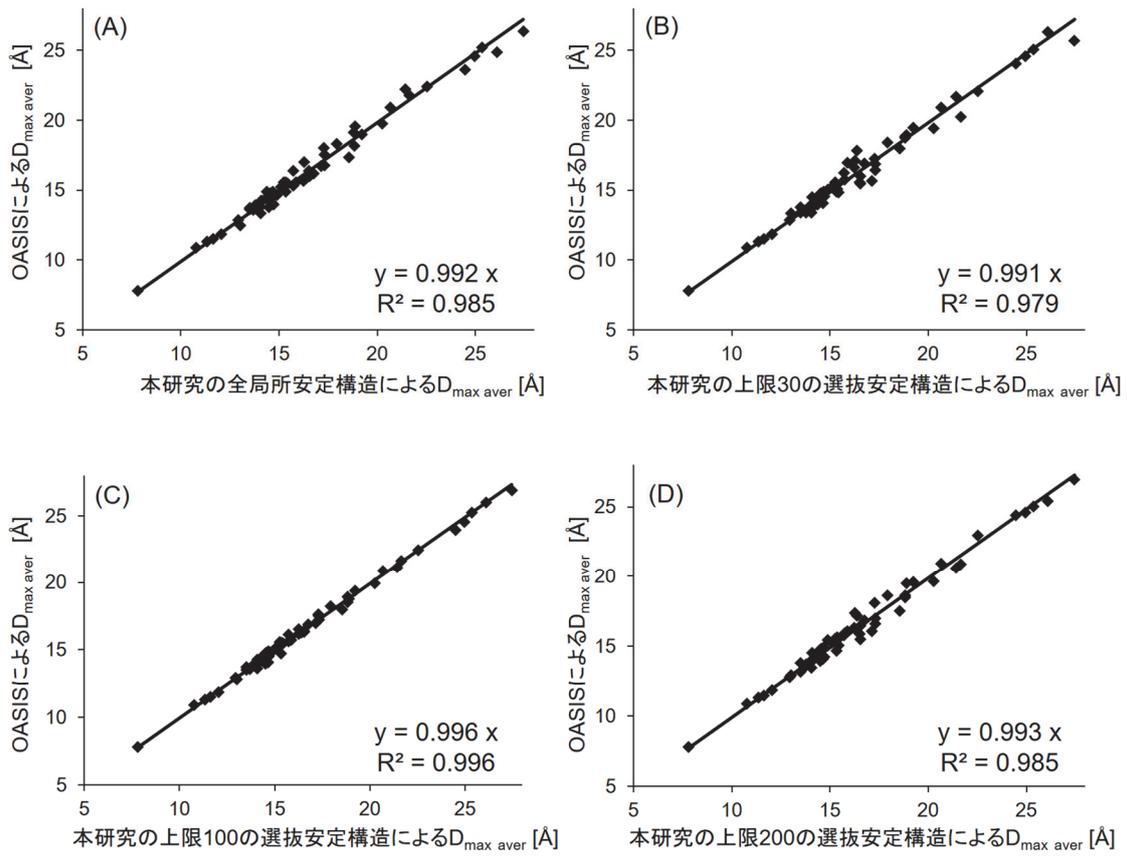


図 2-3. 本研究で計算した真空中  $D_{\max \text{ aver}}$  と OASIS の  $D_{\max \text{ aver}}$  の比較

### 2.3.2 水中での分子サイズ計算結果

水中で存在する分子サイズの概要を把握するには、十分長い時間の MD シミュレーションを実施して対象化合物が水中で取り得る形状を数多く発生させることが重要である。そこで、真空中での計算に用いた化合物のうち自由度の高いポリクロロアルカン ID33 ( $C_{30}H_{49}Cl_{13}$ ) を用いてシミュレーションを行い、 $D_{max}$  の変動を確認した。具体的には、化合物 ID33 について、7 種類の異なる三次元初期構造 (A~G) を CHEM3D でランダムに作成した。この初期構造 A~G の  $D_{max}$  値はそれぞれ 32.1、28.2、25.0、25.8、30.3、23.2、35.3 Å であった。この初期構造の中で、構造 F は化合物 ID33 の取り得る最も分子サイズの小さい、構造 G は最も分子サイズの大きい三次元構造に近い形とした。各初期構造の水中 MD シミュレーションは、10 ps から 2000 ps まで実施した。 $D_{max}$  計算に用いる構造座標は、原則として 1 ps 毎にサンプリングしたが、10 ps の場合のみ構造数を増やすために 0.1 ps 毎にサンプリングした。図 2-4 に、これら 7 種類の初期構造について、10、100、200、500、2000 ps のシミュレーション時間後の  $D_{max}$  の平均値 (■) と最大最小範囲 (縦棒) を示す。

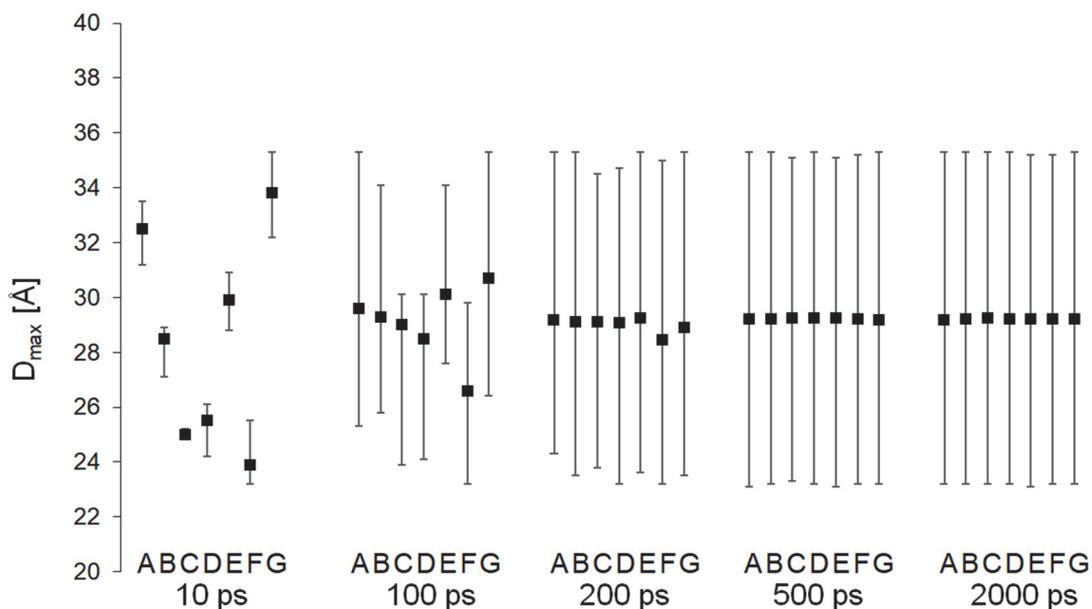


図 2-4. 異なる初期構造 (A~G) を用いて MD 計算時間を延長した時の  $D_{max}$  値の変動

10 ps シミュレーションにおける  $D_{\max}$  の最小値 ( $D_{\max \min}$ ) は 23.2 Å (構造 F) から 32.2 Å (構造 G) で、その差は 9.0 Å であった。一方、 $D_{\max}$  の最大値 ( $D_{\max \max}$ ) は 25.2 Å (構造 C) から 35.3 Å (構造 G) で、その差は 10.1 Å であった。これらの結果から、10 ps のシミュレーションでは  $D_{\max \min}$ 、 $D_{\max \max}$  とともに初期構造の影響を強く受け、ID33 のような自由度の高い化合物の構造変化を網羅するには不十分であった。シミュレーション時間を 10 ps から延長すると、次第に 7 種類の初期構造間の  $D_{\max \min}$  や  $D_{\max \max}$  のばらつきが小さくなり、500 ps 以上で 7 種類の構造のうちどの 2 つの構造を比較しても  $D_{\max \min}$  や  $D_{\max \max}$  の差は 0.1 Å 以下になった。これ以上シミュレーション時間を延長してもその差に大きな変化はみられなかった。加えて、これら 7 つの構造間の  $D_{\max \min}$ 、 $D_{\max \max}$ 、 $D_{\max \text{aver}}$  の標準偏差は、10ps シミュレーションではそれぞれ 3.50 Å、4.03 Å、3.84 Å であったが、500 ps シミュレーションでは 0.07 Å、0.09 Å、0.03 Å に減少した。他の数種類の自由度の高い化合物についても同様の検討を行ったところ、ID33 よりも短いシミュレーション時間で  $D_{\max \min}$  や  $D_{\max \max}$  が収束した。そこで、以後の検討では、計算コストと  $D_{\max}$  の再現性の両方を考慮して、シミュレーション時間を 500 ps に設定した。

### 2.3.3. 真空中と水中での $D_{\max}$ 値の比較

2.3.1 節で真空中での計算に用いた 69 物質について、水中での  $D_{\max}$  値を計算し、真空中での値との比較を行った。図 2-5 にその結果を示す。図 2-5 A は  $D_{\max}$  の最大値 ( $D_{\max \max}$ )、B は  $D_{\max}$  の最小値 ( $D_{\max \min}$ )、C は  $D_{\max}$  の平均値 ( $D_{\max \text{aver}}$ ) の比較図であり、真空中と水中の値の相関性が比較しやすいように傾き 1 の直線を加筆した。69 化合物のうち、ポリクロロアルカン類は白丸で、色素化合物である ID D2, D3 は白四角で、その他は黒丸で示した。図 2-5A の結果から、 $D_{\max \max}$  については真空中と水中での一致性が高いのに対し、図 2-5B の  $D_{\max \min}$  の結果から、特に自由度の高いポリクロロアルカン類 (白丸) においては、水中での  $D_{\max \min}$  は真空中よりも 1.8~6.5 Å 大きくなる傾向が認められた。この原因としては、これらの直鎖型化合物が真空中では非常にコンパクトな構造をとることができる一方で、水中では水分子との相互作用により、真空中で安定に存在できたコンパクトな折りたたみ構造をとることができないためと考えられた。

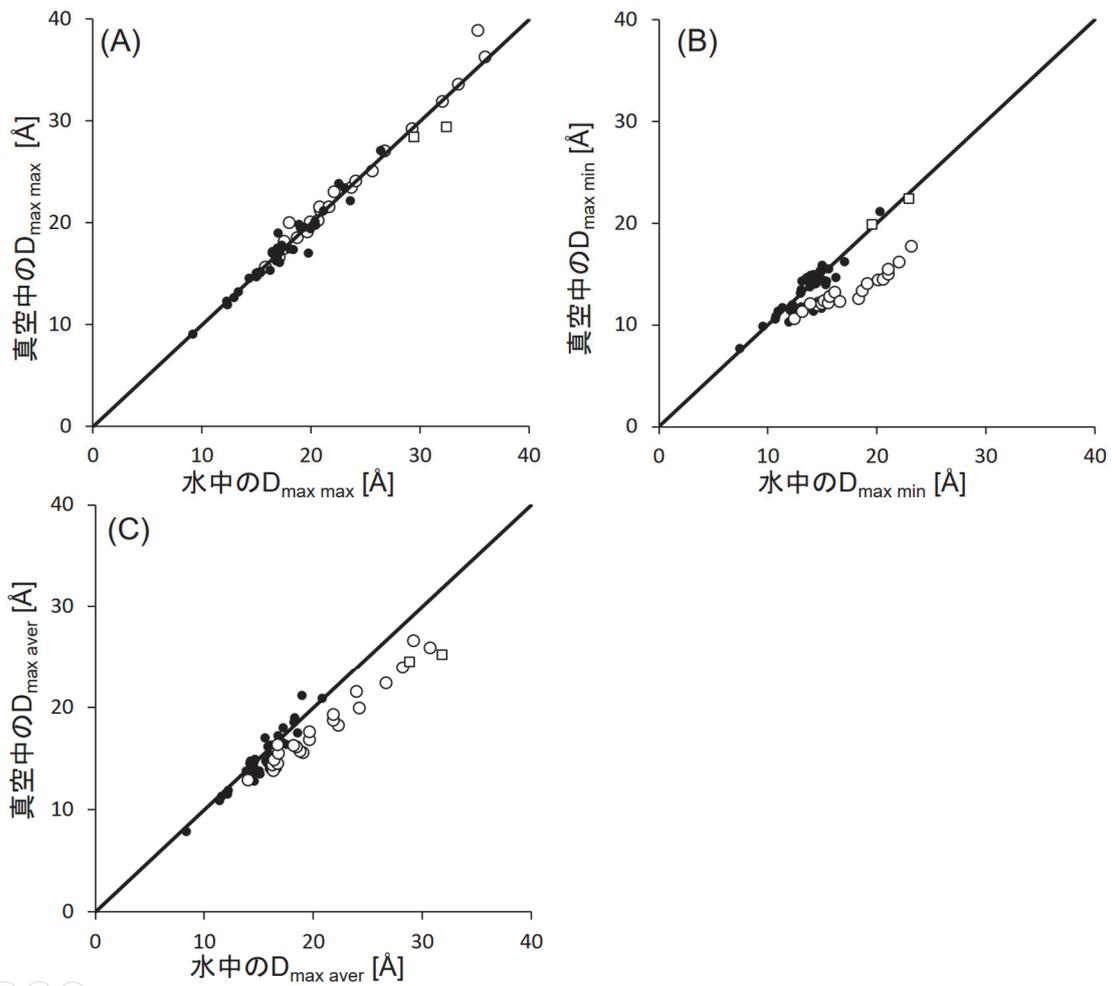


図 2-5. 69 物質の真空中と水中の  $D_{\max}$  値の比較

このように、真空中で取り得る安定構造が水中では存在しない場合があり、最終的に全構造をから算出される平均値、すなわち  $D_{\max \text{ aver}}$  についても、図 2-5 C で示すように真空中と水中での値の一致性は高くなかった。同様に、比較的大きな 700 前後の分子量を有する 2 種類の色素化合物 ID D2 と D3 (図 2-5 の白四角。構造は表 2-1 を参照) においても、真空中と水中における  $D_{\max \text{ aver}}$  に違いが見られた。一般的に、かさ高い物質の  $D_{\max \text{ aver}}$  は、水中の方が真空中よりも大きい傾向が認められる。これら真空中と水中での分子の三次元構造の計算結果は異なっていることから、水中での MD シミュレーションの導入により、より正確に実環境中での分子サイズパラメータを算出できる可能性が高いことが示された。

#### 2.3.4. 水中での $D_{\max}$ 計算値を用いた新たな濃縮性評価指標の提案

Mekenyan らは真空中における最安定構造から +20 kcal/mol 以内に存在する全局所安定構造を算出し、これらの  $D_{\max}$  平均値である 17.4 Å を上回った場合、鰓膜を介した取り込みが制限され、低濃縮性と評価可能と提案している<sup>15,36)</sup>。この基準は真空中での分子構造計算に基づいているが、本研究では MD シミュレーションによって水中の分子が取り得る構造を再現性よく算出する方法を確立したため、新たに水中分子サイズに基づいた低濃縮性の基準値の解析を試みた。

図 2-6 に、2.2.4.節に記載した 1665 物質について、BCF 実測値と水中での  $D_{\max \text{ aver}}$  計算値をプロットした結果を示す。なお、1665 物質のうち、既に化審法で採用されている低濃縮性の分子量基準 (分子量 > 800) を満たし、生物濃縮性試験が免除となる 116 物質は白三角で示した。解析対象の 1665 物質のうち、 $D_{\max \text{ aver}}$  が 17.1 Å を超える 446 物質はその全てが低濃縮性 (BCF < 5000) であった。この値は欧州 REACH 規制で低濃縮性の証拠の一つとして採用されている基準値である (真空中での)  $D_{\max \text{ aver}} > 17.4 \text{ Å}$  と近似していた<sup>15)</sup>。Mekenyan らが算出した真空中での  $D_{\max \text{ aver}}$  が水中で取りうる  $D_{\max \text{ aver}}$  と近似していたということは、間接的に Mekenyan らの仮定である「真空中で算出した最安定構造から +20 kcal/mol 以内のポテンシャルエネルギーを有する局所安定構造の平均値」が「水中でとりうる局所安定構造の平均値を再現できる」事を確認したと言える。また、化審法では分子量が 800 を超える化学物質は低濃縮性であり、魚を用いた生物濃縮度試験を行う必要がないとされている<sup>28,34)</sup>。

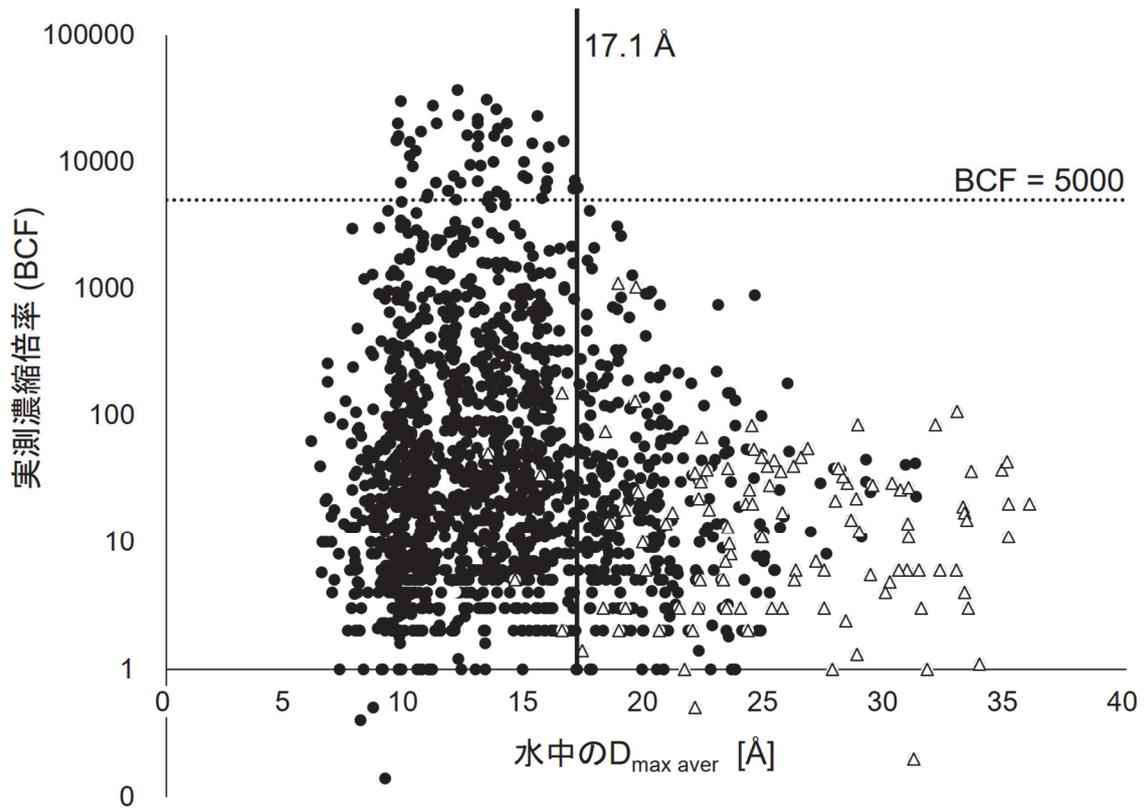


図 2-6. 1665 物質の水中の  $D_{\max\text{ aver}}$  値と実測 BCF 値との関係

今回評価対象とした 1665 物質にこの基準を適用すると、図 2-6 の白三角で示す 116 物質が生物試験免除となる。これに対し、 $D_{\max \text{ aver}} > 17.1 \text{ \AA}$  を新たな低濃縮性指標とした場合、1665 物質のうち 446 物質が該当し、分子量の基準より多くの物質が低濃縮と判定できることになる。このような該当化合物の拡大のみならず、科学的な観点からも、分子の大きさを指標として生体膜の透過性を議論する際は、分子量よりも水中で取りうる三次元構造を考慮する方がより適切と考えられる。従って、今回新たに解析した  $D_{\max \text{ aver}} > 17.1 \text{ \AA}$  は動物試験削減に貢献できるより合理的な基準と考える。

