

# 反復投与毒性の評価のための 統計学的・数理科学的アプローチによる 客観的なリードアクロス手法の開発

代表研究者：吉成浩一（静岡県大薬学部）

分担研究者：竹下潤一（産総研安全科学研究部門）  
：鈴木知道（東京理科大理工学部）

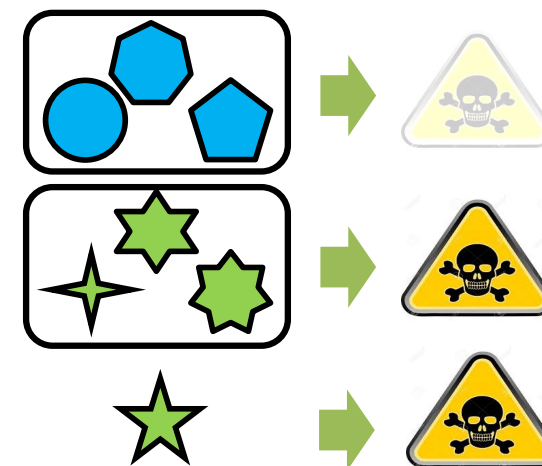


- 化学物質の安全性は主に動物実験の結果を基に評価されているが、動物実験代替法の開発が強く求められている。
- EUでの動物実験が行われた化粧品完成品、原料及び配合原料の販売禁止（2013年）、米国環境保護庁による哺乳類を用いた試験の要求及び研究費補助の30%削減（2025年まで）並びに全廃（2035年まで）の発表など、その流れは加速している。
- しかし、安全性評価、特に全身毒性評価に重要な反復投与毒性では、その毒性の多様さ、複雑さなどの理由から動物実験代替法の開発は全く進んでいない。
- このような複雑な毒性では、グルーピングアプローチ（カテゴリーアプローチ）とリードアクロスによる評価に期待が寄せられている。

# カテゴリーアプローチとリードアクロス

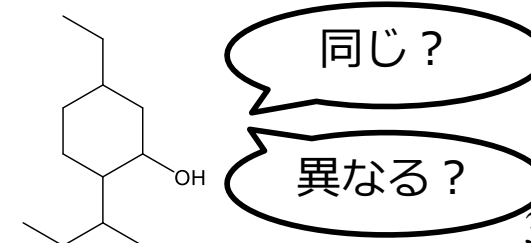
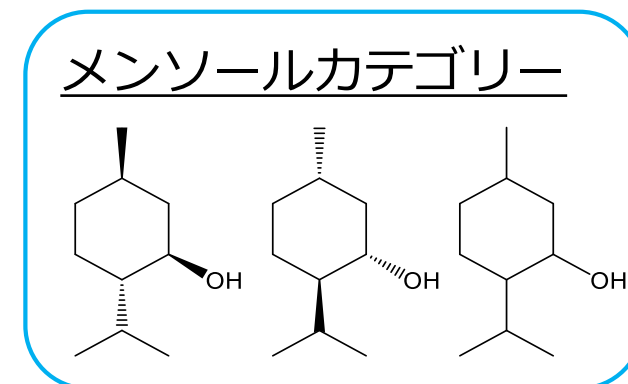


- 化学構造や生物学的特徴が類似した化学物質群を**グルーピング**し、そのグルーピングに基づき**毒性評価**を行う。
- 被験物質（未評価）と同じグループに属する物質の**毒性試験結果**から、被験物質の**毒性を類推（リードアクロス）**する。



