

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（静岡県立大学薬学部） 分担研究者：竹下潤一（産総研安全科学研究部門）、鈴木知道（東京理科大学創域理工学部）

背景・目的

化学物質の安全性評価において動物実験代替法の開発が強く求められているが、安全性評価に重要な反復投与毒性に関しては、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の評価には、既存の毒性試験データを活用し、類似物質（ソース物質）の毒性情報から毒性未知物質（被験物質/ターゲット物質）の毒性を予測するリードアクロス（RAX）が有用と考えられており、欧米ではケーススタディ研究が行われるとともにガイダンス等の策定も進んでいる。しかし、既存のRAX手法では、類似物質の選択が主観的であり、再現性の問題も指摘されている。そこで本研究では、化学構造情報とインビトロ試験を利用した反復投与毒性評価のための客観的なRAX手法の開発を最終目的とした。RAXおよび本研究の概略と課題を右図に示す。

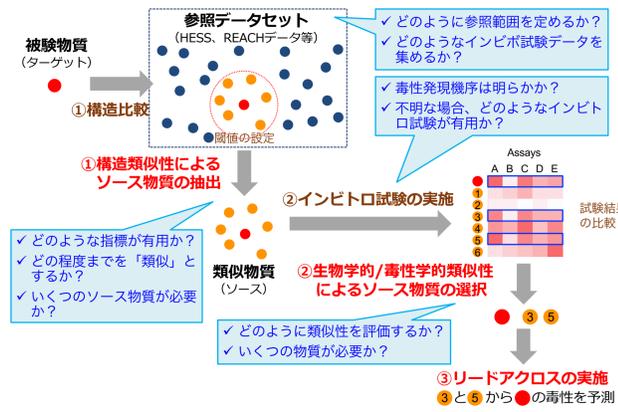
これまでの研究において、化学構造情報（分子記述子）を利用した肝及び血液毒性の8種のエンドポイント（EP）に対するRAXについて条件検討を行い、①毒性に関連した分子記述子を選択することでいく

つかのEPで毒性判定精度が向上すること、②ソース物質の選択範囲の制限（類似性の閾値の設定）やソース物質数の制限により毒性判定精度が向上すること、③分子記述子の正規化手法は物質間距離（類似性評価指標）に影響を及ぼし、その程度は用いる距離の種類により異なることを明らかにした。

さらに、インビトロ試験結果を用いたソース物質の絞り込みについて検討した結果、④インビトロ試験によるソース物質の選択は、一部の物質群の毒性予測においてのみ有用であることが示唆された。

以上の研究成果を踏まえて、今期の研究では以下の3項目について研究を進めている。本発表では研究項目1及び2の進捗状況を報告する。

1. 化学構造に基づくサブグループを利用した解析
2. 構造類似物質の毒性学的分類方法の探索
3. シトクロムP450阻害試験を利用した定量的肝毒性予測



化学構造情報とインビトロ試験結果を利用したリードアクロスによる毒性予測：概要と課題

研究項目1

1. 目的

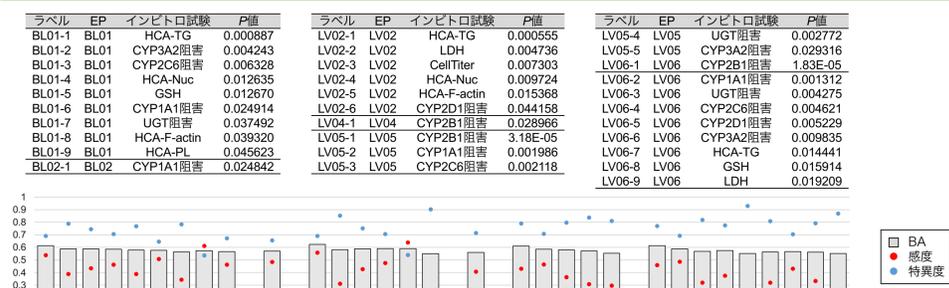
部分化学構造に着目して物質グループを作成し、各グループについて、インビトロ試験結果でインビトロ毒性を予測可能か否かを明らかにする。

2. 方法

データセット：ラット28-42日間反復投与毒性試験結果のある326物質をHESSから選択
毒性EP：HESSの類似所見をグループ化して6種の肝臓EP（LV01：細胞死/炎症、LV02：肝機能低下、LV03：肝機能亢進、LV04：胆管障害、LV05：肝肥大、LV06：脂質代謝異常）、2種の血液EP（BL01：凝固異常、BL02：貧血）を作成
グループ化：分子記述子を利用して8グループを作成：①第一級芳香族アミン（23物質）、②第二級芳香族アミン（14物質）、③芳香族アミン（①+②）、④ニトロベンゼン（17物質）、⑤フェノール（54物質）、⑥芳香族カルボン酸（13物質）、⑦芳香族エーテル（19物質）、⑧多環芳香族炭化水素（20物質）
インビトロ試験：細胞毒性試験（LDH、CellTiter、GSH）、ハイコンテント解析（HCA：核/Nuc、ミトコンドリアMit、アクチン、中性脂肪TG、リン脂質PL）、薬物代謝酵素阻害試験（ラットCYP1A1/CYP1A2/CYP2B1/CYP2C6/CYP2D1/CYP3A2、ラットUGTs）の結果を閾値に基づき2値分類
毒性予測：各物質グループについて、EPの有無と各インビトロ試験結果の陽性・陰性の関連性をFisherの正確確率検定により解析し、有意な関連性が認められたEPとインビトロ試験の組み合わせについて、インビトロ試験結果が陽性の場合、そのEPを陽性と予測した。