水中で取りうる全三次元構造の平均値  $D_{\max \text{ aver}}$  に加えて、全三次元構造の最小値  $D_{\max \text{ min}}$  についても同様の解析を行った。図 2-7 にその結果を示す。1665 物質のうち  $\text{BCF} \geq 5000$  を示す物質の  $D_{\max \text{ min}}$  の最大値は  $15.6 \text{ \AA}$  であった。この  $D_{\max \text{ min}}$  の閾値で低濃縮性とみなすことができる化学物質の数は 357 であり、ここでも分子量のみで低濃縮性と評価可能な化合物数 (116 物質) を大きく上回った。ただし、 $D_{\max \text{ min}}$  を用いて低濃縮性と評価可能な物質数 (357 物質) は  $D_{\max \text{ aver}}$  の閾値による数 (446 物質) よりも少なく、 $D_{\max \text{ aver}}$  に比べると  $D_{\max \text{ min}}$  の閾値の方がより保守的な評価基準であるといえる。

本研究では、低濃縮性を評価可能な 2 種類の新たな分子サイズ閾値として、 $D_{\max \text{ aver}} > 17.1 \text{ \AA}$  と  $D_{\max \text{ min}} > 15.6 \text{ \AA}$  を示した。これらの値は、水中における現実的な分子サイズに基づいて決定されているため、真空中での分子サイズから推定された従来の閾値よりも信頼性が高いと考えられる。 $D_{\max \text{ aver}}$  と  $D_{\max \text{ min}}$  のいずれの指標を採用すべきかは、評価者の目的に依存する。 $D_{\max \text{ aver}}$  の閾値は、水中に存在しうる多くの立体構造の平均値で決定されており、この総合的な値が分子構造の全体像を把握するのに妥当と考えるのが基本であろう。しかし、一方で、 $D_{\max \text{ min}}$  は、より鰓膜の透過と密接に関連するコンパクトな立体構造を反映しているとも考えられる。最もコンパクトな構造でさえ膜透過ができない場合、その他の全ての構造はより透過を制限されると考えられるため、保守的な評価を行うことが可能となる。実際に低濃縮性と判定可能な化合物数は  $D_{\max \text{ aver}}$  に比べて  $D_{\max \text{ min}}$  の方が少ないことは、この考え方を裏付けている。新規化合物の濃縮ポテンシャルをスクリーニング的に評価するにあたっては、より多くの化合物を低濃縮性と判定可能な  $D_{\max \text{ aver}}$  が効率的である。一方で、このような判定基準を規制に導入する際には安全側のマージンが必要と考えられるため、 $D_{\max \text{ min}} > 15.6 \text{ \AA}$  がより適切な評価基準となる場合もある。いずれにせよ、本検討において水中の立体構造から設定された新しい 2 種の閾値は、実環境を反映したより信頼性の高い濃縮性評価を実現でき、従来の分子量基準に比べて動物実験の削減に貢献可能と考える。

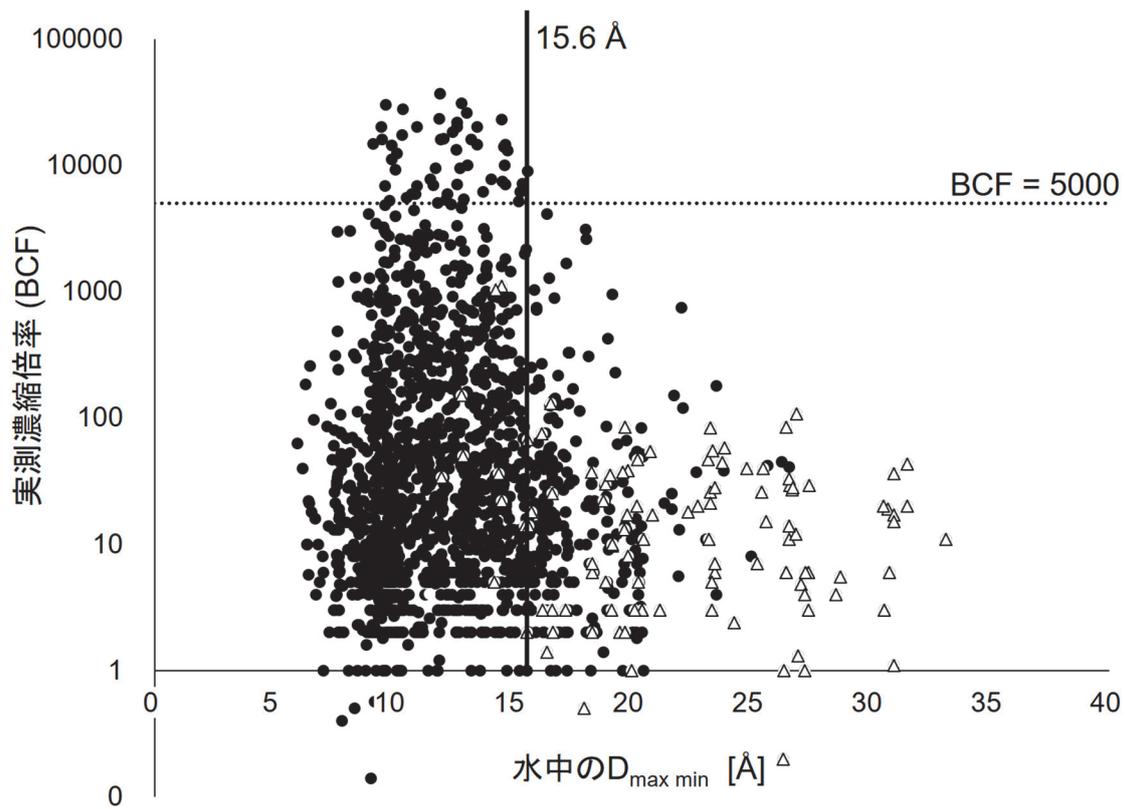


図 2-7. 1665 物質の水中の  $D_{\max \min}$  値と実測 BCF 値との関係

## 2.4 結論

水環境中で生物濃縮性が低い化合物をスクリーニング的に評価するため、化学物質の水中での立体構造を MD シミュレーションで計算して  $D_{\max}$  値を求めた。その結果、水中の立体構造から得られた  $D_{\max \text{ aver}}$  の閾値は ( $D_{\max \text{ aver}} > 17.1 \text{ \AA}$ )、真空中の最安定構造から +20 kcal/mol 以内の立体構造から得られた閾値 ( $D_{\max \text{ aver}} > 17.4 \text{ \AA}$ ) と同程度であった。しかし、真空中の立体構造から算出された  $D_{\max}$  値のいくつかは水中では再現されず、水中の立体構造の方が大きいことから、真空中よりも水中の立体構造から水環境中の生物濃縮性を評価する方が適切と考えられた。また、この  $D_{\max}$  値は従来の分子量による評価よりも分子のかさ高さを正確に表現できていることから、化審法下における動物実験数の削減に貢献すると考えられる。さらに、水中の立体構造から求めた 2 つの閾値のうち、 $D_{\max \text{ aver}} > 17.1 \text{ \AA}$  よりも  $D_{\max \text{ min}} > 15.6 \text{ \AA}$  の方が、低濃縮と判定される化合物数が少なく、未知の化合物を保守的に評価する際はより安全側の  $D_{\max \text{ min}} > 15.6 \text{ \AA}$  が適切な評価基準であると考えられた。

## 第3章 腸管膜経由の濃縮性と分子サイズの関係

### 3.1 緒言

第2章では、化学物質の水中での分子サイズを計算することにより、鰓を介して魚に取り込まれる化学物質の濃縮ポテンシャルを評価する方法について検討した。水暴露による濃縮度試験<sup>10,11)</sup>では、特に難水溶性物質の水中溶存濃度を定量することが困難であるため、従来は Tween 80 や HCO-40 をはじめとする分散剤を用いて水溶解度以上の暴露濃度で試験を実施してきた。しかし、化合物に吸着した分散剤により bioavailability が低下し、水中から魚体内への化合物の取込が阻害される可能性が指摘されたため<sup>56,57)</sup>、現在の水暴露法では分散剤は極力使用せず、水溶解度未満の濃度での暴露が必須となっている。このため、難水溶性物質について水暴露法の実施が困難なケースが顕在化してきた。この課題を解決するため、魚の濃縮度試験に関するガイドライン (OECD TG 305) が 2012 年に改訂され、aqueous exposure test (水暴露法) に dietary exposure test (餌暴露法) が追加された<sup>10)</sup>。この新たに追加された生物試験では、化合物を含む餌料を魚に一定期間暴露し、定常状態到達時の魚体内の濃度と餌料中の濃度との比を BMF (Biomagnification Factor) として算出する。従来の水暴露法においては、水中を介して化学物質が水生生物に取り込まれる過程が重視されてきたが、餌暴露法では環境中の食物連鎖網を想定し、餌から消化器官を介して水生生物や陸生生物に取り込まれる過程を評価可能である。この新試験は国内リングテストや検討委員会を経て化審法でも 2018 年に正式採用された<sup>11)</sup>。なお、水暴露法に対しては、かさ高い分子は鰓を透過できないという観点にもとづき<sup>17-18,32-33)</sup>、例えば化審法では、分子量が 800 を超える化学物質は生物試験の実施なしに低濃縮性と判定可能である<sup>8,34)</sup>。また、第2章での検討では、水中での MD シミュレーションを行い  $D_{\max \min} > 15.6 \text{ \AA}$  または  $D_{\max \text{ aver}} > 17.1 \text{ \AA}$  の化学物質は生物濃縮性が低いとする新たな閾値を提案した<sup>58)</sup>。このような生体膜の透過性制限にもとづいた濃縮性評価は、水暴露法で想定されている鰓のみならず、餌暴露法で想定している腸管膜にも適用できる可能性がある。しかしながら、餌暴露法が実施可能な試験ラボが少ないことおよび採用されてからの期間も短いこともあり、これ

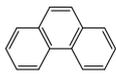
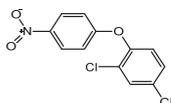
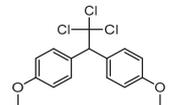
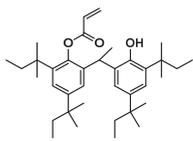
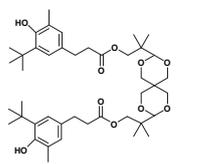
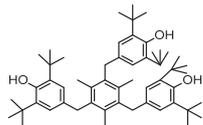
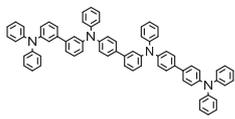
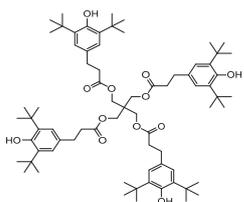
までに実施された GLP 試験数は限定されている。そのため、餌暴露法による化学物質の濃縮性の知見は十分ではなく、鰓膜のように生物濃縮度試験による実測データを活用した分子サイズ閾値の解析は不可能である。また、この餌暴露法では、強い魚が餌を独占し、弱い魚がほとんど摂取できないこと等が原因で、水槽中の各魚の暴露量を一定にコントロールすることが困難となり、水暴露法に比べて精度の高い結果を得るのが難しい<sup>59)</sup>。そこで、本検討では、腸管内に存在する化合物が膜を通過して生物体内に吸収される過程を直接的に評価することを目的に、*in vitro* 反転腸管法を採用した検討を実施した<sup>13)</sup>。反転腸管法は、生物の腸管を摘出し、その裏表を反転させて化合物を含む緩衝液に浸し、腸管内側に透過した化合物量を測定することにより、化学物質の膜透過性を評価する手法である。この手法は既にラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ニワトリ、カメ、ブタ、カエルなどの生物に適用されているが<sup>60-64)</sup>、魚類での実施例はほとんど報告されていない<sup>65,66)</sup>。なお、本研究では、化学物質が腸管膜を透過するかどうかの評価を目的としているため、緩衝液中に過剰量の化合物を存在させた条件下で、腸管膜透過性を定量化する試験設計とした。暴露時には他媒体への化合物の吸着による bioavailability 低下を避けるため、水暴露法で使用しているような分散剤や餌暴露法で投与媒体として使用する魚の餌は系内には添加しなかった。一方、生体膜透過性の評価手法としては、反転腸管法他に、縦または横型のガラスセルを使用した拡散セル法も存在する<sup>67,68)</sup>。しかしながら、拡散セル法では暴露可能な膜表面積が小さく、疎水性化合物の微量定量が困難であると考えられた。そこで、本検討では、分子量や分子サイズが異なる 9 種類の試験化合物を選定し、化審法濃縮度試験の標準魚であるコイの腸管膜透過性の評価を試みた。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 試験化合物

本検討で使用した 9 種類の化合物を表 3-1 に示す。試験化合物の BMF 値は、化審法濃縮度試験ガイドラインから引用した<sup>11)</sup>。これらの化合物は、能動的取込やたんぱく質が関与する特殊な取込過程が報告されている、アミノ酸<sup>51,52)</sup>、パーフルオロアルカン<sup>53-55)</sup>、金属化合物<sup>69,70)</sup>ではなく、アルコール、エステル、アミド等を含む芳香族炭化水素類であり、一般的な受動拡散で生物に取り込まれると想定される<sup>51,52)</sup>。

表 3-1. 試験に供した化合物の濃縮性に係る情報

試験化合物					
No.	名称 (CAS No.)	構造	分子量	logKow	実測濃縮倍率
1	Phenanthrene (85-01-8)		178	4.46 <sup>a)</sup>	BCF = 1865 <sup>b)</sup>
2	<i>o</i> -Terphenyl (84-15-1)		230	5.52 <sup>a)</sup>	BCF = 1400 <sup>72)</sup> BMF <sup>c)</sup> = 0.0912 <sup>11)</sup>
3	Nitrofen (1836-75-5)		284	4.64 <sup>a)</sup>	BCF = 3400 <sup>72)</sup> BMF <sup>c)</sup> = 0.179 <sup>11)</sup>
4	Methoxychlor (72-43-5)		345	5.08 <sup>a)</sup>	BCF = 620 <sup>72)</sup> BMF <sup>c)</sup> = 0.0340 <sup>11)</sup>
5	Sumilizer GS (123968-25-2)		548	12.4 <sup>b)</sup>	BCF < 78 <sup>72)</sup>
6	Sumilizer GA-80 (90498-90-1)		741	10.5 <sup>b)</sup>	BCF < 6.6 <sup>72)</sup>
7	Irganox 1330 (1709-70-2)		775	17.2 <sup>b)</sup>	BCF = 6.81 <sup>b)</sup>
8	<i>N,N'</i> -diphenyl- <i>N,N'</i> -bis[4'-(diphenylamino)biphenyl-4-yl]benzidine (167218-46-4)		975	19.5 <sup>b)</sup>	BCF = 3.16 <sup>b)</sup>
9	Pentaerythritol tetrakis[3-(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxyphenyl)propionate] (6683-19-8)		1178	11.5 <sup>b)</sup>	BCF = 26.4 <sup>b)</sup>

a) EPI Suite<sup>TM</sup> ver. 4.11 のデータベースから入手した実測値

b) EPI Suite<sup>TM</sup> ver. 4.11 による推定値 c) 脂質および成長補正後の実測値

これらの化合物の BCF 値は独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) が開発した化学物質総合情報提供システム (Chemical Risk Information Platform; CHRIP) の公開値から引用した<sup>71)</sup>。また、BCF の実測値が得られない場合は、EPI Suite ver. 4.1.1 による予測値を記載した。

試験化合物のうち、フェナントレン(1)とニトロフェン(3)は富士フィルム和光純薬から、*o*-terphenyl (2)と irganox 1330 (7)は Sigma-Aldrich から、メトキシクロル(4)、*N,N'*-diphenyl-*N,N'*-bis[4'-(diphenylamino)biphenyl-4-yl]benzidine (8)、pentaerythritol tetrakis[3-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate] (9)は東京化成工業から購入した。Sumilizer GS (5) および sumilizer GA-80 (6) は、住友化学から入手した。PBS (Phosphate Buffered Salts) Tablets (pH7.4) は、タカラバイオから購入した。分析に使用した蒸留水 (高速液体クロマトグラフ用)、ギ酸 (試薬特級)、アセトニトリル (高速液体クロマトグラフ用)、テトラヒドロフラン (THF、安定剤不含、試薬特級)、*n*-ヘキサン (試薬特級)、酢酸アンモニウム (試薬一級) は、富士フィルム和光純薬から購入した。

### 3.2.2 反転腸管法

北村養鯉場 (熊本県八代市) から購入したコイ (学名: *Cyprinus carpio*) は、23°C の脱塩素水道水中で 1 週間以上馴化した。適切な大きさのコイ (体重: 300~500 g、体長: 27~32 cm) を氷水中で安楽死させた後、摘出した腸管の胃側約 5 cm、肛門側約 1 cm を切除し、長さ 24~39 cm の腸管を得た。腸管の内外は PBS タブレットを用いて調製したリン酸緩衝液 (pH7.4) で軽く洗浄した後、腸管の肛門側をポリエチレンチューブ (長さ約 15 cm、外径 4 mm) にテフロン糸で結紮した。腸管を傷つけないよう、図 3-1 (A) に示すようにポリエチレンチューブをゆっくりと胃側に押し込み、腸管の内外を反転させた。腸管を完全に反転した後、テフロン糸でポリエチレンチューブに固定していた部分をハサミで切除し、腸管からチューブを外した。最後に、腸管の全長を 20 cm から 25 cm となるよう切断し、腸管の両端をテフロン糸で長さ 10 cm、外径 4 mm のプラスチックストローに固定した。腸管を固定した 2 本のプラスチックストローを 1 L 容のトールビーカーの縁にクリップで固定してトールビーカー内に腸管を U 字型につるし (図 3-1(B))、PBS タブレットを蒸留水に溶解させて調製した pH 7.4 のリン酸緩衝液をピペットで腸管の内側が満たされるまで (数 mL) 注入した (以後、「内液」)。

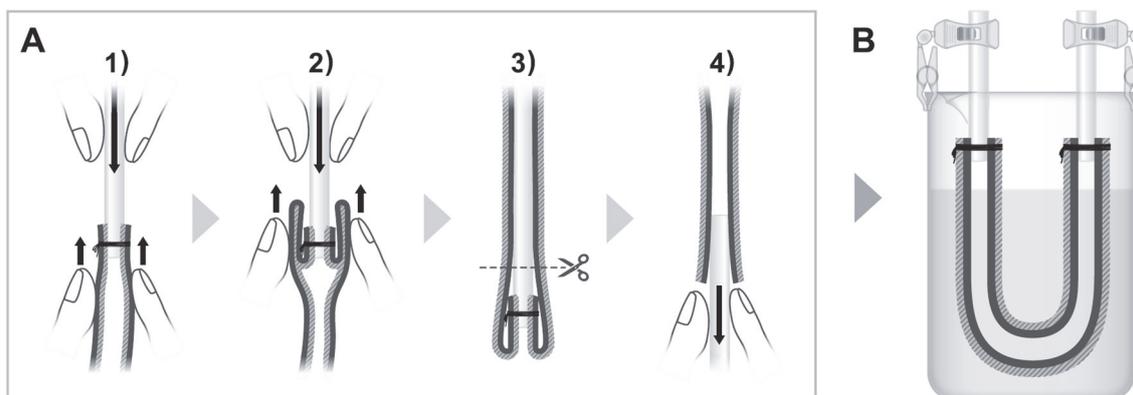


図 3-1. 腸の反転方法 (A) と、反転腸を用いた化学物質の暴露方法 (B)

腸管をつるしたトールビーカー内には、試験化合物を含むリン酸緩衝液 500 mL を加えた (以後、「外液」)。化合物の濃度は、1 の場合 500 mg/L、2~9 の場合 100 mg/L とした。化合物の水溶解度 (表 3-1) は全て設定濃度以下であり、外液中には未溶解の画分が過剰に存在していたことから、外液中の水溶解度は飽和状態で維持されていたと考えられる。このビーカーを 23°C の恒温槽に入れ、マグネチックスターラーを用いて 150 rpm で緩やかに攪拌した。24 時間後に内液と外液をそれぞれ回収し、化合物濃度を測定した。なお、本試験に先立って、各化合物について予備検討を 1 連で実施し、内液から化合物が検出されなかった場合は  $n=2$  で、検出された場合は  $n=4$  で本試験を実施した。