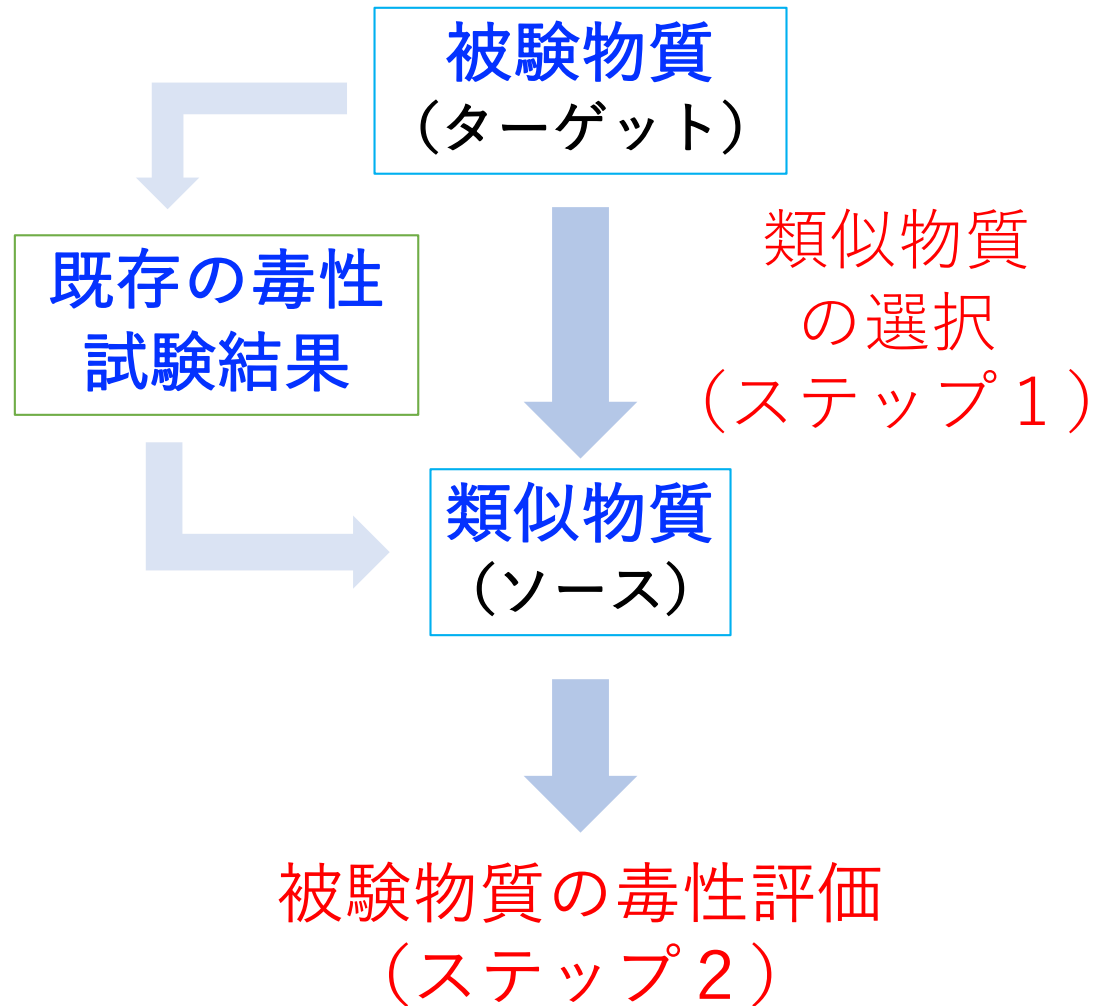
## 既存の手法における問題点

- 類似性は人が判断→**主観的であり再現性に問題あり**
- 類似性判断に実験データも利用されつつある→**どのような実験データを用いるべきか不明瞭**
- 被験物質がいずれのグループにも当てはまらない**可能性**





## リードアクロス手法の概略



### 課題

#### ステップ1

- どんな指標で類似性を判断？
- 化学構造のみ？  
生物学的情報が必要？  
機序の情報は必要？
- どの程度までが似てる物質？
- いくつの類似物質が必要？

#### ステップ2

- 判断基準は？
- 毒性の有無：多数決？1つでもあれば有害？
- LOAEL/NOAELの評価？

■ 客観的なリードアクロスの実施には、検討すべき項目が多い。



HESS等のラット反復投与毒性試験データベースを参照データベースとして、被験物質の化学構造情報やインビトロ試験データから参照データベース内の類似物質を同定し、同定した類似物質から被験物質の毒性を予測する手法を開発する。

「毒性」には、以下の2つを設定する

1. 肝毒性、腎毒性、血液毒性、神経毒性、呼吸器毒性などの**主要臓器毒性の有無**、又はその毒性の程度 (NO(A)EL)
2. 上記**臓器毒性のパターン**