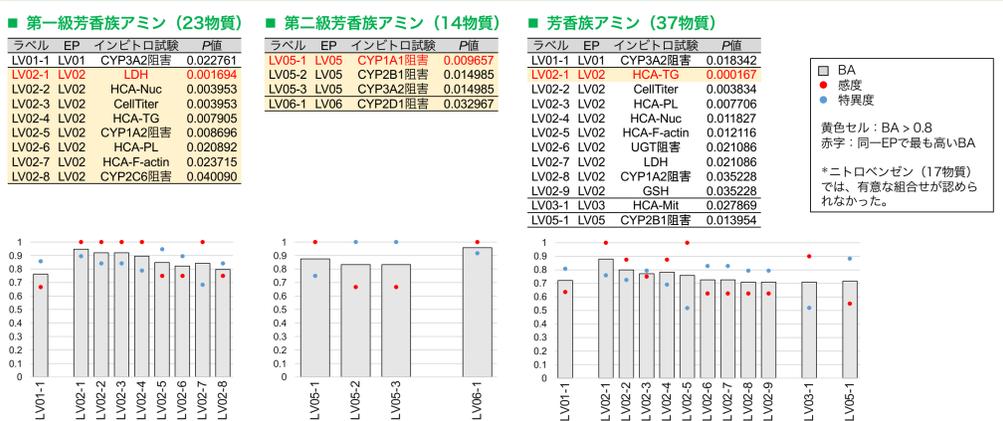
3. 結果

図1-1 全データセット（326物質）の予測結果



- ✓ インビトロ試験結果から全326物質のEPを予測した結果、balanced accuracy (BA) は0.6程度であった。
- 単一変数では、構造的に多様な化学物質の毒性を予測することは困難であることが確認された。

図1-2 部分化学構造サブグループの予測結果



- ✓ 部分化学構造に基づくサブグループについて、同様の予測を行った結果、多くのグループで高いBAが得られた。条件によっては感度又は特異度が1であった。
- ✓ 解析したEPのうち、LV02やLV05、LV06では高い予測精度が認められたが、LV01やLV04、BL02ではインビトロ試験による予測が困難であった。
- ✓ 芳香族アミンのLV02（肝機能低下）では、細胞毒性と関連するインビトロ試験が効果的であり、毒性学的に関連する試験の有用性が確認された。
- ✓ 毒性学的な機序は不明だが、P450阻害試験が予測に有用な場合が多く認められた。

4. まとめと今後の計画

- 部分化学構造に基づいてグループ化した化学物質群では、インビトロ試験結果を利用することで、限られたEPではあるが、精度よく毒性を予測できる可能性が示された。
- 予測結果と化学構造の関連性、各物質のNOEL値等を確認し、グループ化の精緻化を試みる。
- インビトロ試験結果予測値（PASSソフトウェア：項目2参照）を利用した毒性予測を試みる。
- 実験結果の実測値を利用し、NOEL値等の定量的な予測を試みる。

研究項目2

1. 目的

毒性が異なる構造類似物質をモデル物質として選択し、毒性情報を用いたグルーピングを再現できるインビトロ試験結果を探索する。

2. 方法

データセット：項目1の326物質からアニリンとフェノールに類似した11物質を選択
毒性EP：HESSの全所見を利用し、肝臓6種、血液2種に加えて、腎臓2種（KD01：腎重量増加、KD02：腎障害）、胃2種（ST01：前胃障害、ST02：腺胃障害）、全身3種（WB01：体重減少、WB02：流涎、WB03：行動異常）のグループEPを作成
インビトロ試験結果：以下の3つのデータセットを使用：①項目1のデータと核内受容体活性化作用評価（ラットAHR/PXR/PPARα/RXRα/LXRα/FXR）、ラット肝細胞酵素誘導試験（CYP2B1/CYP3A1/CYP4A1）、ラットMRP2/BSEP阻害試験の実測値（28項目）、②ラット肝細胞における遺伝子発現変動プロファイル、③生物活性予測ソフトウェアPASSの8378種の予測値（Pa-Pi）
RNA-seq解析：ラット肝細胞（2.0x10⁶ cells/well、24-well）を被験物質（100 μM）で24時間曝露し、2ウェルをプールの抽出したRNAを用いてNovogenにてRNA-seq解析を実施
分子記述子：alvaDescを使用して2D記述子を計算し、計算不可の記述子及び同値を示した記述子を削除
クラスタリング：JMP Pro 15を利用して階層的クラスタリング（Ward法）を実施