### 3.2.3 試験化合物の前処理法

外液中の試験化合物の分析のため以下の前処理を行った。1 は、外液 2 mL を採取し、アセトニトリルにて 5 mL に定容した。この混合溶液 1 mL をフィルター付きエッペンチューブ (ミリポア・メルク社製、Ultrafree-MC、HV、 $0.45\mu\text{m}$ ) の上部に入れ、遠心機 (エッペンドルフ製、MiniSpin) にて軽く遠心してフィルターを透過させた。このエッペンチューブからフィルター部分を取り除き、さらに 5000 rpm で 1 分間遠心し、上澄みを HPLC-蛍光分析に供した。2、3、4 については外液を全量回収し、ビーカーの内壁を 150 mL のメタノールで 3 回洗浄した。外液と洗浄液を 1 L 容のメスフラスコに入れて混合後、メタノールで 1 L に定容した。この混合液を 10 mL 採取し、2 mL の  $n$ -

へキサンにて液-液抽出を2回行った。抽出後の *n*-へキサン層を合わせて *n*-へキサンにて5 mL に定容し、GC-MS 分析に供した。5~9 は外液を全量回収し、ビーカーの内壁を150 mL の THF で3回洗浄し、外液および洗浄液を混合して THF にて1 L に定容し、LC-MS/MS 分析に供した。各化合物の外液からの平均回収率は、97.0% (7) から103% (3) で、最も低い回収率は化合物7における95.7%であった。

内液中の化合物の分析のため以下の前処理を行った。1、5、6 は、回収した内液を秤量後、アセトニトリルにて1.5倍に希釈し、その希釈液約1 mL を13000 rpm で5分間遠心した。上澄み液をHPLC-蛍光分析して1を、LC-MS/MS 分析して5と6を定量した。2~4については、内液を回収して秤量後、*n*-へキサン1 mL を加え、この混合液をメカニカルシェイカー (TAITEC 製、SR-2DW) で10分間振とうした後、3000 rpm で5分間遠心分離した。上澄み液は1 mL の *n*-へキサンで液-液抽出を3回行った。抽出した *n*-へキサンを合わせ5 mL に定容した後、GC-MS 分析に供した。7~9 については、前述と同様の手順でへキサン抽出後、安定化剤としてジエチレングリコールを10  $\mu$ L 添加し、窒素吹付により *n*-へキサンを乾固させ、1 mL の THF に再溶解して LC-MS/MS 分析に供した。各化合物の外液からの平均回収率は、88.7% (7) から96.2% (8) で、最も低い回収率は7における87.3%であった。

腸管に吸着した化合物の分析のため以下の前処理を行った。内液を取り除いた後の腸管の湿重量を測定後、ハサミで1 cm 角に細切り、リン酸緩衝液3 mL を添加して三次元ビーズ衝撃式ホモジナイザー (バイオメディカルサイエンス製、ShakeMaster® NEO) により1500 rpm で6分間ホモジナイズした。このホモジネートに1はアセトニトリル、2~4 はへキサン、5~9 は THF を5 mL 加えて10分間振とうした後、7000 rpm で10分間遠心し溶媒層を回収した。この抽出操作を3回繰り返し、回収した溶媒層を同じ溶媒で20 mL に定容した。1および5~9 は、この溶液約1 mL を分取し、5000 rpm で1分間遠心した。この上澄み液を1はHPLC-蛍光分析、5~9 はLC-MS/MS 分析に供した。2~4 は、1 mL の溶液を固相カートリッジ (GL Sciences 製、InertSep C18 50 mg/1 mL) に通して夾雑物を除去後、*n*-へキサンで5 mL に定容してGC-MS 分析に供した。各化合物の腸管からの平均回収率は、78.7% (7) から95.3% (9) で、最大の標準偏差は7の4.8%であった。

### 3.2.4 試験化合物の分析法

HPLC-蛍光分析は、島津製作所製 LC-10A システムを使用し、表 3-2 に示す条件で実施した。

表 3-2. HPLC-蛍光分析条件 [1]

カラム	L-column ODS (150×4.6 mm, 粒子径 5 μm :化学物質評価研究機構)
カラム温度	40°C
移動相	B conc. in 20%→ (6.7 %/min) →100% (15min) A : 蒸留水 B : アセトニトリル
流速	1.0 mL/min
定量条件	励起光 : 250 nm, 蛍光 : 350 nm
注入量	10 μL

GC-MS 分析は Agilent 製 GC8890 および 5977B GC/MSD システムを用いて、正イオン EI モードで表 3-3 に示す条件で実施した。

表 3-3. GC-MS 分析条件 [2~4]

カラム	J&W HP-5ms キャピラリーカラム (30m×0.25mmID, 膜厚 0.25 μm : Agilent technologies)
カラム温度	50°C→ (12.5°C/min) →300°C
注入口	250°C (スプリットレス)
キャリアガス	ヘリウム, 1 mL/min
定量条件	選択イオンモニタリング (SIM) 230 m/z [2], 283 m/z [3], 227 m/z [4]
注入量	1 μL

LC-MS/MS は、Thermo Fisher Scientific 製四重極 Q-Exactive Focus を用いて、正イオンモードで表 3-4 に示す条件で実施した。

表 3-4. LC-MS/MS 分析条件 [5~9]

カラム	L-column3 ODS (150×2.1 mm, 粒子径 5 μm :化学物質評価研究機構)
カラム温度	40°C
移動相	B conc. in 10%→ (4%/min) →90% (20min) [5 および 6] B conc. in 10%→ (7%/min) →90% (20min) [7~9] A : 5 mM 酢酸アンモニウム含有蒸留水 B : 5 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール/アセトニトリル/THF (1/2/2, v/v/v) 混合液
流速	0.2 mL/min
イオン化部	エレクトロスプレーイオン化法 Source temp. 350°C, Vaporization temp. 300°C Sweep ガス: 0 a.u., Sheath ガス: 40 a.u., Auxiliary ガス :10 a.u. [5 および 6] Sweep ガス: 2 a.u., Sheath ガス: 48 a.u., Auxiliary ガス :10 a.u. [7~9]
定量条件	SIM モード : 974.4 m/z [8] SRM モード : プリカーサーイオン 548.0 m/z, プロダクトイオン 233.2, 287.0, 494.0 m/z (collision energy 30 eV) [5] SRM モード : プリカーサーイオン 739.0 m/z, プロダクトイオン 163.0, 521.1, 563.0 m/z (collision energy 45 eV) [6] SRM モード : プリカーサーイオン 792.6 m/z, プロダクトイオン 569.4, 219.2 m/z (collision energy 31 eV) [7] SRM モード : プリカーサーイオン 1194.8 m/z , プロダクトイオン 788.0, 731.0, 729.1, 219.2 m/z (collision energy 31 eV) [9]
注入量	10 μL

### 3.2.5 水中での分子サイズ計算

水中での分子サイズの計算は、第 2 章に記載した方法で実施した。具体的には、Material Studio 2018 (BIOVIA、USA) を用い、MD シミュレーションを 500 ps の間行い、立体構造を 1 ps 毎にサンプリングした。サンプリングした立体構造を用いて分子サイズ ( $D_{\max}$ ) を計算し、その平均値として  $D_{\max\text{aver}}$  を、最小値として  $D_{\max\text{min}}$  を決定した<sup>58)</sup>。

## 3.3 結果と考察

### 3.3.1 外液および内液中の試験化合物濃度

図 3-2 の棒グラフは、24 時間暴露後の外液中 (黒色) および内液中 (灰色) の各化合物の平均濃度で、複数連 (1~4 および 9 は  $n=4$ 、5~8 は  $n=2$ ) から算出した標準偏差をエラーバー (黒線) で表示した。1~4 の外液中の濃度  $122 \pm 5.8$ 、 $24.8 \pm 6.2$ 、 $50.4 \pm 5.4$ 、 $57.6 \pm 4.0$  mg/L に対し、内液中の濃度はそれぞれ  $3550 \pm 639$ 、 $305 \pm 120$ 、 $303 \pm 134$ 、 $140 \pm 49$  mg/L と有意に高かった。この増加は、外液中の 1~4 が腸管膜を介して内液に透過後、内液中の生体組織由来の微細な不溶物に吸着したためと考えられる。この不溶物は内液を回収する際に目視で確認でき、内液中の濃度のばらつきの要因になっていると想定されるが、この不要物を除去あるいは均一に制御することは技術的に困難であった。いずれにしても、少なくとも内液中に外液と同程度以上の試験化合物が存在することから、1~4 は比較的容易に腸管膜を透過したことが明らかである。一方、5~9 の外液中の濃度はそれぞれ  $85.8 \pm 4.2$ 、 $25.9 \pm 1.8$ 、 $63.7 \pm 5.1$ 、 $97.7 \pm 1.5$ 、 $75.7 \pm 5.1$  mg/L と十分量が維持されていたのに対し、5~8 の内液中の濃度はいずれも定量下限 (それぞれ 0.06、0.1、0.08、0.1 mg/L) 未満であり、9 は内液中で検出されたものの  $0.3 \pm 0.2$  mg/L と低値を示した。この結果から、1~4 に比べ、5~9 は腸管膜を透過し難いことが確認された。

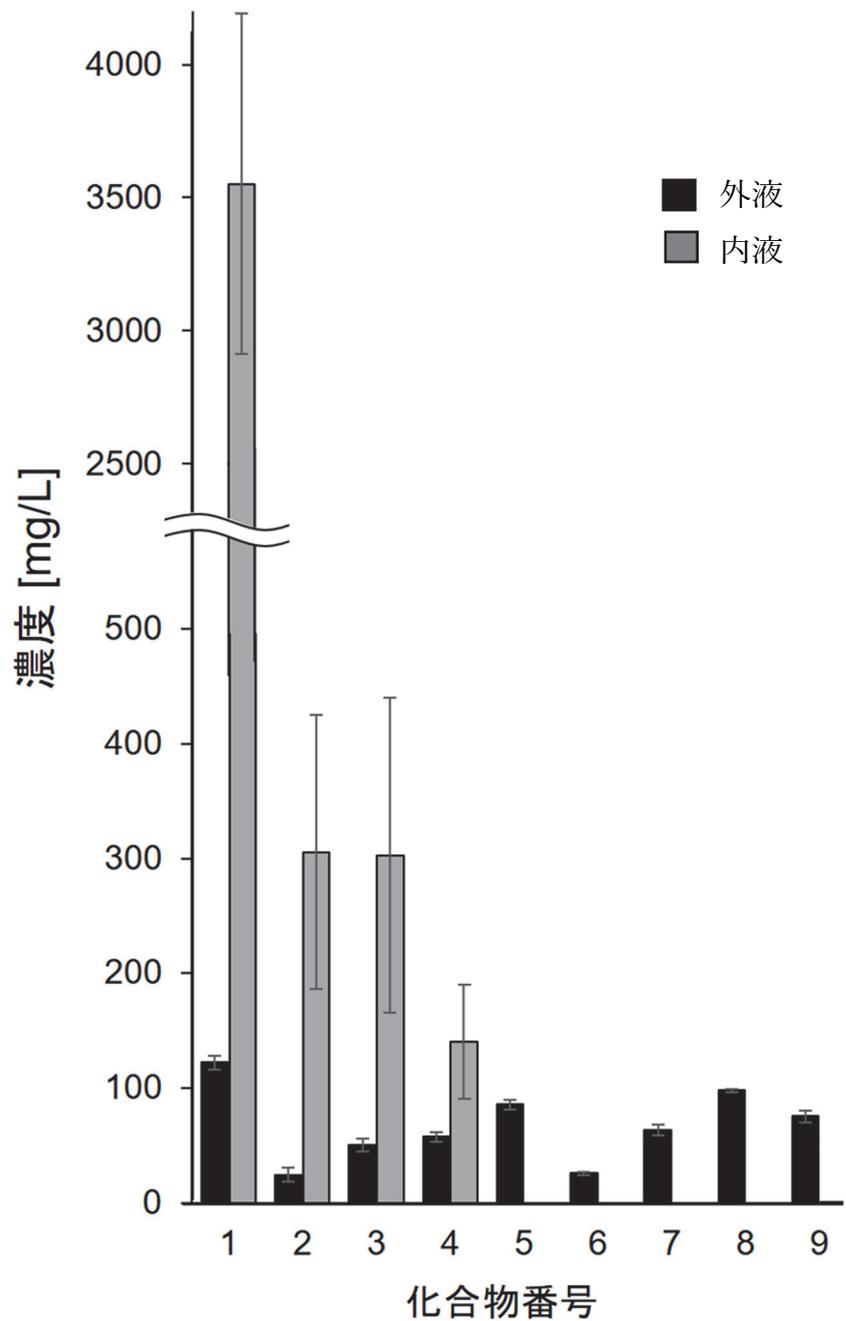


図 3-2. 24 時間暴露後の外液および内液中の試験化合物の濃度

図 3-3 の棒グラフは、実験開始時にビーカー内に添加した化合物量に対して、暴露終了時の外液（黒色）、内液（灰色）および腸管膜（白色）から検出された化合物の割合（%）を示している。高い透過性を示した 1~4 については、腸管からも 21.7~34.3%（図 3-3 の白色部分）と比較的多量に回収され、腸管膜を移行中あるいは腸管膜の表面に吸着したものと考えられる。一方、5~9 は腸管からはほとんど検出されなかった。図 3-3 の各棒の高さは実験終了時の回収率を示しており、47.3%~100%であった。特に、1、2、6 の回収率は 60%以下と低値を示した。魚類における代謝半減期を EPI Suite™ ver.4.1 を用いて推定したところ、1、2、6 の半減期はそれぞれ 2.6、6.4、0.28 日と他の物質（いずれも 10 日以上）に比べて短く、回収率低下の原因は腸管膜に起因する代謝と推察された。

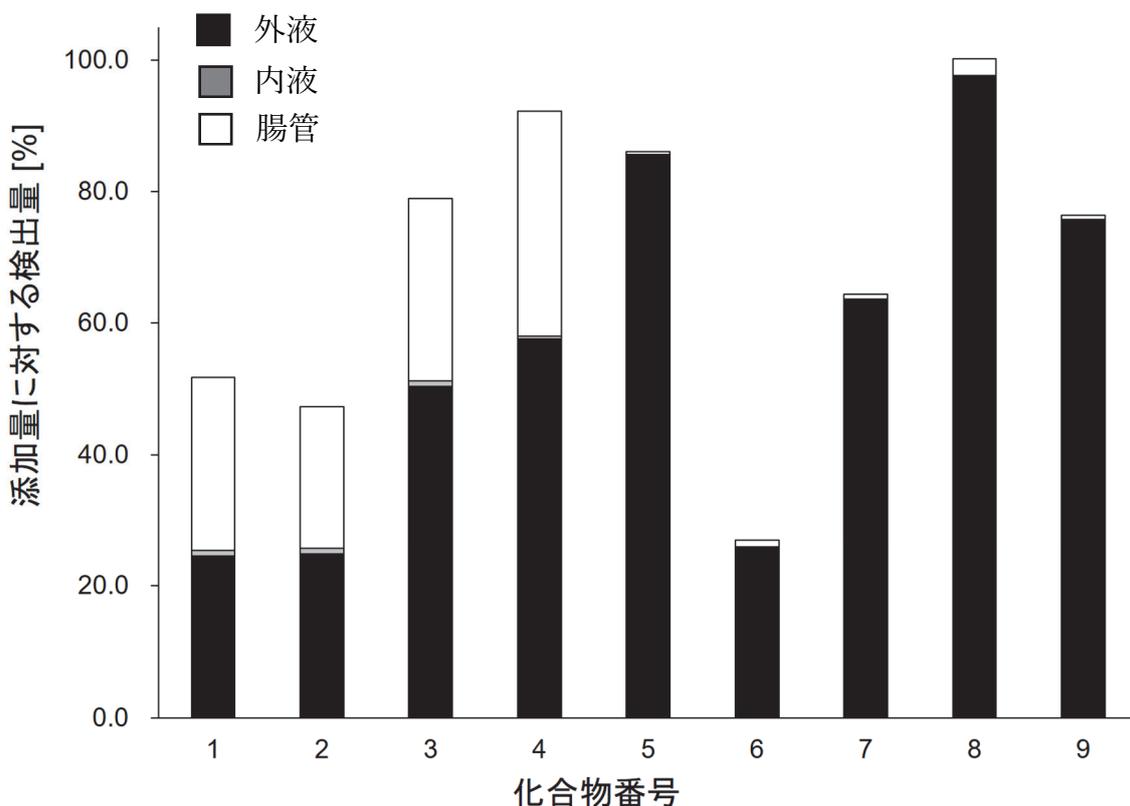


図 3-3. 外液、内液および腸管中に検出された試験化合物の添加量に対する割合

これらの反転腸管法における透過性と、実測濃縮倍率との比較について考察する。2~4の腸管経由のBMFは中程度(0.0340~0.179:表3-1)と実測されており、これらの化合物は腸管経由で魚体内に取り込まれると考えられる。今回の反転腸管法においても2~4は高い膜透過性を示しており、この*in vitro*実験で*in vivo*試験の腸管経由での取り込みをある程度推定できると考えられた。また、1~4の鰓経由のBCFの実測値は中程度の濃縮性(620~3400:表3-1)を、5~9のBCF実測値あるいは予測値は低濃縮性(<6.6~<78:表3-1)を示しているが、これらも今回の取り込み傾向と一致しており、反転腸管法による透過性はBCF値、すなわち魚の鰓経由の濃縮性ともある程度の相関性を示すことが確認された。

### 3.3.2 分子のかさ高さ と腸管膜透過性の関係

図3-4は化合物の分子量を横軸に、縦軸は暴露終了時の外液中濃度に対する内液中の濃度比を示したもので、内液中濃度が定量下限未満の場合は、定量下限の半値を用いている。この濃度比が大きいほど、腸管膜透過性が大きいと考えられる。

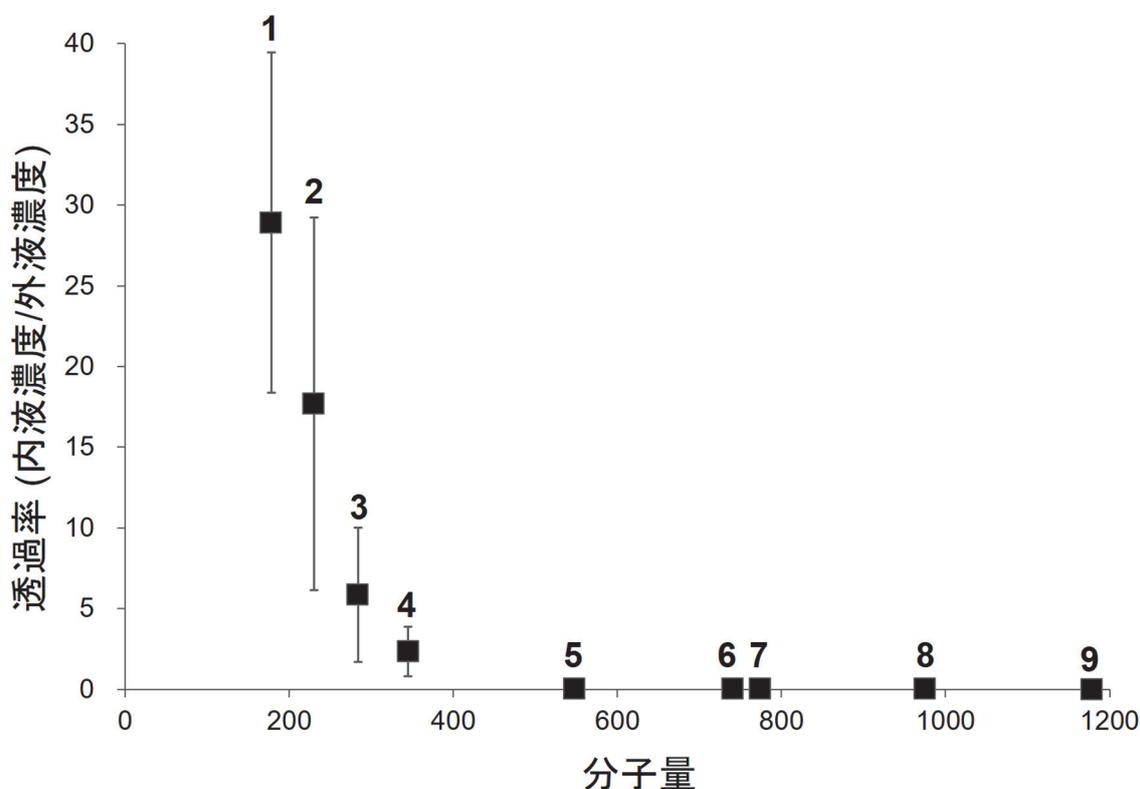


図3-4. 試験化合物の分子量と腸管膜透過性の関係

腸管膜透過性は、化合物の分子量の増加と共に低下傾向を示し、5 (分子量: 548) 以上の分子量を持つ化合物はほとんど腸管膜を透過しないことが分かる。これまで多数の水暴露法による魚濃縮性試験が実施された結果から、分子量が 500<sup>72)</sup>、600<sup>52)</sup>、または 700<sup>32)</sup> 以上であれば鰓からの取り込みが制限され生物濃縮性が低い (BCF < 5000 相当) という報告がある。これらの報告を考慮の上、化審法では安全側のマージンを加えて、分子量が 800<sup>8)</sup> 以上であれば水暴露法による生物濃縮性試験を実施することなく低濃縮性と判定可能である。今回の反転腸管法の結果、鰓膜だけではなく、魚の腸管膜についても分子量 548 以上の化合物は透過性が著しく制限されることが示されたことから、化審法における「分子量 800 以上」という閾値は、食物連鎖による消化器官を介した低濃縮性の基準値としても適用できる可能性が示された。なお、分子量と生体膜透過性の関係は、他の *in vitro* 試験系でも検討されており、例えば Caco-2 膜を使用した場合は、主に医薬品を中心に、取り込み制限がかかる分子量の閾値は 600 または 700 と報告されている<sup>73,74)</sup>。また、Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) を使用した場合は、分子量が 800 を超えると受動的な透過性が一部制限され、分子量が 1000 を超える環状ペプチド類では透過性が著しく制限されるとの報告もある<sup>75)</sup>。これらの結果は、本研究の魚腸管膜透過性の傾向とも一致しており、一般的な生体膜について分子量 600~800 前後に透過性の閾値があると推察される。