## 1. データセット整備、エンドポイント（EP）設定

- ラット反復投与毒性試験データ整理：HESS、REACHデータの利用
- EPの整理によるグループEPの設定

## 2. 分子記述子を利用した類似性評価と毒性評価

- 分子記述子の種類の検討
- 類似性評価手法（物質間距離の種類）の検討
- 類似物質（ソース物質）数及び判定基準の検討
- 統計学的・数理科学的アプローチによる変数選択手法の検討

## 3. インビトロ試験の実施

- 薬物代謝酵素反応性試験
- ラット肝細胞を用いたフェノタイピング試験、等

## 4. インシリコ、インビトロデータを統合したリードアクロスの実施

- 変数選択とケーススタディの繰り返しによる最適化
- 他のデータセット（異なる物質群、試験期間）での検討



- HESS搭載物質（326物質）を利用
- 肝毒性、血液毒性の有無を予測
- 分子記述子のユークリッド距離による類似性評価
- 記述子の種類とソース化合物数が、毒性一致率に及ぼす影響を解析



## 被験物質

- HESSに含まれる326物質を使用
- **32物質**を被験物質としてランダムに選択
- 残りの294物質を参照物質（ソース物質の候補）として使用

## 毒性試験情報

- 雄性ラットの28日間/42日間反復投与毒性試験データを使用
- 類似所見をグループ化し、**グループエンドポイント (gEP)**を定義（次スライド）
- 6種の肝毒性関連gEP、2種の血液毒性関連gEPを使用
- ある化合物について、あるgEPに含まれる所見のいずれかでLOELが報告されていた（陽性であった）場合、その化合物はそのgEPで陽性と判断



# グループエンドポイント (gEP)



Target organ	ID	Description	Positive ratio
肝臓 Liver	LV01	細胞死/炎症 Cell death/inflammation	31.6%
	LV02	肝機能低下 Reduced liver function	18.7%
	LV03	肝機能亢進 Enhanced liver function	27.0%
	LV04	胆管障害 Bile duct-associated lesion	37.7%
	LV05	肥大 Hypertrophy	54.9%
	LV06	脂質代謝異常 Dyslipidemia	44.2%
血液 Blood	BL01	凝固障害 Coagulopathy	20.6%
	BL02	貧血 Anemia	29.8%

- 6種の肝毒性関連gEP、2種の血液毒性関連gEP
- 陽性率：gEPにより偏りあり（18%～55%）



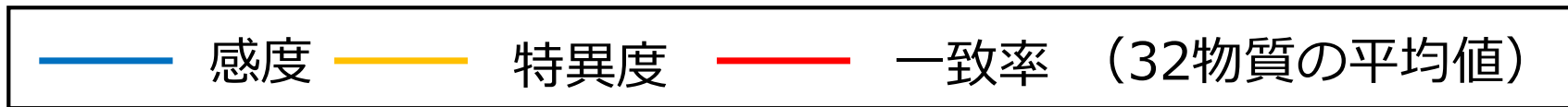
## 分子記述子

- 二次元構造（SMILES）に基づきalvaDescソフトウェアを利用して分子記述子を計算
- 計算可能な3000程度の記述子のうち、化学構造との関連が分かりやすい6グループの記述子セットを使用
- ①相関の高い（ $>0.9$ ）記述子を削除したセット、②各gEPと関連性が高い記述子を選択したセット、で比較

## ソース物質選択とリードアクロス

- 記述子の値を正規化し、物質間のユークリッド距離を計算
- 各被験物質と近い5～11物質をソース物質として選択
- 32被験物質の各gEPの有無を、ソース物質のデータから予測：①過半数、②各gEPの陽性率を閾値として評価