3. 結果

図2-1 被験物質の化学構造と各EPにおけるNOEL及びLOEL

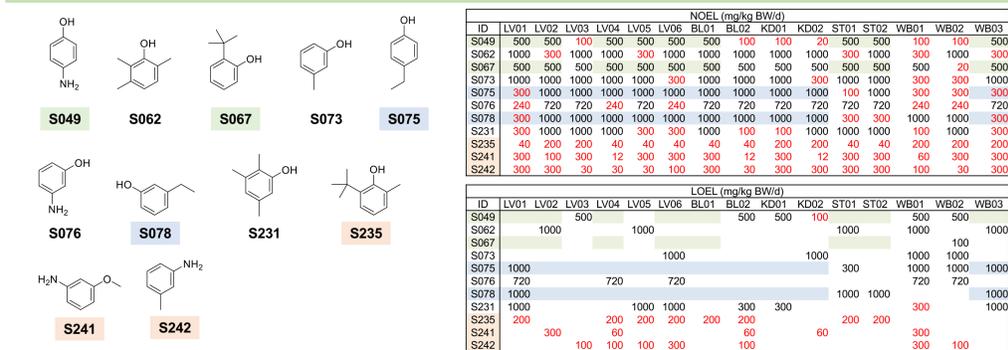


図2-2 毒性所見（NOEL）を用いたクラスタリング

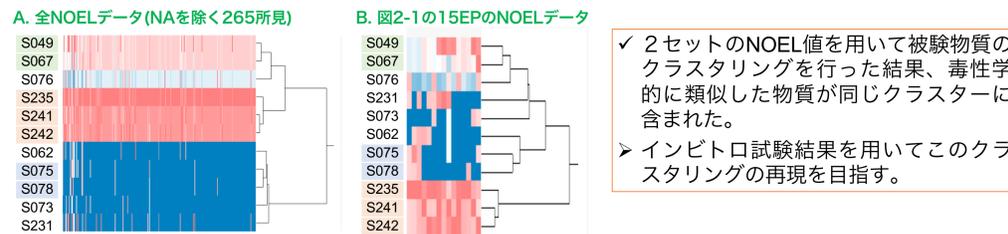


図2-3 分子記述子を用いたクラスタリング

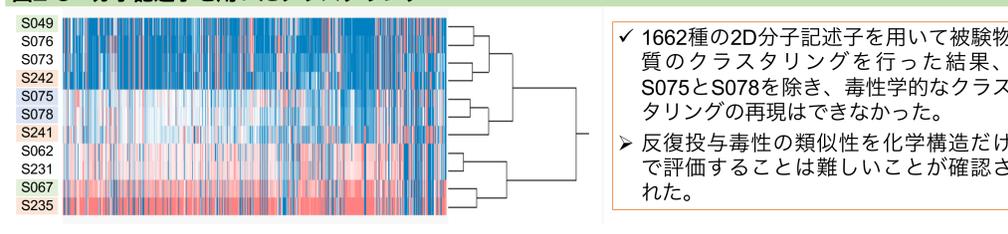


図2-4 インビトロ試験実測値及び予測値を用いたクラスタリング

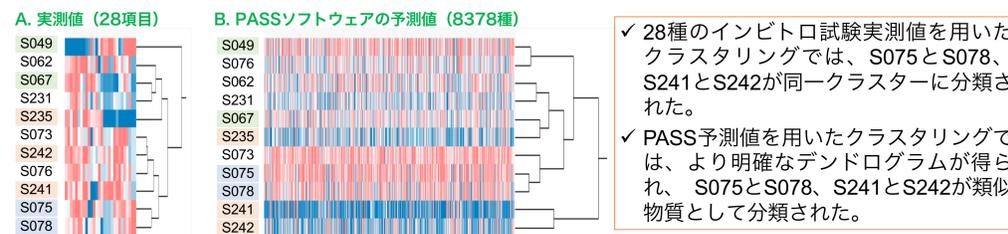
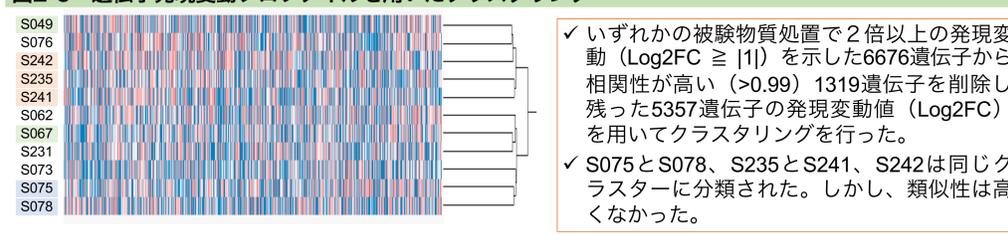


図2-5 遺伝子発現変動プロファイルを用いたクラスタリング



4. まとめと今後の計画

- インビトロ試験を利用して、化学構造が類似した物質を毒性学的に分類できる可能性が示された。
- 今後、用いる変数の選択手法を検討し、精度向上に努めるとともに、得られた結果をRAXによる毒性予測への応用を試みる。