分子量の他に、分子の立体的かさ高さを示す三次元パラメータ ( $D_{\max}$ ) も膜透過性を議論するために有用な指標である。第 2 章で述べたように局所安定構造群について得られた値の算術平均値 ( $D_{\max \text{ aver}}$ ) または最小値 ( $D_{\max \text{ min}}$ ) が記述子として用いられる。欧州の REACH 規則では真空中で算出した  $D_{\max \text{ aver}} > 17.4 \text{ \AA}$  が低濃縮性、すなわち  $\text{BCF} < 5000$  の証拠の 1 つとして認められている<sup>15,35,76-77)</sup>。また、第 2 章における検討では、MD シミュレーションを導入して水中での分子挙動を解析し、水中での  $D_{\max \text{ min}} > 15.6 \text{ \AA}$  または  $D_{\max \text{ aver}} > 17.1 \text{ \AA}$  以上であれば低濃縮性 ( $\text{BCF} < 5000$ ) と判定可能であることを新たに示した<sup>58)</sup>。反転腸管法で用いた化合物 1~9 について水中 MD シミュレーションを行い、 $D_{\max \text{ min}}$  および  $D_{\max \text{ aver}}$  を算出した結果を表 5 に示す。5~9 の  $D_{\max \text{ min}}$  は  $15.6 \text{ \AA}$  を、 $D_{\max \text{ aver}}$  も  $17.1 \text{ \AA}$  を上回っており、鰓膜経由の濃縮性が低いと考えられる。これらの化合物は、今回の反転膜腸管法においても膜透過性が非常に低いことを確認しており、鰓膜経由を想定して提案した分子サイズ閾値が、腸管膜を介した濃縮性評価にも適用できる可能性が示された。

表 3-5. 水中での MD 計算による分子サイズ

化合物番号	D <sub>max aver</sub> [Å]	D <sub>max min</sub> [Å]
1	11.6	11.1
2	12.1	11.8
3	14.0	13.0
4	15.1	13.9
5	17.2	15.8
6	23.3	16.8
7	20.9	20.0
8	34.9	29.3
9	23.8	21.0

最後に、一般的に BCF および BMF 値は *n*-オクタノール/水分配係数 (Kow) と強い相関関係があることが知られているため、Kow と本検討結果についても考察する。Arnot らは、一般化学物質について log Kow > 7~8 の領域で BMF 値が低下し、log Kow が 9.74 を超えると BMF が 1 以下 (すなわち食物連鎖網を想定した場合に低濃縮性) となる傾向があると報告している<sup>78)</sup>。今回の検討で低い膜透過性を示した 5~9 は log Kow > 10.5 と高疎水性であり、Arnot らの示す傾向と一致している。しかし、表 3-1 に示したこれらの高い log Kow 値はいずれも EPI Suite™ ver.4.1 による推定値であり、一般的に log Kow > 6 となるような高疎水性領域では信頼性の高い分配係数の実測は困難であるため、log Kow 実測値にもとづいた濃縮性の検証は十分に行われていないのが現状である。化合物の濃縮性と分配係数には密接な関係があるものの、今回用いた 5~9 のように log Kow を実測することが困難な高疎水性物質の濃縮性評価では、化合物ごとに明確なパラメータとして定義可能な分子量または分子サイズの方がより適していると考える。

### 3.4 結論

本検討では、9 化合物のコイ腸管膜透過性を *in vitro* 反転腸管法で評価した。腸管膜透過性と分子量には関連性が認められ、分子量 548 以上の化合物はほとんど腸管膜を透過しないことが明らかとなった。この結果は、化審法で採用されている低濃縮性の分子量閾値（すなわち、分子量 800 以上で低濃縮性）が餌暴露法にも適用できる可能性を示している。また、化合物の三次元構造を想定した分子サイズパラメータ  $D_{\max}$  も腸管膜透過性と密接に関係しており、鰓膜に対して解析したのと同じ  $D_{\max}$  基準（水中  $D_{\max \min} > 15.6 \text{ \AA}$  あるいは  $D_{\max \text{ aver}} > 17.1 \text{ \AA}$  以上で低濃縮性）を、腸管膜にも適用できる可能性がある。これまで、魚の鰓膜に対して設定されていた分子のかさ高さに関する膜透過性基準（分子量や  $D_{\max}$ ）が、膜の種類を問わず適用できれば、食物連鎖網を考慮した濃縮性評価においても動物実験の削減に大きく貢献するものと期待される。

## 第4章 代謝速度と濃縮性の関係

### 4.1 緒言

一般的に化学物質の濃縮性は魚を用いた濃縮度試験<sup>10,11)</sup>によって評価されているが、マスバランスモデル<sup>27,80)</sup>や定量的構造活性相関 (QSAR)<sup>22,81)</sup>等による予測手法も活用されている。化学物質の濃縮性は魚体へ取込時の媒体である水あるいは餌と魚 (主に脂質成分) との分配平衡に大きく左右されるため、オクタノール/水分配係数 ( $\log K_{ow}$ ) が濃縮性予測手法の主要なパラメータとなっている<sup>22,81)</sup>。それに加えて、魚体内に取り込まれた後に速やかに代謝分解される化学物質の場合は、濃縮性に大きな影響を与えるため、代謝分解性も考慮する必要がある。化合物の魚体中の代謝分解性を定量的に評価するには、濃縮度試験と同等かそれ以上の研究資源や期間が必要となるため、初期評価の段階では化合物の物理化学的性質や構造から代謝速度あるいは代謝半減期を予測する QSAR モデルが提案されてきた<sup>82-84)</sup>。しかしながら、代謝速度や代謝半減期の実測データが豊富な哺乳動物<sup>85-88)</sup>とは異なり、魚について利用可能なデータは少なく、魚に特化された代謝分解性予測モデルは限られている<sup>82-84)</sup>。この中で代表的な代謝速度予測モデルは米国が開発した安全性評価ツール EPI Suite<sup>TM</sup> ver.4.11<sup>89)</sup>に組み込まれている Arnot らの QSAR 式<sup>83)</sup>である。この QSAR 式において、代謝速度は  $\log K_{ow}$ 、分子量、および化合物に含まれる複数の官能基に基づいた補正係数の和から算出されており、立体構造等を考慮した精度の高い予測は原理上困難である。また、官能基によっては補正係数を決定するためのトレーニング化合物の数が十分ではなく、最終的に 211 個のテスト化合物を用いた予測精度は決定係数 ( $R^2$ ) は 0.734 と信頼のおける濃縮性評価への適用には限界がある<sup>89)</sup>。一方、*in vitro* の試験系で代謝分解性を簡易的に実測する方法は、ヒトや哺乳類の毒性学または薬理学の分野で広く活用されてきた<sup>90,91)</sup>。一般的には脊椎動物における化学物質の代謝分解の主な器官は肝臓であることから、肝細胞、または肝臓 S9 画分やミクロソーム画分などを用いて代謝分解性が評価されている<sup>90,91)</sup>。このような背景から、濃縮性評価においても、魚の肝細胞あるいは肝臓 S9 画分を用いて化合物の *in vitro* 代謝速度を実測して予測モデルに組み込む方法が提案され<sup>92-95)</sup>、2018 年には OECD によりテストガイドラインとして公開された<sup>96,97)</sup>。しかしながら、この

手法は未だ十分な検証が行われておらず<sup>96-98)</sup>、欧州 REACH 規制では濃縮性評価の証拠の 1 つとして提案されているものの<sup>15)</sup>、明確な基準値や活用法と共に各国の法規制に導入されるには至っていない。そこで、本研究では QSAR では予測困難かつ濃縮性が既知の化合物を選定し、肝臓 S9 画分を用いた代謝速度を測定して *in vitro* 代謝速度試験(OECD TG 319B)<sup>97)</sup>の有用性を検証することにした。さらに、BCF を算出する際の不確定要素の 1 つとして知られている結合補正係数を、急速平衡透析装置(Rapid Equilibrium Dialysis, RED)を用いて測定することにより、BCF 予測値の精緻化可否を検討した。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1. 試験化合物

試験化合物として、表 4-1 に示す 7 種類のアルキルフェノール類を使用した。化合物は全て富士フィルム和光純薬から入手した。

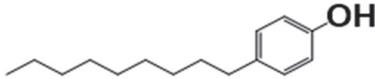
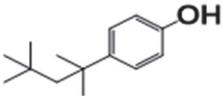
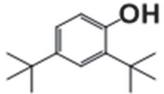
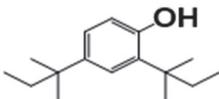
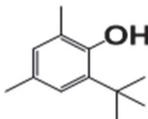
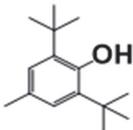
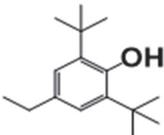
### 4.2.2. S9 を用いた代謝速度測定法

試験化合物の代謝速度は、OECD テストガイドライン 319B に準拠して測定した<sup>97)</sup>。ニジマス肝臓 S9 画分 (RT-S9) (20 mg/mL, Lot No.TR017) は日本チャールス・リバーから入手した。RT-S9 は氷水中で解凍後、実験使用時まで氷上で保管した。また、ネガティブコントロールとして、RT-S9 を 70°C のオーブン内で 30 分間加熱して酵素を失活させた熱失活 RT-S9 を調製した。加熱後の RT-S9 は凝固が認められたため、ハンディホモジナイザー (TH115-PCR、アズワン製) でホモジナイズし、実験使用時まで氷上で保管した。RT-S9 以外の試薬については、以下の A~F 液を実験開始前に調製し、全て使用時まで氷上で保管した。

A 液：100 mM のリン酸水素二カリウム液と 100 mM リン酸二水素カリウム液 (ともに富士フィルム和光純薬) を混合して pH 7.8 のリン酸緩衝液を調製した。

B 液：Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate, tetrasodium salt (NADPH; オリエンタル酵母) を 17.6 mg 秤量し、1 mL の氷冷したリン酸緩衝液を添加して 20 mM の NADPH 液とした。

表 4-1. 試験化合物の濃縮性に係る情報

No.	試験化合物		log K <sub>ow</sub>	実測 BCF <sup>c)</sup>	
	化合物名	Cas No.			構造
1	4-Nonylphenol	104-40-5		5.76 <sup>a)</sup>	330
2	4- <i>tert</i> -Octylphenol	140-66-9		5.28 <sup>b)</sup>	469
3	2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol	96-76-4		5.19 <sup>a)</sup>	436
4	2,4-Di- <i>tert</i> -pentylphenyl	120-95-6		6.31 <sup>b)</sup>	350
5	2,4-Dimethyl-6- <i>tert</i> -butylphenol	1879-09-0		4.52 <sup>b)</sup>	263
6	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol	128-37-0		5.10 <sup>a)</sup>	2800
7	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-ethylphenol	4130-42-1		5.52 <sup>b)</sup>	5060

a) EPI SuiteTM ver. 4.11 のデータベースから入手した実測値

b) EPI SuiteTM ver. 4.11 による推定値

c) National Institute of Technology and Evaluation: NITE Chemical Risk Information Platform から入手

C液： Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid, trisodium salt (UDPGA; シグマアルドリッチ)を 12.95 mg 秤量し、1 mL の氷冷したリン酸緩衝液を添加して 20 mM の UDPGA 液とした。

D液： L-Glutathione reduced (GSH; シグマアルドリッチ) を 1.536 mg 秤量し、1 mL の氷冷したリン酸緩衝液を添加して 50 mM の GSH 液とした。

E液： Adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate lithium salt hydrate (PAPS; シグマアルドリッチ) を 0.634 mg 秤量し、1 mL の氷冷したリン酸緩衝液を添加して 1 mM の PAPS 液とした。

F液： Alamethicin(シグマアルドリッチ) 約 1 mg に 0.1 mL のメタノール (関東化学) を添加し、10 mg/mL の標準液を調製した。このメタノール/ Alamethicin 溶液を 25  $\mu$ l 採取して 0.975 mL の氷冷したリン酸緩衝液を添加して 250  $\mu$ g/mL の Alamethicin 液とした。

20 mg/mL の RT-S9 を 0.5 mL 採取して 20 mL 容のガラス製バイアルに添加し、A液 4.0 mL を加えてボルテックスミキサー (エッペンドルフ) で混合した。F液 1.0 mL を加えて混合し、氷上で 15 分間静置した。その後、B、C、D、E 液を各 1.0 mL 加えて混合した液をマスターミックスとした。熱失活 RT-S9 についても同様の方法でマスターミックスを調製した。この 2 種類のマスターミックスを、インキュベーター中で 12°C に温調した 1.5 mL 容蓋つきガラス製エッペンチューブに 190  $\mu$ L ずつ分注した。各化合物を 20  $\mu$ M または 1  $\mu$ M の濃度となるようメタノールで溶解させた標準液を 10  $\mu$ L ずつ各エッペンチューブに添加し、密閉してボルテックスミキサーで攪拌して化合物の最終濃度を 1  $\mu$ M または 0.05  $\mu$ M とし、12°C に維持したインキュベーター内でゆるやかに振盪しながら反応を開始した。

試験化合物標準液を添加後の RT-S9 区は 0、10、20、30、60、90、120 分後に、熱失活 RT-S9 は 0 および 120 分後に各エッペンチューブに 400  $\mu$ L のアセトンを添加してボルテックスミキサーでよく攪拌し、反応を停止させた。なお、各エッペンチューブを用いた反応は、反応時間毎に n=3 で実施した。反応停止後のエッペンチューブを 3000 rpm で遠心し、水/アセトニトリル層を回収した。この水/アセトニトリル層に 200  $\mu$ L のヘキサンを添加して混合後、ヘキサン層を回収した。このヘキサン抽出を 3 回行った後、回収したヘキサンをフィルター付きエッペンチューブ (ミリポア・メルク社製、Ultrafree-MC、HV、0.45  $\mu$ m) の上部に入れ、遠心機 (エッペンドルフ製、MiniSpin) にて軽く遠心してフ

フィルターを透過させた。その後、このヘキサン溶液を窒素吹付により 200  $\mu$ L に濃縮し、GCMS-QP2010（島津製作所）を用いた GC-MS 分析に供した。

表 4-2. GC-MS 分析条件

カラム	J&W HP-5ms キャピラリーカラム (30 m $\times$ 0.25 mmID, 膜厚 0.25 $\mu$ m : Agilent technologies)
カラム温度	50°C $\rightarrow$ (8°C/min) $\rightarrow$ 300°C
注入口	250°C (スプリットレス)
キャリアガス	ヘリウム, 1 mL/min
定量条件	EI : 選択イオンモニタリング (SIM) 135 m/z at 20 eV [1]、135 m/z at 20 eV [2] 191 m/z at 45 eV [3]、205 m/z at 45 eV [4] 163 m/z at 60 eV [5]、203 m/z at 60 eV [6] 219 m/z at 60 eV [7]、
イオン源温度	280°C
注入量	1 $\mu$ L

測定した各サンプリングポイントごとの化合物濃度の対数値を時間に対してプロットした傾き (Slope) から以下の式により一次の反応速度定数 (hour<sup>-1</sup>) を算出し、「*in vitro* 代謝速度定数 ( $k_{M, vitro}$ )」とした。なお、2.303 は log から ln への変換係数である。

$$k_{M, vitro} = -2.303 \times \text{Slope} \quad (4-1)$$

#### 4.2.3. RED 測定法

4.2.1 に記載した RT-S9 反応液中での非結合化合物濃度は、急速平衡透析装置 (Rapid Equilibrium Dialysis, RED; Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。RED は分子量 8000 のカットオフ (8k MWCO) を有する透析膜の垂直シリンダーで仕切られた 2

つのチャンバーから構成されており、図 4-1A のチャンバーI には 500  $\mu$ L の 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) を入れ、チャンバーII には 1 mg/mL の熱失活 RT-S9 と 0.05  $\mu$ M の各化学物質を含む 1.0 mL の同緩衝液を入れた。これをプラスチック製のベースプレート (図 4-1B) にセットし、緩やかに振盪しながら 12°C で 6 時間インキュベートした後、チャンバーI の緩衝液を回収した。なお、検出感度を考慮して、20 サンプルからの回収液を合算した 10 mL をヘキサン 5 mL で 3 回抽出し、回収したヘキサンを濾過後、ロータリーエバポレーターおよび窒素吹付により 200  $\mu$ L まで濃縮して、表 1 に示す GC-MS 分析を行った。測定は各化合物について n=3 で行った。

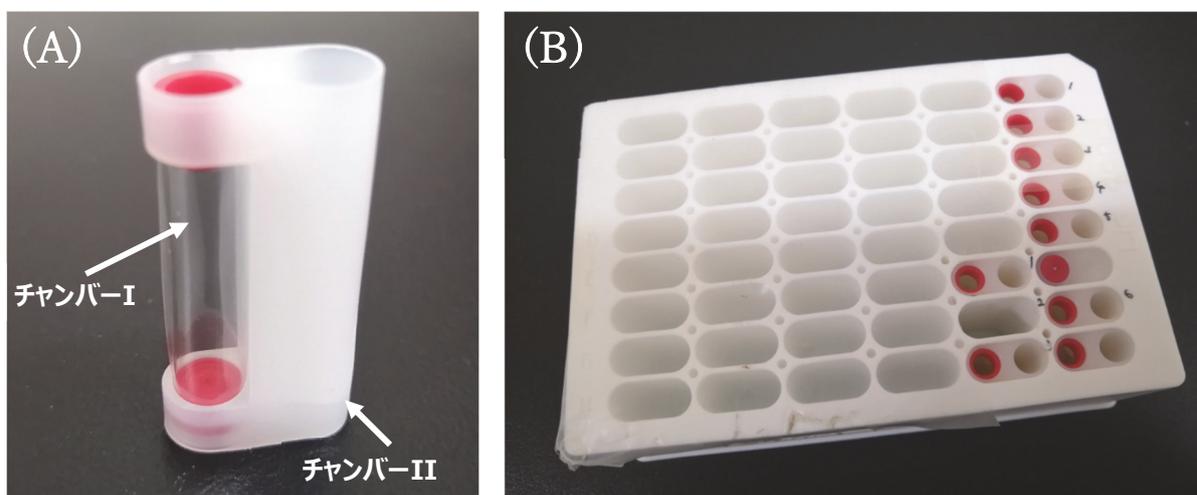


図 4-1. 急速平衡透析装置 (Rapid Equilibrium Dialysis, RED)