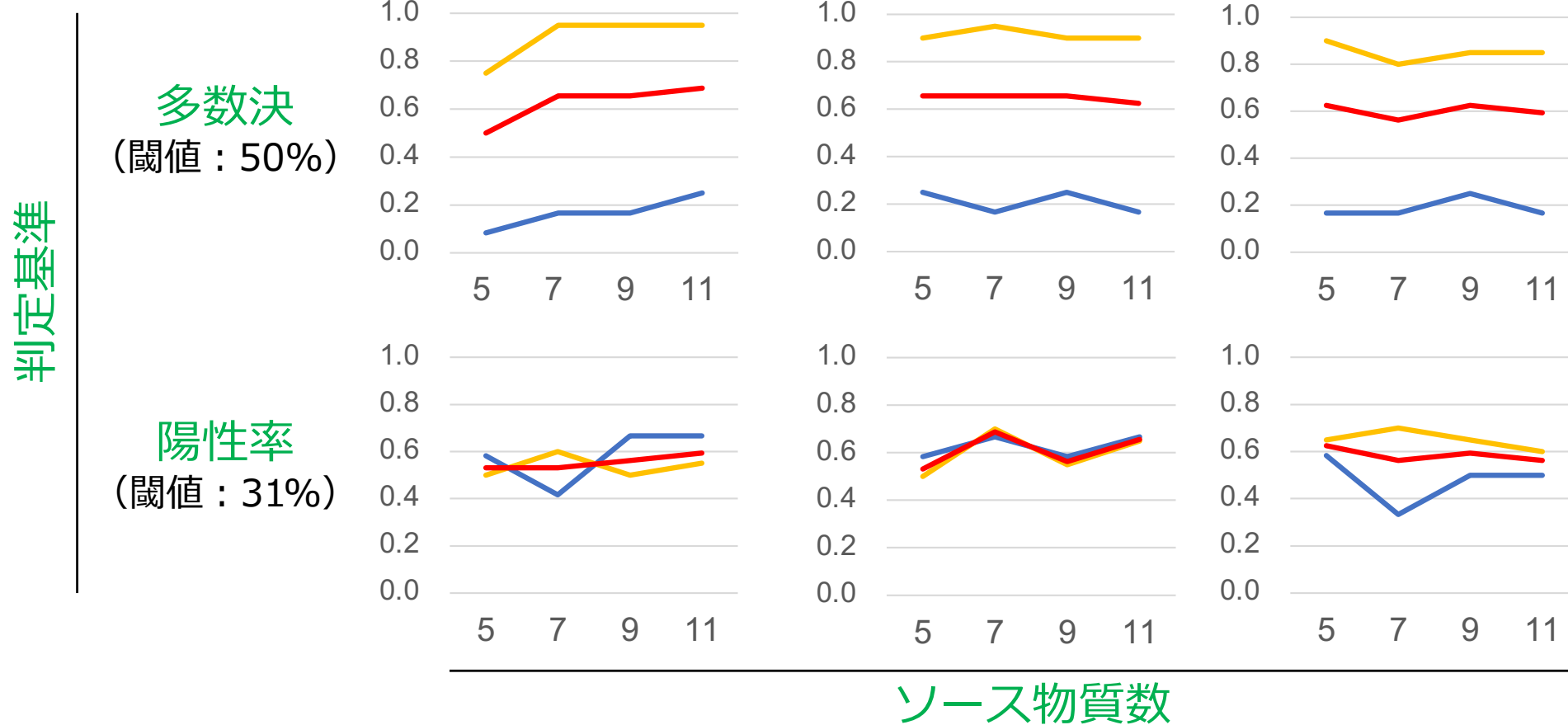
# 結果の例：LV01（肝細胞死・炎症）



記述子選択： 相関係数 < 0.9  
(205種)

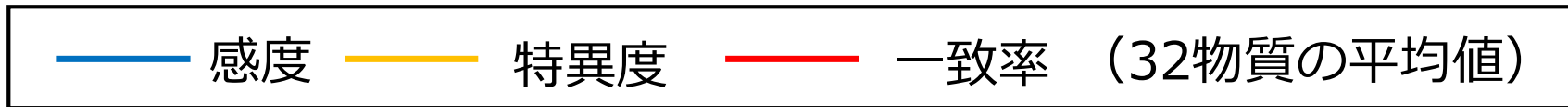
$P < 0.10$   
(31種)

$P < 0.20$   
(76種)