#### 4.2.4. 解析

Arnot&Gobas モデル<sup>27,89)</sup>に従えば、生物濃縮係数 (BCF) は以下の式で算出できる。

$$BCF = (1 - L_B) + (k_1 \times \phi / (k_2 + k_E + k_G + k_M)) \quad (4-2)$$

ここで  $k_1$  は鰓取込速度定数 ( $\text{day}^{-1}$ )、 $k_2$  は鰓排出速度定数 ( $\text{day}^{-1}$ )、 $k_E$  は排泄速度定数 ( $\text{day}^{-1}$ )、 $k_G$  は成長希釈速度定数 ( $\text{day}^{-1}$ )、 $k_M$  は代謝速度定数 ( $\text{day}^{-1}$ )、 $L_B$  は魚の脂質含量、 $\phi$  は化合物の水中濃度に対する非結合体濃度の比である。 $L_B$  は OECD テストガイドライン

305 における脂質含量の基準値となる 5% を使用した<sup>10,11,89)</sup>。

水中非結合体濃度は以下の式から算出される<sup>27)</sup>。

$$\phi = \frac{1}{1 + \chi_{POC} \times 0.35 \times K_{OW} + \chi_{DOC} \times 0.1 \times 0.35 \times K_{OW}} \quad (4-3)$$

水中での不溶有機炭素割合  $\chi_{POC}$  および水中での溶存有機炭素割合  $\chi_{DOC}$  は、Arnot&Gobas モデルで用いられている  $4.6 \times 10^{-6}$  および  $1.0 \times 10^{-6}$  を使用した<sup>27,99)</sup>。

また、各速度定数は以下の式で算出される<sup>27)</sup>。

$$k_1 = 1 / ((0.01 + 1 / K_{OW}) \times W^{0.4}) \quad (4-4)$$

$$k_2 = k_1 / L_B \times K_{OW} \quad (4-5)$$

$$k_E = 0.125 \times K_D \quad (4-6)$$

$$k_D = 0.02 \times W^{-0.15} \times e^{0.06 \times T} / (5.1 \times 10^{-8} \times K_{OW} + 2) \quad (4-7)$$

$$k_G = 0.0005 \times W^{-0.2} \quad (4-8)$$

ここで  $K_{ow}$  はオクタノール/水分配係数、 $W$  は魚体重、 $T$  は水温である。本検討では  $W$  は一般的な濃縮度試験に使用する魚サイズの  $10 \text{ g}$ <sup>27,89)</sup>、 $T$  は *in vitro* 代謝速度試験の実施温度である  $12^\circ\text{C}$  を使用した。ここで、式(4-2)の代謝速度定数  $k_M$  以外すべて推定可能な状況にある。一方、 $k_M$  は化合物の構造によって大きく異なり、他の速度定数のように  $\log K_{ow}$  をはじめとした物理化学パラメータから算出することが困難である。当該試験の目的は代謝速度を簡便に把握し、精度の良い濃縮性を予測することにあるため、以下の5つの場合分けを行って BCF 値を考察することとした。

#### (1) 代謝なしと仮定して BCF 値を計算

まず、化合物が全く代謝されないと仮定した場合の BCF 値を算出することにした。具体的には、式(4-2)の  $k_M=0$  とし、その他の項は式(4-3)~(4-8)から計算して BCF を算出した。この BCF 値を「BCF 計算値 (代謝なし)」とした。

## (2) 実測 BCF から $k_M$ を逆算

実測 BCF 値が入手可能な化合物の場合、式(4-2)～(4-8)を用いると、 $k_M$ を逆算することができる。このように推定した代謝速度定数(day<sup>-1</sup>)を「生物試験に基づく代謝速度定数」とした。

## (3) QSAR による $k_M$ 推定と、それに基づく BCF 値の計算

Arnot & Gobas モデルをベースとした濃縮性予測ツール EPI Suite™ ver.4.11<sup>89)</sup>では、代謝速度定数  $k_M$  を以下の経験則に基づく QSAR 予測式から算出している。

$$\text{Log}(k_M) = 0.30734215 \times \log K_{OW} - 0.0025643319 \times MW - 1.53706847 + \sum(F_i \times n_i) \quad (4-9)$$

ここで  $F_i$  は化合物に含まれる官能基に基づいた補正係数、 $n_i$  は官能基の数であり、421 のトレーニング物質を用いて 57 種類の官能基について  $F_i$  が定義されている<sup>83, 89)</sup>。この式(4-9)から算出した代謝速度定数(day<sup>-1</sup>)を「QSAR 代謝速度定数」とし、式(4-2)～(4-8)から算出した BCF 値を「QSAR 代謝速度定数を用いた BCF 計算値」とした。

## (4) S9 試験による $k_M$ 推定とそれに基づく BCF 値の計算

本研究では、4.2.1 で述べた方法で、ニジマス肝 S9 中における「*in vitro* 代謝速度定数  $k_{M, vitro}$ 」(hour<sup>-1</sup>)を実測した。この  $k_{M, vitro}$  を、OECD ガイダンス No.280<sup>98)</sup>で推奨されている Nichols らの *in vitro-in vivo* 外挿法 (IVIVE) 法<sup>100)</sup>を用いて「*in vivo* 代謝速度定数  $k_M$ 」(day<sup>-1</sup>)に変換した。変換した  $k_M$  を用いて、式(4-2)～(4-8)から算出した BCF 値を「*in vitro* 代謝速度定数を用いた BCF 計算値」とした。

なお、 $k_M$  の具体的な算出方法は以下の通り。まず、 $k_M$  (day<sup>-1</sup>)は、*in vivo* 肝クリアランス  $CL_H$  (L/d/kg fish) と魚体-血液分配係数  $V_{D, BL}$  から算出される。

$$k_M = CL_H / V_{D, BL} \quad (4-10)$$

ここで、 $V_{D, BL}$  は化合物の  $K_{ow}$  と魚の脂質含量  $L_B$  から以下の経験式を用いて算出する。なお、 $L_B$  は式(2)と同じく 5%を使用した。

$$V_{D, BL} = L_B \times K_{OW} / ((10^{0.73 \log K_{OW}} \times 0.16) + 0.84) \quad (4-11)$$

次に  $CL_H$  (L/d/kg fish) は、肝臓への血流速度  $Q_H$  (L/d/kg fish)、非結合率補正項  $f_u$ 、*in vivo* 肝クリアランス  $CL_{in vivo, INT}$  (mL/h/mg protein) から以下の式で算出する。ここで

$Q_H$  はデフォルト値の 18.20 を使用した<sup>98,100)</sup>。

$$CL_H = Q_H \times f_U \times CL_{in\ vivo,INT} / (Q_H + f_U \times CL_{in\ vivo,INT}) \quad (4-12)$$

$f_U$  は、*in vitro* 反応液中の非結合率  $f_{U,S9}$  と *in vivo* 血漿中の非結合率  $f_{U,P}$  の比で算出され、それぞれの比結合率は化合物の  $K_{ow}$  から計算される<sup>98,100)</sup>。

$$f_U = f_{U,P} / f_{U,S9} \quad (4-13)$$

$$f_{U,P} = 0.84 / (10^{(0.73 \times \log K_{ow} \times 0.16)} + 0.84) \quad (4-14)$$

$$f_{U,S9} = 1 / (10^{(0.694 \times \log K_{ow} - 2.158)} + 1) \quad (4-15)$$

注：反応液中の RT-S9 濃度が 1 mg/mL の場合

$CL_{in\ vivo,INT}$  (mL/h/g fish) は、1 g の肝 S9 タンパクあたりのクリアランス  $CL_{in\ vitro,INT}$  (mL/h/mg protein)、肝全体重量に対する S9 重量比  $L_{S9}$  (mg/g liver)、魚全重量に対する肝臓重量比  $L_{FBW}$  (g liver/g fish) から求まり、 $L_{S9}$  と  $L_{FBW}$  はデフォルト値の 163 と 0.015 を使用した<sup>98,100)</sup>。

$$CL_{in\ vivo,INT} = CL_{in\ vitro,INT} \times L_{S9} \times L_{FBW} \quad (16)$$

$CL_{in\ vitro,INT}$  (mL/h/mg protein) は、今回ニジマス肝 S9 を用いた実測値 (式 4-1) から得た *in vitro* 代謝速度定数  $k_{M,vitro}$  とその実験で使用した肝 S9 濃度  $C_{S9}$  (mg protein/mL) から算出することができる。

$$CL_{in\ vitro,INT} = k_{M,vitro} / C_{S9} \quad (17)$$

#### (5) S9 と RED 試験による $k_M$ 推定と、それに基づく BCF 値の計算

今回の検討では、式(4-15)で算出された  $f_{U,S9}$  の代わりに、4.2.2 節で示した RED 法を用いて  $f_{U,S9}$  を実測し、その実測値を式(4-10)～(4-17)からなる IVIVE 法に導入して  $k_M$  を算出した。この  $k_M$  値と式(4-2)～(4-8)から算出した BCF 値を「実測  $f_{U,S9}$  で補正後の *in vitro* 代謝速度定数を用いた BCF 計算値」とした。

#### 4.2.5. 分子軌道計算

化合物の分子軌道計算は HyperChem 8.0.6 (Hypercube, USA) による量子化学計算で実施した。CHEM3D Ver.18 (PerkinElmer Informatics, USA) で作成した初期平面構造を、半経験的分子軌道法 (AM1/6-31G+) <sup>23)</sup> で構造最適化を行い、第一原理分子軌道法 (Hartree-Fock / 6-31G+) <sup>101)</sup> で最高被占分子軌道 (HOMO) を計算した。

## 4.3 結果と考察

### 4.3.1. S9 による代謝速度

初期設定濃度  $1.0\ \mu\text{M}$  および  $0.05\ \mu\text{M}$  における各化合物濃度の経時変化を図 4-2 および 3 に示す。減衰は一時速度式に従うと仮定し、縦軸は化合物濃度の対数值とした。◆印は各測定時間における実測濃度 ( $n=3$ ) を、◇は熱失活させた RT-S9 を用いた 0 および 2 時間後の実測濃度 ( $n=3$ ) を、点線は各測定時間の実測濃度の算術平均値に対する近似直線を示す。1~4 は設定濃度  $1.0\ \mu\text{M}$  および  $0.05\ \mu\text{M}$  のいずれにおいても時間と共に減衰傾向を示し、 $1.0\ \mu\text{M}$  での直線の傾きは  $-0.037\sim-0.063$ 、暴露 2 時間後の化合物残存量は  $73.7\sim86.4\%$  であった。一方、 $0.05\ \mu\text{M}$  での直線の傾きは  $-0.11\sim-0.24$  で、暴露 2 時間後の化合物残存量は  $30.1\sim55.9\%$  と、低濃度区である  $0.05\ \mu\text{M}$  の方が速やかに減衰した。5~7 においても、1~4 と同様に  $0.05\ \mu\text{M}$  の方が  $1.0\ \mu\text{M}$  よりも減衰速度が速い傾向は認められたものの、 $1.0\ \mu\text{M}$  での直線の傾きは  $-0.012\sim-0.0092$  で、暴露 2 時間後の化合物残存量は  $92.6\sim104\%$ 、 $0.05\ \mu\text{M}$  での直線の傾きは  $-0.0242\sim-0.0183$  で、暴露 2 時間後の残存量は  $91.3\sim91.5\%$  であり、1~4 と比べるといずれの濃度においても代謝速度は遅かった。

一般的に、酵素の一次反応反応速度  $V$  は以下の式で記述される<sup>102)</sup>。

$$V = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (4-18)$$

ここで、 $[P]$  は反応産物の濃度、 $[S]$  は基質濃度、 $V_{\max}$  は基質濃度が無限大のときの反応速度である。また、 $K_m$  はミカエリス・メンテン定数であり、最大速度の半分の速度 ( $v = V_{\max}/2$ ) を与える基質濃度を表す。このような一次反応の場合、基質濃度が低い、すなわち  $[S] \ll K_m$  の場合は、式(4-18)の分母の  $[S]$  が無視できるため、反応速度は基質濃度に比例する。したがって、反応速度定数は基質濃度によらず一定となる。一方、基質濃度が高い、すなわち  $[S] \gg K_m$  の場合は、逆に  $K_m$  が無視できるため、反応速度は  $[S]$  に非依存的になり、漸近的に一定速度 ( $V_{\max}$ ) に近づく。この時点で、反応は 0 次反応となり酵素が基質で飽和したとみなされるため、式(4-1)から算出した見かけの一次代謝速度定数は低下する。

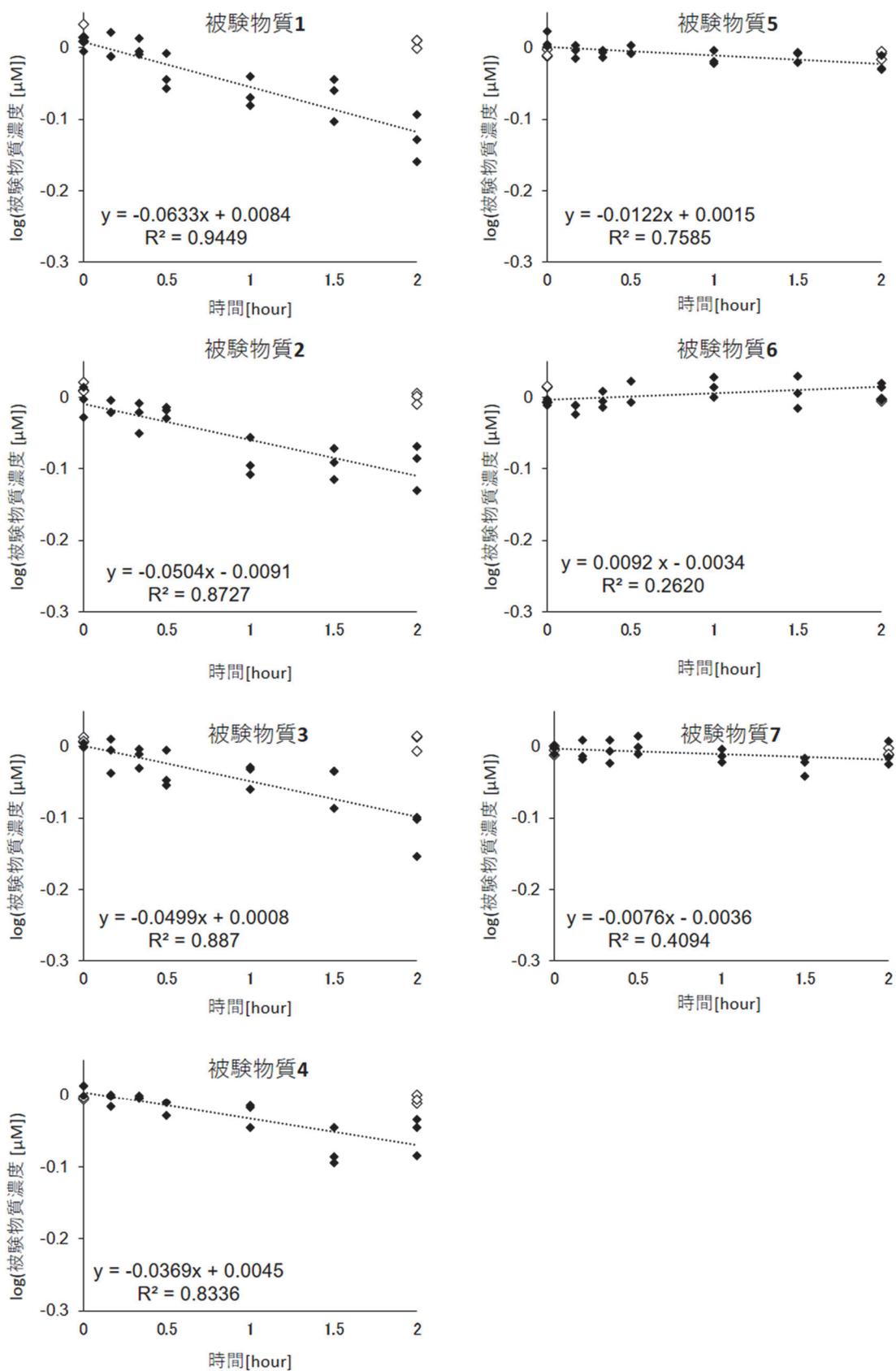


図 4-2. 試験化合物の RT-S9 による代謝 (初期濃度  $0.1 \mu\text{M}$ )

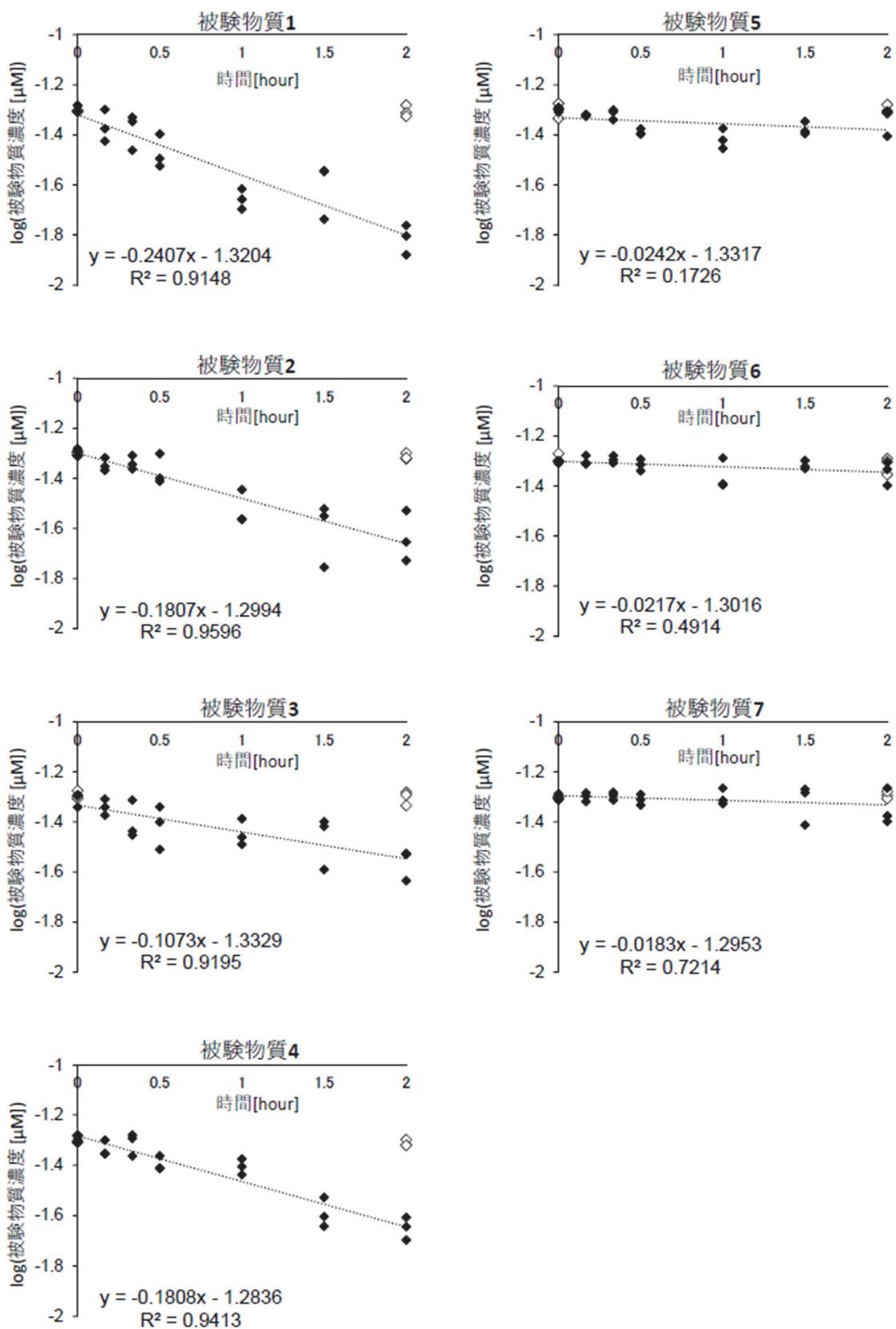


図 4-3. 試験化合物の RT-S9 による代謝 (初期濃度  $0.05 \mu\text{M}$ )

本検討で実施した高濃度区の  $1.0 \mu\text{M}$  は OECD テストガイドライン 319B<sup>97)</sup> に示されている推奨濃度  $\leq 1.0 \mu\text{M}$  に準じて決定した。この値は哺乳動物の *in vitro* 代謝試験で使用する一般的な初期濃度に基づいてガイドラインに記載されたと考えられるが、ラットやマウスなどの哺乳動物に比べて、魚の代謝活性は 5~80 倍以上低いという報告もある<sup>103-105)</sup>。本検討においても、化合物の定量下限を考慮して決定した低濃度区 ( $0.05 \mu\text{M}$ ) に比べると、高濃度区では全ての化合物において一次代謝速度定数の減少が認められたことから、今回試験化合物としたアルキルフェノール類のニジマス肝 S9 酵素に対するミカエリス・メンテン定数 ( $K_m$ ) は  $1.0 \mu\text{M}$  よりも低く、代謝飽和が起こっていた可能性が高いと考えられる<sup>106,107)</sup>。そのため、以降の解析では  $0.05 \mu\text{M}$  の結果を使用することとした。

#### 4.3.2. 各手法で測定または算出した代謝速度定数の比較

図 4-4 に初期濃度  $0.05 \mu\text{M}$  における減衰直線の傾き (図 4-3) から算出した化合物の *in vitro* 代謝速度定数 ( $k_{M, vitro}$ ) を示す。1~4 の  $k_{M, vitro}$  は  $0.25 \sim 0.62 \text{ hour}^{-1}$  と比較的速やかに代謝した。一方、5~7 の  $k_{M, vitro}$  は 1~4 に比べて小さく、 $0.042 \sim 0.056 \text{ hour}^{-1}$  であった。なお、OECD テストガイドライン 319B では信頼性をもって定量可能な最低の *in vitro* 代謝速度定数は  $0.05 \sim 0.14 \text{ hour}^{-1}$ <sup>98)</sup> である旨が記載されており、今回測定した 5~7 の代謝速度定数は、*in vitro* 実験系での代謝活性の有無が評価困難、すなわちほとんど代謝が起こらないと考えられた。この *in vitro* 代謝速度定数 ( $k_{M, vitro}$ ) と比較するため、図 4-5 に生物試験に基づく代謝速度定数 (灰色棒) および QSAR 代謝速度定数 (白棒) を示した。生物試験に基づく代謝速度定数は、5 では 1~4 を上回る値になっているものの、6~7 ではその他の物質に比べて明確に小さくなっており、5 を除く物質については *in vitro* 代謝速度定数と類似の傾向が認められた。一方、5~7 の QSAR 代謝速度定数は 1~4 よりも大きく、*in vitro* 代謝速度定数の傾向とは大きく異なっていた。この 5 を除く物質における *in vitro* および生物試験に基づく代謝速度定数と、QSAR 代謝速度定数の傾向が大きく異なる結果は、本検討で選定した化合物の代謝メカニズムに起因すると考えられる。図 4-6 に代謝傾向が異なる 2 および 6 について、量子科学計算によって得られた HOMO 軌道を示す。

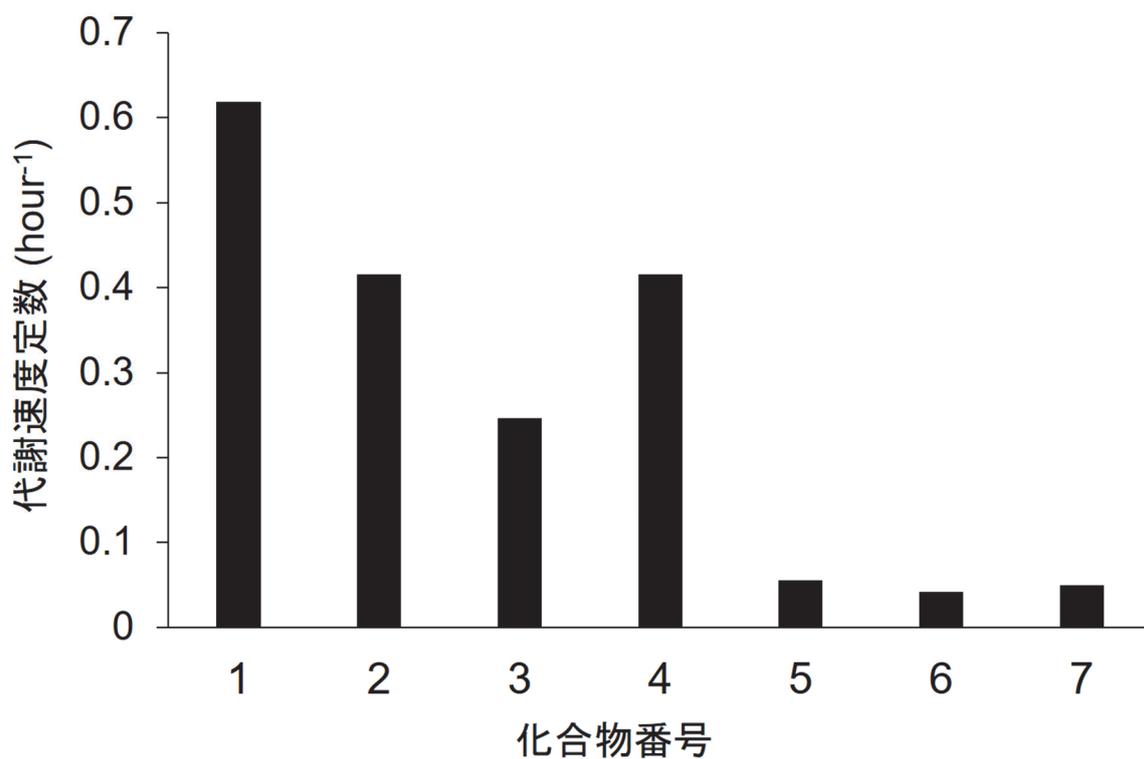


図 4-4. 初期濃度  $0.05 \mu\text{M}$  における試験化合物の *in vitro* 代謝速度定数( $k_{M, vitro}$ )

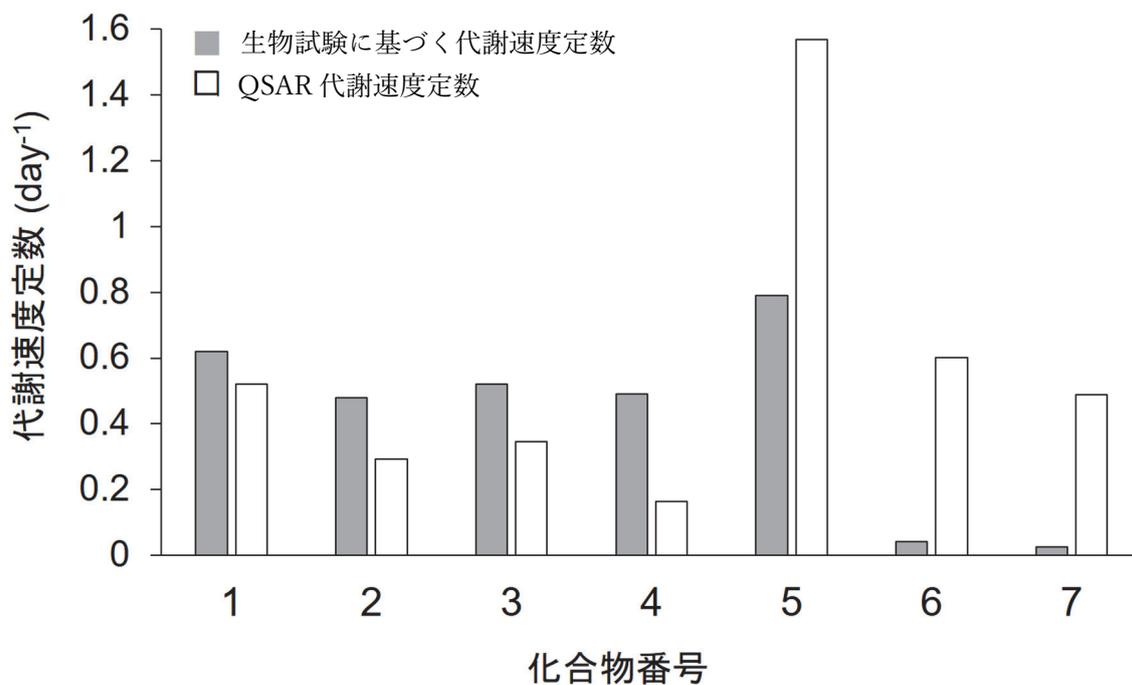


図 4-5. 試験化合物の生物試験に基づく代謝速度定数と QSAR 代謝速度定数

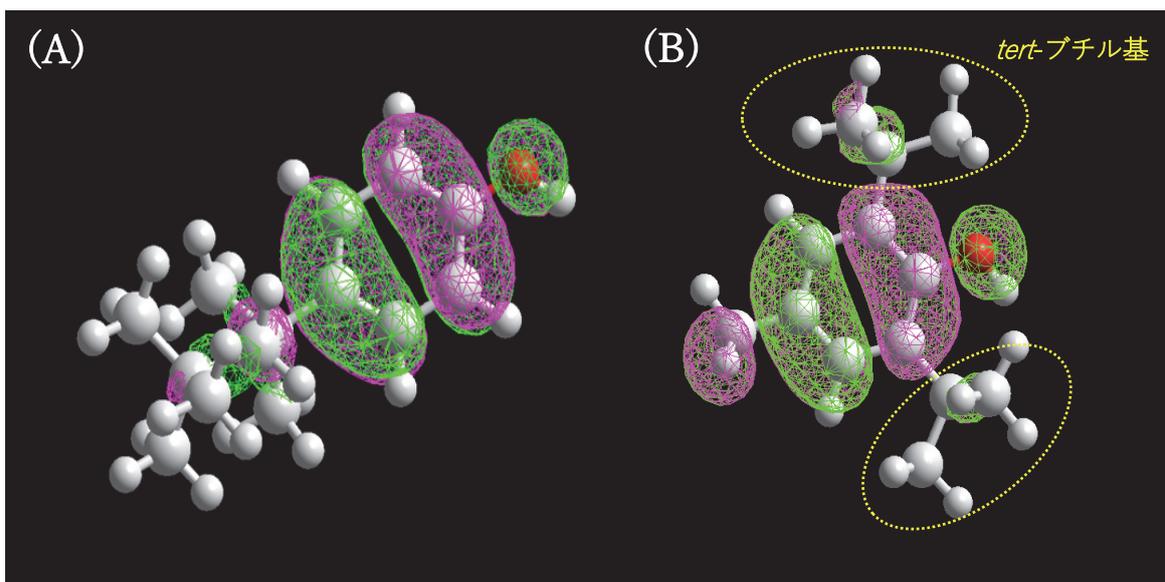


図 4-6. 化合物 2 (A) および 6 (B) の HOMO 軌道

アルキルフェノール類の HOMO 軌道は、ベンゼン環上の  $\pi$  軌道と、水酸基とその反対側にあるアルキル基の混成軌道で構成されている。一般的にアルキルフェノールは、チトクローム P450 によるベンゼン環の酸化や、-OH 基のグルクロン酸または硫酸抱合により代謝されることが知られている<sup>108,109)</sup>。しかしながら、5~7 については -OH 基にメチル基あるいは *tert*-ブチル基が隣接しており、-OH 基に接近する酵素の立体障害として作用している可能性がある。このため、特に立体障害の影響が大きい 2 つの *tert*-ブチル基に -OH 基が挟まれた 6 および 7 は、今回測定した *in vitro* 系でも他の化合物に比べて生物試験に基づく代謝速度定数が顕著に低く、ほとんど代謝されなかったと考えられる。5 については、隣接官能基の 1 つが *tert*-ブチル基に比べると立体障害が少ないメチル基であり、生物試験に基づく代謝速度定数が 6 および 7 に比べると大きい値を示した。一方で、*in vitro* 代謝速度定数 ( $k_{M, vitro}$ ) では 5 は生物試験ほど代謝分解されず、6、7 の差が生物試験ほど明確に現れなかった。これは、*in vitro* 系では魚全体に比べると限られた酵素しか反応に関与していないためと推察された。加えて、5 は今回の選定化合物の中で最も  $\log K_{ow}$  が低い。3.2.5 節で記載した生物試験に基づく代謝速度定数の算出式においては、 $\log K_{ow}$  が小さい化合物ほど実測 BCF のばらつきが代謝速度に大きな影響を与える傾向があり、5 の生物試験に基づく代謝速度定数と *in vitro* 代謝速度定数の不一致の要因の 1 つになっている可能性もある。

1~7 全体を見ると、QSAR 代謝速度定数には上述のような立体障害は全く考慮で

きておらず、生物試験に基づく代謝速度定数と大きく乖離しているように見える（図 4-5）。これは、QSAR 代謝速度定数は、単純に代謝に関与すると判断された官能基に付与された係数の総和として算出されたため、5~7 のように立体障害となり得る官能基に囲まれた-OH 基も、1~4 のように他の官能基の影響を受け難い-OH 基と同等の重みづけで予測値に導入されることが一因である。加えて、QSAR 代謝速度定数において 5~7 には、*tert*-ブチル基の中心炭素原子に”Carbon with 4 single bonds & no hydrogens”として比較的速い代謝を示す係数（-0.29842827）が割り当てられていることも影響している<sup>83,89</sup>。これは、QSAR モデル式構築の際のトレーニング化合物では、中心炭素原子にアルキル基以外の官能基が結合しており代謝の活性中心になり得たために、大きな係数が割り当てられているのだが、*tert*-ブチル基の代謝活性は低く、”Carbon with 4 single bonds & no hydrogens”で期待されるような代謝分解反応は一般的に起こりえない。このように QSAR モデルでは分子の詳細な構造や、トレーニング化合物との違いは考慮されておらず、今回選定した一部の化合物については、代謝速度定数を過大評価している（図 4-5）。一方で、中程度の立体障害の影響を受ける 5 を除き、-OH 基が独立している 1~4 と、*tert*-ブチル基による反応阻害を受ける 6~7 については、生物試験に基づく代謝速度定数の傾向が *in vitro* 代謝速度定数においても再現できたため、RT-S9 を用いた *in vitro* 代謝速度の実測により QSAR 予測にもとづいた濃縮倍率の推定値を改良できる可能性が示された。

#### 4.3.3. 急速平衡透析装法（RED）による非結合率測定結果

化学物質の非結合率補正項  $f_u$  は、IVIVE による BCF 予測モデルの不確実性に大きな影響を与えるパラメータとして知られているが<sup>110,111</sup>、魚の生体試料を用いて測定した事例は少なく<sup>112</sup>、多くの場合は  $\log K_{ow}$  に基づく経験式に従って推定されている<sup>113-115</sup>。式(4-12)および(4-13)は OECD テストガイドラインで推奨されている最も信頼性の高い推定式であるが、ラットのミクロソームとの非結合率から得られており、RT-S9 への外挿性は保証されていない<sup>113</sup>。また、Nichols らは RT-S9 への非結合率を測定し、異なる経験式を提案しているが、実測した化合物はわずか 3 物質であり、十分な検証数とは言えない<sup>112</sup>。なお、一部の文献では BCF の予測値と測定値との一致性の観点から  $f_u=1.0$ 、すなわち、*in vitro* 系と *in vivo* 系の化合物の代謝分解性は非結合率に関わらず等しい、と仮定しているものもあるが<sup>95,100</sup>、科学的な妥当性については十分に説明さ

れておらず、OECD ガイダンス No.280 においても  $f_U$  の適切な設定方法については検討段階である旨が明記されている<sup>98)</sup>。これらの状況を踏まえ、本研究では化合物の RT-S9 反応液中の非結合率  $f_{U,S9}$  を急速平衡透析装法 (RED) で測定した。図 4-7 に測定結果を示す。■は各化合物の非結合率、点線は IVIVE 法中で用いられている式(4-13)によって算出された  $f_{U,S9}$  のプロットである。

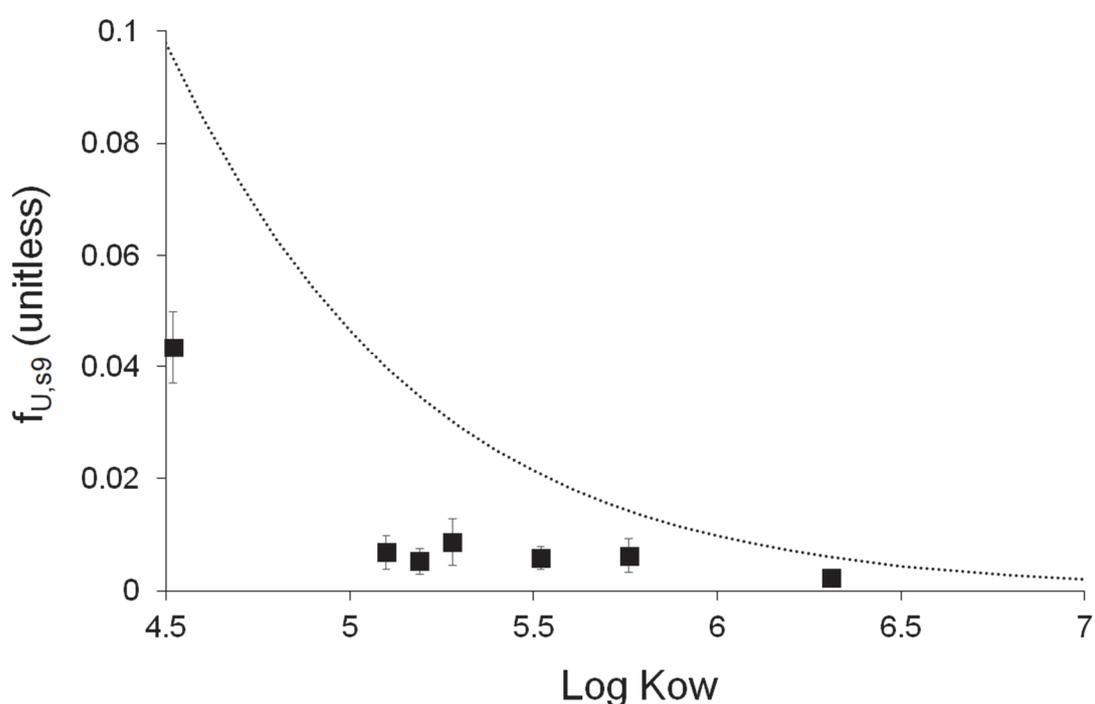


図 4-7. 急速平衡透析装法 (RED) で測定した化合物 1~7 の非結合率 ( $f_{U,S9}$ )

本検討で実測された  $f_{U,S9}$  は式 (4-13) によって算出された  $f_{U,S9}$  よりも 2.2~6.6 倍小さい値となった。なお、最近の Laue らの報告<sup>116)</sup>では 6 物質の一般化学物質について本検討と同様に  $f_{U,S9}$  を測定しており、実測  $f_{U,S9}$  は式 (4-13) によって算出された  $f_{U,S9}$  の 0.23~5.4 倍と、化合物によって大きくばらつく結果となっていた。本検討では構造が類似したアルキルフェノール類の実測値は式(4-13)の推定値よりも一様に低い結果が得られたものの、Laue らの結果も考慮すると、RT-S9 への結合が  $\log K_{ow}$  以外の物理化学的性質にも依存している可能性が考えられる。また、Laue らの検討では *in vitro* 実験

系での非結合率 ( $f_{U,S9}$ ) だけではなく、*in vivo* 血漿中の非結合率  $f_{U,P}$  も実測して  $f_U$  を算出したところ、式(4-11)~(4-13)から得られた  $f_U$  値の 1.1~2 倍になり、 $f_{U,S9}$  のみの変動幅よりも緩和された<sup>116)</sup>。このことから、非結合率補正項  $f_U$  を正確に見積もるためには、血漿中の非結合率  $f_{U,P}$  についても実測することが望ましいと考えられた。