- 特異度は高いが、感度は低かった。その傾向は多数決判断で顕著であった。
- 記述子の種類による大きな影響は認められなかった。

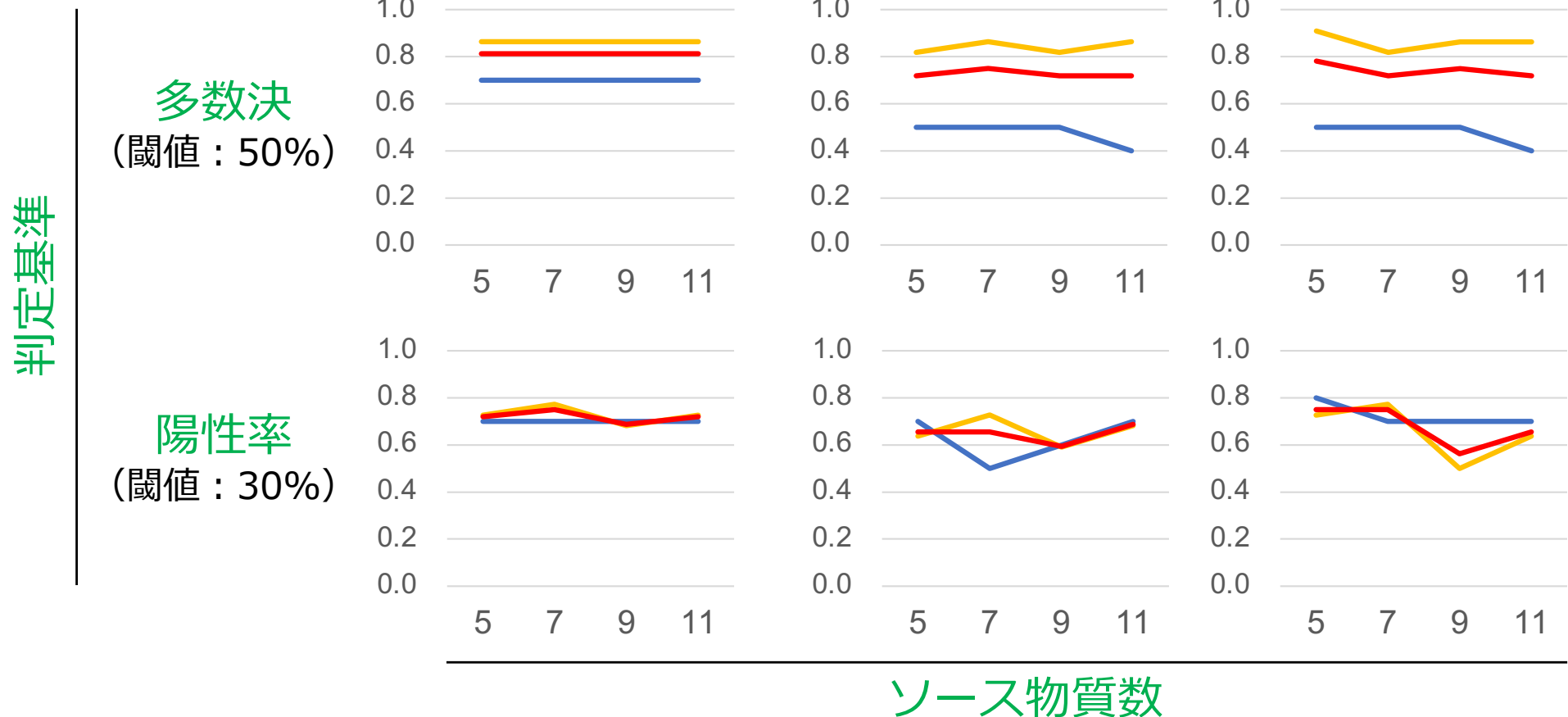
# 結果の例：BL02（貧血）



記述子選択： 相関係数 < 0.9  
(205種)

$P < 0.10$   
(75種)

$P < 0.20$   
(118種)



- 特異度は高いが、感度は低かった。その傾向は多数決判断で顕著であった。
- 多数決判断では、相関係数に基づく記述子選択でより高い精度が得られた。



- HESSに搭載されている326物質を対象に、分子記述子を用いたリードアクロスによる肝毒性及び血液毒性の評価を実施した。
- 用いる記述子の種類、ソース物質数、判定基準（閾値）の毒性評価への影響を解析したところ、判定基準は、多くのgEPにおいて予測精度に大きな影響を与えることが明らかになった。一方、記述子の種類やソース物質数の影響は、毒性gEPの種類により異なった。
- 今後、データベース物質数、gEPの種類、分子記述子数を拡大し、同様の解析を行う。
- ケーススタディを繰り返して適切な変数や物質間距離（e.g. ユークリッド距離/p-ミンコフスキー距離、コサイン距離、拡張Jaccard距離）を選択し、リードアクロスによる毒性予測手法の確立を目指す。