#### 4.3.4. 各手法で測定または算出した BCF 値の比較

表 4-3 に 4.2.5 で示した各式から算出した BCF 値の一覧を示す。

表 4-3. 実測および種々の計算による化合物 1~7 の BCF 値と、濃縮性分類の関係

化合物 番号	BCF実測値	BCF計算値			実測 $f_{U,S9}$ で補正後の <i>in vitro</i> 代謝速度 定数使用
		代謝なし	QSAR代謝速度 定数使用	<i>in vitro</i> 代謝速度 定数使用	
1	330	15809	221	2623	1398
2	469	7646	365	2441	1042
3	407	6464	175	3002	906
4	350	20781	1175	2977	1400
5	263	1590	177	1440	1298
6	2800	5427	798	4599	2703
7	5060	11467	2429	8352	5020

□ : 低濃縮性 (BCF<2000)、 □ : 中濃縮性 (2000≦BCF<5000) □ : 高濃縮性 (5000≦BCF)

「実測 BCF」は独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) が開発した化学物質総合情報提供システム (Chemical Risk Information Platform; CHRIP)<sup>72)</sup>で公開されている信頼性の高い試験結果の値 (濃縮倍率が範囲で記載されている場合は最も高い値) を採用した。欧州 REACH 規制<sup>30)</sup>および化審法<sup>8)</sup>における濃縮性基準値を考慮すると、実測値からは 1~5 は低濃縮性 (BCF<2000)、6 が中程度の濃縮性 (2000≦BCF<5000)、7 が高濃縮性 (5000≦BCF) と分類された。これらの化合物について、代謝分解が全く期待されないと想定して算出した BCF 計算値 (代謝なし) では、5 を除くすべての物質が高濃縮性と分類され、濃縮特性を大幅に過大評価することになる。そこで、比較的信頼性の高い QSAR 式 (式(4-9)) により算出した代謝速度をモデルに適用して QSAR 代謝速度定数を用いた BCF 計算値を算出したところ、4 を除く全ての化合物において、予測値が実測値を下回る結果が得られた。特に、6 は生物試験で中程度の濃縮性がある

にもかかわらず低濃縮性、7 は生物試験で高濃縮性であるにもかかわらず中程度の濃縮性と判定されてしまい、化合物の濃縮性を正しく評価できていない。この理由は、4.3.2 節で述べた通り QSAR モデルではアルキルフェノール類の-OH 基に対する隣接官能基の立体障害が考慮されておらず、代謝速度を過大評価したためと考えられる。なお、*in vitro* 代謝速度定数を用いた BCF 計算値では、全化合物において実測 BCF より高値となり、特に低濃縮性の 1~4 において過大評価の傾向にあった。この *in vitro* 代謝速度定数を用いた BCF 計算値の過大評価傾向は、他の研究事例でも確認されている<sup>95, 100, 117</sup>。そこで、本検討では RT-S9 反応液中の非結合率 ( $f_{U,S9}$ ) も実測し実測  $f_{U,S9}$  で補正後の *in vitro* 代謝速度定数を用いた BCF 計算値を算出したところ、全物質について実測 BCF の濃縮性ポテンシャルの分類と一致した。ただし、今回の  $f_{U,S9}$  の実測により BCF の過大評価傾向を修正できたが、最近の論文では  $f_{U,P}$  の実測により BCF 値が大きくなる可能性も示されており<sup>116</sup>、幅広い化合物の非結合率の傾向については、さらに検討が必要である。また、RT-S9 を用いた *in vitro* 代謝速度法では、魚の肝臓の一部の酵素画分における代謝分解性のみを評価しており、その他の画分に含まれる代謝酵素や、消化管や鰓など他の部位における代謝分解性は考慮されないという課題もあり、肝臓以外での *in vitro* 代謝速度測定手法の開発も進んでいる<sup>118</sup>。生物試験の代替として、今回実施したような *in vitro* 試験は今後益々重要視されるため、上述の観点からさらなる検討を進める必要があると考えている。

## 4.4 結論

従来の QSAR 式では予測が困難なアルキルフェノール類 7 化合物についてニジマスの肝臓 S9 画分を用いて *in vitro* 代謝速度を測定した。その結果、1~4 の 4 化合物は速やかに減衰したが、5~7 の 3 化合物の減衰速度定数は数倍~十倍遅くなった。この原因は、後者の 3 化合物は立体的に嵩高い *tert*-ブチル基が隣接のフェニル基を挟むように位置しており、S9 画分中の代謝酵素によるフェニル基を起点とした酸化・抱合化反応を阻害したためと考えられる。これらの立体構造の違いは、実際に魚を用いた濃縮倍率 (BCF) にはある程度反映されていた。さらに RT-S9 反応液中の化合物の非結合率  $f_{U,S9}$  率を実測して IVIVE 法に導入したところ、7 化合物全てについて濃縮性ポテンシャルの分類が魚を用いた実測

値と一致した。これらの結果から、*in vitro* 代謝速度と非結合率を実測することにより、濃縮性に及ぼす魚体内の代謝の影響を正確に評価できる可能性が示された。

## 第5章 総括

新規な化学物質は製造・販売する前に、安全性評価の一環として生物濃縮性を評価する必要がある。濃縮性は通常魚を用い、化学物質を水に溶解させて鰓から、あるいは餌に混ぜ込んで腸管膜から暴露し、化学物質の水中濃度あるいは餌中濃度に対する魚体中の濃度の比を求めて評価する。しかし、これらの試験は試験期間が長く高コストな上、脊椎動物を使った試験であるため、開発の迅速化や動物愛護の観点から予測手法の開発が求められている。そこで、本研究では大掛かりな試験を実施することなく濃縮性を精緻に予測するため、以下の3種類の検討を行った。

第2章の「鰓経由の濃縮性と分子サイズの関係」では、化学物質の水生生物への濃縮性を評価する指標の一つである分子のかさ高さに着目した。日本の化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）に基づけば、「分子量>800」であれば生物濃縮の可能性が低い（濃縮倍率 <5000）として、生物試験が免除される。また、欧州では分子の立体構造を考慮し、「真空中の分子を内包する球の直径の平均値 ( $D_{\max\text{ aver}}$ ) >17.4 Å」を低濃縮性の証拠の1つとして採用している。しかしこの  $D_{\max\text{ aver}}$  は OASIS という専用のソフトでしか算出できず、そのソフトの取り扱いには専門的な知識が必要である。そこで一般のソフトウェアである HyperChem と独自のプログラムを組み合わせることによって  $D_{\max\text{ aver}}$  を算出する方法を考案し、特別な専門知識なくとも高い再現性で OASIS と同等の結果を得ることができた。さらに、OASIS では真空中の量子化学計算結果から水中の分子のかさ高さを推定しているが、水生生物の濃縮性を評価するには、真空中よりも水中での分子のかさ高さを指標とする方が適切と考え、濃縮倍率が既知の 1665 化合物について、分子動力学シミュレーションを実施し、分子サイズを解析した。その結果、水中で取り得る最小の球直径 ( $D_{\max\text{ min}}$ ) が 15.6 Å を上回る、あるいは球直径の平均値 ( $D_{\max\text{ aver}}$ ) が 17.1 Å を上回る化合物であれば、鰓から取り込まれにくく低濃縮性（濃縮倍率 <5000）を示すことが明らかとなった。この解析方法は、従来の単なる分子量あるいは真空中の化学物質の分子サイズに基づく濃縮性の判定に比べてより精度の高い濃縮性評価が可能であり、化審法で採用されている分子量基準に比べてより多くの生物試験の削減が可能である。

第3章の「腸管膜経由の濃縮性と分子サイズの関係」では、2018年に日本ではじめて規制に採用されたばかりの餌暴露法を考慮した場合の取込経路に着目した。この新規試験は既存データが少ないこと、加えて、魚が取り込む餌の量にばらつきが大きく暴露量の制御が困難であることが問題であり、腸管経由の化学物質の取込制限については十分な検討が行われていない。そこで、本研究では魚の腸管を用いた *in vitro* 反転腸管法を用いて分子量や分子サイズの異なる9化合物の膜透過性を評価した。コイから採取した腸管を表裏反転させ、内部をリン酸緩衝液で満たした状態で、化合物溶液（外液）に浸し、23°Cで24時間ゆるやかに攪拌後、腸管内液および外液中の化合物濃度を測定した。その結果、分子量345以下、 $D_{\max \min}$  13.9Å以下の4化合物の内液中濃度は外液よりも高濃度となったが、分子量が548以上および $D_{\max \min}$  15.8Å以上の5化合物の内液中濃度は定量下限未満で腸管膜をほとんど透過しなかった。これにより、腸管膜経由の濃縮性も鰓経由と同様に分子サイズで判定できる可能性が初めて示された。

第4章の「代謝速度と濃縮性の関係」では、取込制限に加えて濃縮性評価における重要な影響因子である生物体内での代謝分解性に着目した。これまでに化学物質の物理化学的性質や構造から代謝速度を予測するQSAR式が開発されているが、魚体中の代謝速度の予測は難度が高く、特に立体構造も考慮できる精度の高い予測モデルはない。そこで、生物試験から得られた代謝速度とQSAR式による予測値に一部大きな乖離が認められ、かつ構造類似性が高く代謝経路が同等と考えられるアルキルフェノール類7化合物に着目し、肝S9画分を用いた *in vitro* 代謝速度を測定することにした。ニジマスの肝S9濃度1 mg/mLの溶液中に補酵素を加え、化合物濃度0.05 μMで2時間インキュベートしたところ、立体的に嵩高い *tert*-ブチル基がフェニル基に隣接、あるいはフェニル基を挟むように位置し、S9画分中の代謝酵素によるフェニル基を起点とした酸化・抱合化反応が阻害されたと考えられる3化合物の代謝速度は、その他の4化合物に比べて明確に減少した。これらの立体構造の違いは、QSAR式による予測結果とは大きく乖離していたが、実際に魚を用いて測定した濃縮倍率（BCF）とは整合性が取れていた。このことから、肝S9を用いる *in vitro* 実験はQSAR式では予測できなかった立体障害の傾向を反映でき、その結果を考慮することでさらに精緻なBCF予測が可能になると考えられた。

今回検討した化学物質の魚への取込または代謝に関するパラメータを活用することに

より、未知の物質の生物濃縮性を効率的かつ精度よく評価することが可能となる。また、過剰な動物試験の削減にもつながるため、今後はスクリーニング評価への活用のみならず、低濃縮性を判断可能な基準値として法規制への導入にもつなげていきたいと考える。

## 引用文献

- 1) 若林 明子: 化学物質と生態毒性 丸善株式会社 (2000)
- 2) G. M. Klecka, D. C. G. Muir, P. Dohmen, S. J. Eisenreich, F. A. P. C. Gobas, K. C. Jones, D. Mackay, J. V. Tarazona, D. Wijk: Introduction to special series: science-based guidance and framework for the evaluation and identification of PBTs and POPs. *Integr. Environ. Assess. Manag.* **5**, 535-538 (2009).
- 3) A. D. K. Abelkop, J. D. Graham and T. V. Royer: Persistent, Bioaccumulative, and Toxic (PBT) Chemicals Technical Aspects, Policies, and Practices. CRC Press (2015)
- 4) The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants was adopted at a Conference of Plenipotentiaries on 22 May 2001 in Stockholm  
<http://www.pops.int/>
- 5) 環境省 水俣病情報センター Minamata Disease Archives  
[http://nimd.env.go.jp/archives/tenji/a\\_corner/a01.html](http://nimd.env.go.jp/archives/tenji/a_corner/a01.html)
- 6) <https://www.city.goto.nagasaki.jp/s034/010/010/110/04kanemi50th.pdf> (Accessed 5 Nov., 2021)
- 7) [https://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/kenkoukiki/kanemi/dl/kaigi\\_h25-1-08.pdf](https://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/kenkoukiki/kanemi/dl/kaigi_h25-1-08.pdf) (Accessed 29 Nov., 2021)
- 8) Japan METI: “Act on the Evaluation of Chemical Substances and Regulation of Their Manufacture, etc. (Chemical Substances Control Law).” Ministry of Economy, Trade and Industry, Tokyo, Japan.  
<http://www.japaneselawtranslation.go.jp/law/detail/?id=3350&vm=02&re=01>  
(Accessed 10 Sep., 2020).
- 9) 化審法ガイドライン, “微生物等による化学物質の分解度試験”, (2018)  
[https://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/kasinhou/files/about/laws/laws\\_h30032953\\_1.pdf](https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/about/laws/laws_h30032953_1.pdf)
- 10) OECD guideline for testing chemicals: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure (2012).  
<https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-305-bioaccumulation-in-fish->

aqueous-and-dietary-exposure\_9789264185296-en

- 11) Guideline of Chemical Substances Control Law: Testing methods for new chemical substances, Bioconcentration test using fish (2018) (in Japanese).  
[https://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/kasinhou/files/about/laws/laws\\_h30032953\\_1.pdf](https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/about/laws/laws_h30032953_1.pdf)
- 12) 厚生労働省, 経済産業省, 環境省: 新規化学物質の判定及び監視化学物質への該当性の判定等に係る試験方法及び判定基準 (平成 30 年 4 月 13 日)  
[https://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/kasinhou/files/information/ra/criteria\\_180413.pdf](https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/information/ra/criteria_180413.pdf)
- 13) W. M. Meylan, P. H. Howard and R. S. Boethling: Improved Method for Estimating Bioconcentration / Bioaccumulation Factor from Octanol/Water Partition Coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 664-672 (1999).
- 14) H. J. M. Verhaar, J. D. Jongh and J. L. M. Hermens: Modeling the Bioconcentration of Organic Compounds by Fish: A Novel Approach. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 4069-4072 (1999).
- 15) ECHA: Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.11: PBT assessment. version 3.0. European Chemicals Agency, Helsinki, Finland. (2017).  
[https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information\\_requirements\\_r11\\_en.pdf/a8cce23f-a65a-46d2-ac68-92fee1f9e54f](https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r11_en.pdf/a8cce23f-a65a-46d2-ac68-92fee1f9e54f)
- 16) Y. Sakuratani, Y. Noguchi, K. Kobayashi, J. Yamada and T. Nishihama: Molecular size as a limiting characteristic for bioconcentration in fish. *J. Environ. Biol.* **29**, 89-92 (2008).
- 17) A. Opperhuizen, E. W. Volde, F. A. P. C. Gobas, D. A. K. Liem and J. M. D. Steen: Relationship Between Bioconcentration in Fish and Steric Factor of Hydrophobic Chemicals. *Chemosphere.* **14**, 1871-1896 (1985).
- 18) F. Grisoni, V. Consonni, S. Villa, M. Vighi and R. Todeschini: Molecular Size Cutoff Criteria for Screening Bioaccumulation Potential: Fact or Fiction?

- Chemosphere*. **127**, 171-179 (2015).
- 19) 薬生発 0701 第 1 号、20190619 製局第 2 号、環保企発第 1907011 号: 「既に得られているその組成、性状等に関する知見」としての取扱いについて (最終改正令和元年 7 月 1 日) [http://www.env.go.jp/chemi/laws\\_r01070152\\_1.pdf](http://www.env.go.jp/chemi/laws_r01070152_1.pdf)
  - 20) 厚生労働省, 経済産業省, 環境省: 新規化学物質の生物蓄積性の類推等に基づく判定について (お知らせ) (平成 25 年 9 月 27 日)  
[https://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/kasinhou/files/todoke/shinki/130927\\_seibutsuchikuseki.pdf](https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/todoke/shinki/130927_seibutsuchikuseki.pdf)
  - 21) D. Mackay, J. A. Arnot, F. A. P. C. Gobas and D. E. Powell: Mathematical relationships between metrics of chemical bioaccumulation in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **32**, 1459-1466 (2013).
  - 22) ECHA: Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.7c: Endpoint specific guidance. version 3.0. European Chemicals Agency, Helsinki, Finland. (2017).  
[https://echa.europa.eu/documents/10162/17224/information\\_requirements\\_r7c\\_en.pdf/e2e23a98-adb2-4573-b450-cc0dfa7988e5?t=1498476107907](https://echa.europa.eu/documents/10162/17224/information_requirements_r7c_en.pdf/e2e23a98-adb2-4573-b450-cc0dfa7988e5?t=1498476107907)
  - 23) S. D. Dimitrov, N. C. Dimitrova, J. D. Walker, G. D. Veith and O. G. Mekenyan: Predicting bioconcentration factors of highly hydrophobic chemicals. Effects of molecular size. *Pure Appl. Chem.* **74**, 1823-1830 (2002).
  - 24) A. Södergren: Solvent filled dialysis membranes simulate uptake of pollutants by aquatic organisms. *Environ. Sci. Technol.* **21**, 855-859 (1987).
  - 25) J. N. Huckins, M. W. Tubergen and G. K. Manuweer: Semipermeable membrane devices containing model lipids: a new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioaccumulation potential. *Chemosphere* **20**, 533-552 (1990).
  - 26) L. Grippo and S. Lucidi: A globally convergent version of the Polak-Ribiere conjugate gradient method. *Math. Program.* **78**, 375-391 (1997).
  - 27) J. A. Arnot and F. A. P. C. Gobas: A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* **22**, 337-345 (2003).

- 28) D. Wijk, R. Che´nier, T. Henry, M. D. Hernando and C. Schulte: Integrated Approach to PBT and POP Prioritization and Risk Assessment. *Integr. Environ. Assess.* **5**, 697-711 (2009).
- 29) S. Jacobi, B. Brown, M. Claessens, I. Colombo, M. Embry, J. Franklin, B. Hidding, M. L. Paumen, N. McGrath, C. Miyata, K. Woodburn and H. Vrijhof: Information to be considered in a weight-of-evidence-based PBT/vPvB assessment of chemicals (Annex XIII of REACH). *ECETOC Special Report No. 18* (2014).
- 30) Regulation (EC) No 1907/2006 - Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)  
<https://osha.europa.eu/en/legislation/directives/regulation-ec-no-1907-2006-of-the-european-parliament-and-of-the-council> (Accessed 10 Sep., 2020).
- 31) ECHA: REGULATION (EC) No 1907/2006 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 18 December 2006 (2006).  
<https://osha.europa.eu/en/legislation/directives/regulation-ec-no-1907-2006-of-the-european-parliament-and-of-the-council>
- 32) J. W. Nichols, M. Bonnell, S. D. Dimitrov, B. I. Escher and X. Han: Bioaccumulation Assessment Using Predictive Approaches. *Integr. Environ. Assess. Manage.* **5**, 577-597 (2009).
- 33) S. Nakai, K. Takano and S. Saito: Bioconcentration Prediction under the Amended Chemical Substances Control Law of Japan. *R&D Report SUMITOMO KAGAKU*. 2006-I (2006).
- 34) Y. Sakuratani, Y. Noguchi, K. Kobayashi, J. Yamada and T. Nishihama: Molecular size as a limiting characteristic for bioconcentration in fish. *J. Environ. Biol.* **29**, 89-92 (2008).
- 35) A. V. Weisbrod, L. P. Burkhard, J. Arnot, O. Mekenyan, P. H. Howard, C. Russom, R. Boethling, Y. Sakuratani, T. Traas, T. Bridges, C. Lutz, M. Bonnell, K. Woodburn and T. Parkerton: Workgroup Report: Review of Fish Bioaccumulation Databases Used to Identify Persistent, Bioaccumulative, Toxic Substances. *Environ. Health Perspect.* **115**, 255–261 (2007).
- 36) S. D. Dimitrov, N. C. Dimitrova, J. D. Walker, G. D. Veith and O. G. Mekenyan:

- Bioconcentration potential predictions based on molecular attributes – an early warning approach for chemicals found in humans, birds, fish and wildlife. *QSAR Comb. Sci.* **22**, 58-68 (2003).
- 37) ECHA: Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Part C: PBT/vPvB assessment. Version 2.0. European Chemicals Agency, Helsinki, Finland. (2014).  
[https://echa.europa.eu/documents/10162/17235/information\\_requirements\\_part\\_c\\_en.pdf/e56a6015-807e-46eb-b808-e5a7dc9fd572](https://echa.europa.eu/documents/10162/17235/information_requirements_part_c_en.pdf/e56a6015-807e-46eb-b808-e5a7dc9fd572)
- 38) D. N. Brooke and M. J. Crookes: Calculation of molecular dimensions related to indicators for low bioaccumulation potential. Science report SCHO0109BPGT-E-P. Environment Agency, Bristol, UK. (2009).
- 39) O.Mekenyan, D.Dimitrov, N.Nikolova and S.Karabunarliev: Conformational Coverage by a Genetic Algorithm. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **39**, 997-1016 (1999).
- 40) G. Chang, W. C. Guida and W. C. Still: An internal-coordinate Monte Carlo method for searching conformational space. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 4379-4386 (1989).
- 41) A. Hocquet and M. Langgard: An Evaluation of the MM+ Force Field. *Mol. Model.* **4**, 94-112 (1998).
- 42) L. Grippo and S. Lucidi: A globally convergent version of the Polak-Ribiere conjugate gradient method. *Math. Program.* **78**, 375-391 (1997).
- 43) H. Sun: COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds. *J. Phys. Chem. B* **102**, 7338-7364 (1998).
- 44) S. Nosé: A unified formulation of the constant temperature molecular-dynamics methods. *J. Chem. Phys.* **81**, 511–519 (1984).
- 45) W.G. Hoover: Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys. Rev. A* **31**, 1695-1697 (1985).
- 46) H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola and J. R. Haak: Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684–3690 (1984).
- 47) A. Bondi: van der Waals Volumes and Radii. *J. Phys. Chem.* **68**, 441–451 (1964).

- 48) K. Ishihata: *JPSJ Magazine*. 43, 1009-1015 (2002).
- 49) National Institute of Technology and Evaluation: The result of bioconcentration. (judged from 1974 to 1986). <https://www.nite.go.jp/data/000022750.xlsx> (Accessed 31 May., 2021).
- 50) National Institute of Technology and Evaluation: The result of bioconcentration (judged from 1987 to 2017). <https://www.nite.go.jp/data/000108118.xlsx> (Accessed 31 May., 2021).
- 51) OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997).  
<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>
- 52) National Institute of Technology and Evaluation: Prediction of bioconcentration by category approach. [https://www.nite.go.jp/chem/qsar/category\\_approach.html](https://www.nite.go.jp/chem/qsar/category_approach.html) (in Japanese). (Accessed 31 May., 2021).
- 53) Y.Ikenaga, Y.Sakuratani and J.Yamada: Evaluation of Bioconcentration Factors by Category Approach for Chemicals. National Institute of Technology and Evaluation. <https://www.nite.go.jp/data/000064116.pdf> (Accessed 31 May., 2021).
- 54) J. W. Martin, Sa.A. Mabury, K. R. Solomon and D. C.G. Muir: Progress toward understanding the bioaccumulation of perfluorinated alkyl acids. *Environ. Toxicol. Chem.* **32**, 2421–2423 (2013).
- 55) C. A. Ng and K.Hungerbühler: Bioconcentration of perfluorinated alkyl acids: How important is specific binding? *Environ. Sci. Technol.* **47**, 7214–7223 (2013).
- 56) C. A. Ng and K.Hungerbühler: Bioaccumulation of Perfluorinated Alkyl Acids: Observations and Models. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 4637-4468 (2014).
- 57) N.Yakata, Y.Sudo and H.Tadokoro: Influence of dispersants on bioconcentration factors of seven organic compounds with different lipophilicities and structures. *Chemosphere* **64**, 1885-1891 (2006).
- 58) OECD Series on Testing and Assessment Number 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris. (2018).  
<https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-on-aquatic-toxicity->

testing-of-difficult-substances-and-mixtures\_0ed2f88e-en

- 59) C.Miyata, Y. Matoba, M.Mukumoto, Y. Nakagawa and H. Miyagawa: Criterion of molecular size to evaluate the bioaccumulation potential of chemicals in fish. *J. Pestic. Sci.* doi: 10.1584/jpestics.D21-030 (2022).
- 60) Chemical Evaluation and Research Institute, Japan: Report on the project commissioned by Japan METI in 2016.  
[https://www.meti.go.jp/meti\\_lib/report/H28FY/000058.pdf](https://www.meti.go.jp/meti_lib/report/H28FY/000058.pdf) (in Japanese).
- 61) T. H. Wilson and G. Wiseman: The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J. Physiol.* **123**, 116-125 (1954).
- 62) M. A. Alam, F. I. Al-Jenoobi and A. M. Al-Mohizea: Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications. *J. Pharm. Pharmacol.* **64**, 326-336 (2012).
- 63) P. A. Billat, E. Roger, S. Faure and F. Lagarce: Models for drug absorption from the small intestine: where are we and where are we going? *Drug Discov. Today.* **22**, 761-775 (2017).
- 64) K. L. Hamilton: Even an old technique is suitable in the molecular world of science: the everted sac preparation turns 60 years old. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **306**, 715-721 (2014).
- 65) K. L. Hamilton and A. G. Butt: Glucose transport into everted sacs of the small intestine of mice. *Adv. Physiol. Educ.* **37**, 415–426 (2013).
- 66) J. C. Ellory, B. Lahlou and M. W. Smith: Changes in the intestinal transport of sodium induced by exposure of goldfish to a saline environment. *J. Physiol.* **222**, 497-509 (1972).
- 67) K. M. Kleinow, B. D. Johnston, E. P. Holmes and M. E. McCarroll: Rhodamine 123 permeability through the catfish intestinal wall: relationship to thermal acclimation and acute temperature change. *Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **144**, 205-215 (2016).

- 68) G. A.šmonaitė, H. Sundh, N. Asker and B. C. Almroth: Rainbow Trout Maintain Intestinal Transport and Barrier Functions Following Exposure to Polystyrene Microplastics. *Environ. Sci. Technol.* **52**, 14392-14401 (2018).
- 69) S. Gelder, H. Sundh, T. N. M. Pelgrim, J. D. Rasinger, L. Daal, G. Flik, M. H. G. Berntssen and P. H. M. Klaren: Transepithelial transfer of phenanthrene, but not of benzo[a]pyrene, is inhibited by fatty acids in the proximal intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C.* **204**, 97-105 (2018).
- 70) J. McGeer, G. Henningsen, R. Lanno, N. Fisher, K. Sappington and J. Drexler: Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals. U.S. Environmental Protection Agency (2004)
- 71) J. C. McGeer, K. V. Brix, J. M. Skeaff, D. K. DeForest, S. I. Brigham, W. J. Adams, and A. Green: Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: Implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, 1017–1037 (2003).
- 72) National Institute of Technology and Evaluation: NITE Chemical Risk Information Platform. [https://www.nite.go.jp/en/chem/chrip/chrip\\_search/systemTop](https://www.nite.go.jp/en/chem/chrip/chrip_search/systemTop) (Accessed 1 July., 2021).
- 73) S. Gelder, H. Sundh, T. N. M. Pelgrim, J. D. Rasinger, L. Daal, G. Flik, M. H. G. Berntssen and P. H. M. Klaren: Transepithelial transfer of phenanthrene, but not of benzo[a]pyrene, is inhibited by fatty acids in the proximal intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C.* **204**, 97-105 (2018).
- 74) P. Artursson, A. L. Ungell and J. E. Löfroth: Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm. Res.* **10**, 1123 (1993).
- 75) G. Camenisch, J. Alsenz, H. van de Waterbeemd and G. Folkers: Estimation of

- permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *Eur. J. Pharm. Sci.* **6**, 317 (1998).
- 76) P. Matsson and J. Kihlberg: How Big Is Too Big for Cell Permeability? *J. Med. Chem.* **60**, 1662 (2007).
- 77) R. Anliker, P. Moser and D. Poppinger: Bioaccumulation of dyestuffs and organic pigments in fish. Relationships to hydrophobicity and steric factors. *Chemosphere* **17**, 1631-1644 (1988).
- 78) V. Zitko and O. Hutzinger: Uptake of chloro- and bromobiphenyls, hexachloro- and hexabromobenzene by fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **16**, 665 (1976).
- 79) J. A. Arnot and L. Quinn: Development and evaluation of a database of dietary bioaccumulation test data for organic chemicals in fish. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 4783 (2015).
- 80) D. Mackay, J. A. Arnot, F. A. P. C. Gobas and D. E. Powell: Mathematical relationships between metrics of chemical bioaccumulation in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **32**, 1459-1466 (2013).
- 81) W. M. Meylan, P. H. Howard and R. S. Boethling: Improved Method for Estimating Bioconcentration / Bioaccumulation Factor from Octanol/Water Partition Coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 664-672 (1999).
- 82) J. A. Arnot, D. Mackay D and M. Bonnell: Estimating metabolic biotransformation rates in fish from laboratory data. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**, 341-351 (2008)
- 83) J. A. Arnot, W. Meylan, J. Tunkel, P. H. Howard, D. Mackay, M. Bonnell and R. S. Boethling: A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **28**, 1168-77 (2009)
- 84) E. Papa, L. van der Wal, J. A. Arnot and P. Gramatica: Metabolic biotransformation half-lives in fish: QSAR modeling and consensus analysis. *Sci. Total. Environ.* 470-471, 1040-1046 (2014)

- 85) H. Li, J. S. X. Fan, X. Sui, L. Zhang, Y. Wang and Z. He: Considerations and recent advances in QSAR models for cytochrome P450-mediated drug metabolism prediction. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **22**, 843-55 (2008).
- 86) E. Papa, A. Sangion, J. A. Arnot and P. Gramatica: Development of human biotransformation QSARs and application for PBT assessment refinement. *Food. Chem. Toxicol.* **112**, 535-543 (2018).
- 87) A. Pirovano, S. Brandmaier, M. A. J. Huijbregts, A. M. J. Ragas, K. Veltman and A. J. Hendriks: QSARs for estimating intrinsic hepatic clearance of organic chemicals in humans. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **42**, 190-7 (2016)
- 88) V. B. Siramshetty, P. Shah, E. Kerns, K. Nguyen, K. R. Yu, M. Kabir, J. Williams, J. Neyra, N. Southall, Đ. T. Nguyễn and X. Xu: Retrospective assessment of rat liver microsomal stability at NCATS: data and QSAR models. *Scientific Reports.* **10**, 20713 (2020).
- 89) U.S. Environmental Protection Agency: EPI Suite™ - Estimation Program Interface v4.11. <https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/download-epi-suitetm-estimation-program-interface-v411>
- 90) P. Fasinu, P. J. Bouic, B. Rosenkranz: Liver-based in vitro technologies for drug biotransformation studies - a review. *Curr. Drug. Metab.* **13**, 215-224 (2012)
- 91) P. M. Whalley M. Bartels, K. S. Bentley, M. Corvaro, D. Funk, M. W. Himmelstein, B. Neumann, C. Strupp, F. Zhang and J. Mehta: An in vitro approach for comparative interspecies metabolism of agrochemicals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **88**, 322-327 (2017).
- 92) J.W. Nichols, I.R. Schultz and P.N. Fitzsimmons: In vitro–in vivo extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish. I. A review of methods, and strategies for incorporating intrinsic clearance estimates into chemical kinetic models. *Aquat. Toxicol.* **78**, 74-90 (2006).
- 93) W. DeWolf, M. Comber, P. Douben, S. Gimeno, M. Holt, M. Leonard, A. Lilicrap, D. Sijm, R. van Egmond, A. Weisbrod and G. White: Animal use replacement, reduction and refinement: development of an integrated testing strategy for

- bioconcentration of chemicals in fish. *Integrat. Environ. Assess. Mgt.* **3**, 3-17 (2007).
- 94) X. Han, D. L. Nabb, R. T. Mingoia and C-H. Yang: Determination of Xenobiotic intrinsic clearance in freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat and its application to bioaccumulation. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 3269-3276 (2007).
- 95) C.E. Cowan-Ellsberry, S.D. Dyer, S. Erhardt, M.J. Bernhard, A. Roe, M.E. Dowty and A.V. Weisbrod: Approach for extrapolating in vitro metabolism data to refine bioconcentration factor estimates. *Chemosphere* **10**, 1804-1817 (2008).
- 96) OECD guideline for testing chemicals 319A: Determination of in vitro intrinsic clearance using cryopreserved rainbow trout hepatocytes (RT HEP) (2018). <https://www.oecd.org/publications/test-no-319a-determination-of-in-vitro-intrinsic-clearance-using-cryopreserved-rainbow-trout-hepatocytes-rt-hep-9789264303218-en.htm>
- 97) OECD guideline for testing chemicals 319B: Determination of in vitro intrinsic clearance using rainbow trout liver S9 sub cellular fraction (RT S9) (2018). [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-319b-determination-of-in-vitro-intrinsic-clearance-using-rainbow-trout-liver-s9-sub-cellular-fraction-rt-s9\\_9789264303232-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-319b-determination-of-in-vitro-intrinsic-clearance-using-rainbow-trout-liver-s9-sub-cellular-fraction-rt-s9_9789264303232-en)
- 98) OECD guidance document on the determination of in vitro intrinsic clearance using cryopreserved hepatocytes (RT-HEP) or liver S9 sub-cellular fractions (RT-S9) from rainbow trout and extrapolations to in vivo intrinsic clearance. Series on testing and assessment No. 280 (2018). [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2018\)12&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2018)12&doclanguage=en)
- 99) F. A. P. C. Gobas, and H. A. Morrison: Bioconcentration and Biomagnification in the Aquatic Environment, in Boethling R. S. and Mackay, D. (Ed.), *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals: Environmental and Health Sciences*, CRC Press, Boca Raton (USA) (2000).
- 100) J. W. Nichols, D. B. Huggett, J. A. Arnot, P. N. Fitzsimmons, and C. E. Cowan-

- Ellsberry: Towards improved models for predicting bioconcentration of well-metabolized compounds by rainbow trout using measured rates of in vitro intrinsic clearance. *Environ. Toxicol. Chem.* **32**, 1611-1622 (2013).
- 101) P. Echenique and J. L. Alonso: A mathematical and computational review of Hartree-Fock SCF methods in Quantum Chemistry. *Mol. Phys.* **105**, 3057-3098 (2007).
- 102) 堀尾 武一, 高河原 勇, 山内 惇一, 吉村 世都子: 酵素活性の反応速度論的解析. *臨床化学* **5**, 1 (1976).
- 103) D. L. Nabb, R. T. Mingoia, C-H. Yang and X. Han: Comparison of basal level metabolic enzyme activities of freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat. *Aquat. Toxicol.* **80**, 52-59 (2006).
- 104) J. Weeks, A. P. Li, U. Doshi, K. Johanning and P. D. Guiney: In vitro evaluation of the metabolic stability of nine fragrance chemicals in trout and human hepatocytes. *J. Appl. Toxicol.* **40**, 1-14 (2020).
- 105) S. R. Black, J. W. Nichols, K. A. Fay, S. R. Matten and S. G. Lynn: Evaluation and comparison of in vitro intrinsic clearance rates measured using cryopreserved hepatocytes from humans, rats, and rainbow trout. *Toxicology* **457**, 152819 (2021).
- 106) J. C. Lo, G. N. Allard, S. V. Otton, D. A. Campbell and F. A. P. C. Gobas: Concentration dependence of biotransformation in fish liver S9: Optimizing substrate concentrations to estimate hepatic clearance for bioaccumulation assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **34**, 2782-90 (2015).
- 107) L. J. Saunders, S. Fontanay, J. W. Nichols and F. A. P. C. Gobas: Concentration dependence of in vitro biotransformation rates of hydrophobic organic sunscreen agents in rainbow trout S9 fractions: Implications for bioaccumulation assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **38**, 548-560 (2019).
- 108) Y. Tezuka, K. Takahashi, T. Suzuki, S. Kitamura, S. Ohta, S. Nakamura, and T. Mashino: Novel metabolic pathways of p-n-nonylphenol catalyzed by cytochrome p450 and estrogen receptor binding activity of new metabolites. *J. Health Sci.* **53**,

- 552–561 (2007).
- 109) S. Nomura, T. Daidoji, H. Inoue, and H. Yokota: Differential metabolism of 4-n- and 4-tert-octylphenols in perfused rat liver. *Life Sciences*. **83**, 223–228 (2008).
- 110) L. J. Saunders, S. Fontanay, J. W. Nichols and F. A. P. C. Gobas: Concentration dependence of in vitro biotransformation rates of hydrophobic organic sunscreen agents in rainbow trout S9 fractions: Implications for bioaccumulation assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **38**, 548-560 (2019).
- 111) B. I. Escher, C. E. Cowan-Ellsberry, S. Dyer, M. R. Embry, S. Erhardt, M. Halder, J. –H. Kwon, K. Johanning, M. T. T. Oosterwijk, S. Rutishauser, H. Segner, and J. Nichols: Protein and lipid binding parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) blood and liver fractions to extrapolate from an in vitro metabolic degradation assay to in vivo bioaccumulation potential of hydrophobic organic chemicals. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 1134-1143 (2011).
- 112) J. W. Nichols, M. A. Ladd, and N. Fitzsimmons: Measurement of kinetic parameters for biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by trout liver S9 fractions: implications for bioaccumulation assessment. *Appl. In Vitro Toxicol.* **4**, 365– 378 (2008).
- 113) X. Han, D. L. Nabb, C. H. Yang, S. I. Snajdr and R. T. Mingoia: Liver microsomes and S9 from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): comparison of basal-level enzyme activities with rat and determination of xenobiotic intrinsic clearance in support of bioaccumulation assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **28**, 481– 488 (2009).
- 114) Y. S. Lee, J. C. Lo, S. V. Otton, M. M. Moore, C. J. Kennedy, and F. A. P. C. Gobas: In vitro to in vivo extrapolation of biotransformation rates for assessing bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in mammals. *Environ. Toxicol. Chem.* **36**, 1934– 1946 (2017).
- 115) S. Krause and K. U. Goss: In vitro - in vivo extrapolation of hepatic metabolism for different scenarios - a toolbox. *Chem. Res. Toxicol.* **31**, 1195– 1202 (2018).
- 116) H. Laue, L. Hostettler, R. P. Badertscher, K. J. Jenner, G. Sanders, J. A. Arnot and A. Natsch: Examining uncertainty in in vitro–in vivo extrapolation applied in fish

- bioconcentration models. *Environ. Sci. Technol.* **54**, 9483–9494. (2020).
- 117) Y. S. Lee, J. C. Lo, S. V. Otton, M. M. Moore, C. J. Kennedy, and F. A. P. C. Gobas: In vitro to in vivo extrapolation of biotransformation rates for assessing bioaccumulation of hydrophobic organic chemicals in mammals. *Environ. Toxicol. Chem.* **36**, 1934–1946 (2017).
- 118) C. G. Gomez, L. Constantine, M. Moen, A. Vaz, W. Wang, and D. B. Huggett: Ibuprofen metabolism in the liver and gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **86**, 247–251 (2011).

## 謝辞

本研究を通じ、多数のご助言とご協力を賜りました皆様に感謝申し上げます。  
特に本研究の遂行および論文の取りまとめに当たり、懇切なご指導と丁寧なご高閲を賜りました京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 生物調節化学分野 宮川恒教授と中川好秋前准教授に心より御礼申し上げます。

個々の研究を進めるに当たり、多大なご配慮を賜ると共に様々なご指導、ご助言を下さいました住友化学株式会社生物環境科学研究所フェロー的場好英博士ならびに化学品評価グループマネージャー棕本麻記子氏に厚く御礼申し上げます。また、第2章の量子化学計算に関してご助言をくださいました、住友化学株式会社齋藤昇二博士ならびに仲井俊司氏に心より感謝申し上げます。竹植悠氏には第3章の実験にご協力頂き感謝申し上げます。

以上全ての関係の皆様のご協力、ご支援に謹んで心より御礼申し上げます。

## 本研究に関する原著論文

- 1) C. Miyata, Y. Matoba, M. Mukumoto, Y. Nakagawa and H. Miyagawa: Criterion of molecular size to evaluate the bioaccumulation potential of chemicals in fish. *Journal of Pesticide Science*. doi: 10.1584/jpestics.D21-030 (2022).
- 2) C. Miyata, Y. Matoba, M. Mukumoto, Y. Nakagawa and H. Miyagawa: Permeability of fish intestinal membrane to bulky chemicals. *Journal of Pesticide Science*. Accepted (2022).
- 3) C. Miyata, Y. Matoba, M. Mukumoto, Y. Nakagawa and H. Miyagawa: Refinement of bioconcentration factors of alkylphenols considering *in vitro* biotransformation rates in fish liver S9 fraction. In preparation.