

日化協LRI第12期課題研究
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（東京理科大創域理工学部）



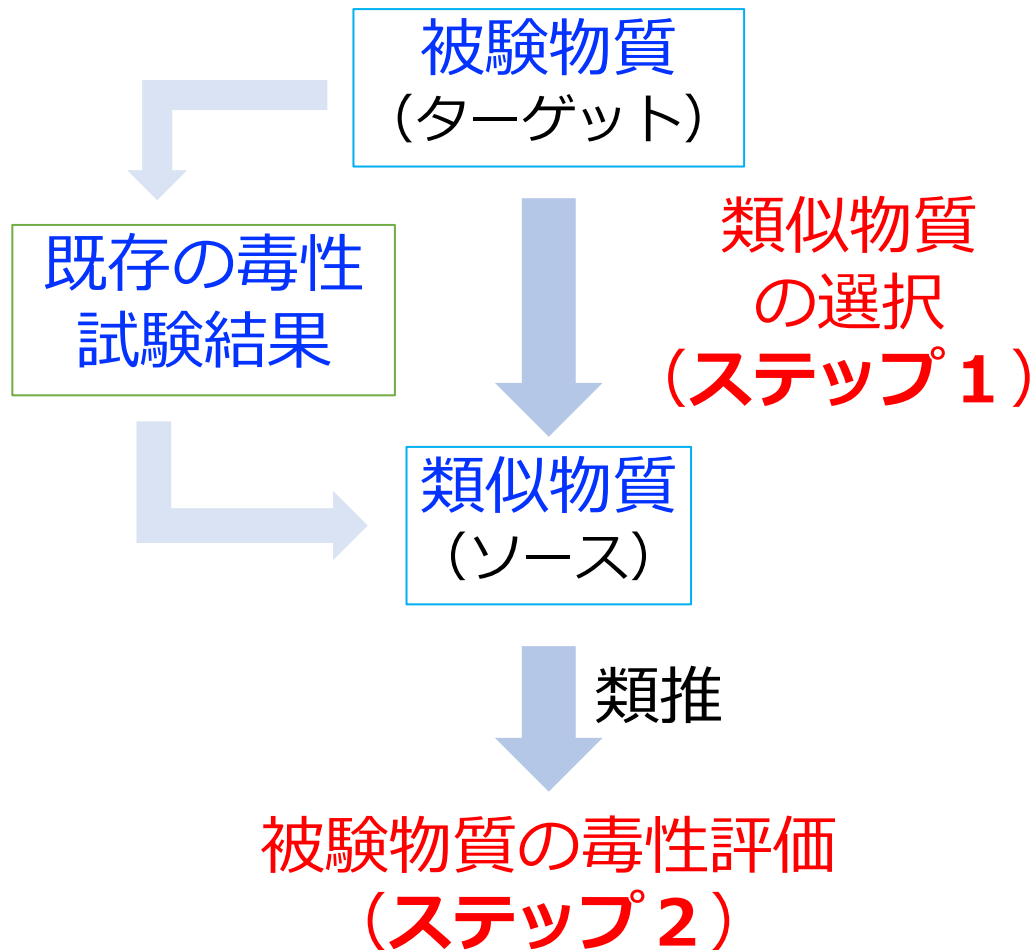
背景と目的

- 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、世界的には、動物実験代替法の開発が強く求められている。
- 近年、遺伝毒性、皮膚感作性等では、毒性発現機序研究の解明が進み、それに基づいた各種インビトロ試験が開発され、動物実験の代替が可能になりつつある。
- 一方、安全性評価や日本の化審法の対応に重要な項目である反復投与毒性（repeated-dose toxicity : RDT）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、類似物質の毒性情報から毒性未知物質（被験物質）の毒性を評価するグルーピングアプローチとリードアクロスが有用と思われる。
- しかし、既存のリードアクロスでは、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。
- 本研究では、統計学的・数理科学的手法を活用し、客観的なリードアクロス手法を開発することを目的とした。また、その応用として複数の毒性エンドポイント（毒性プロファイル）を予測する手法の開発を目指した。



体系的・客観的なリードアクロス手法開発の課題

リードアクロス手法の概略



課題

ステップ1

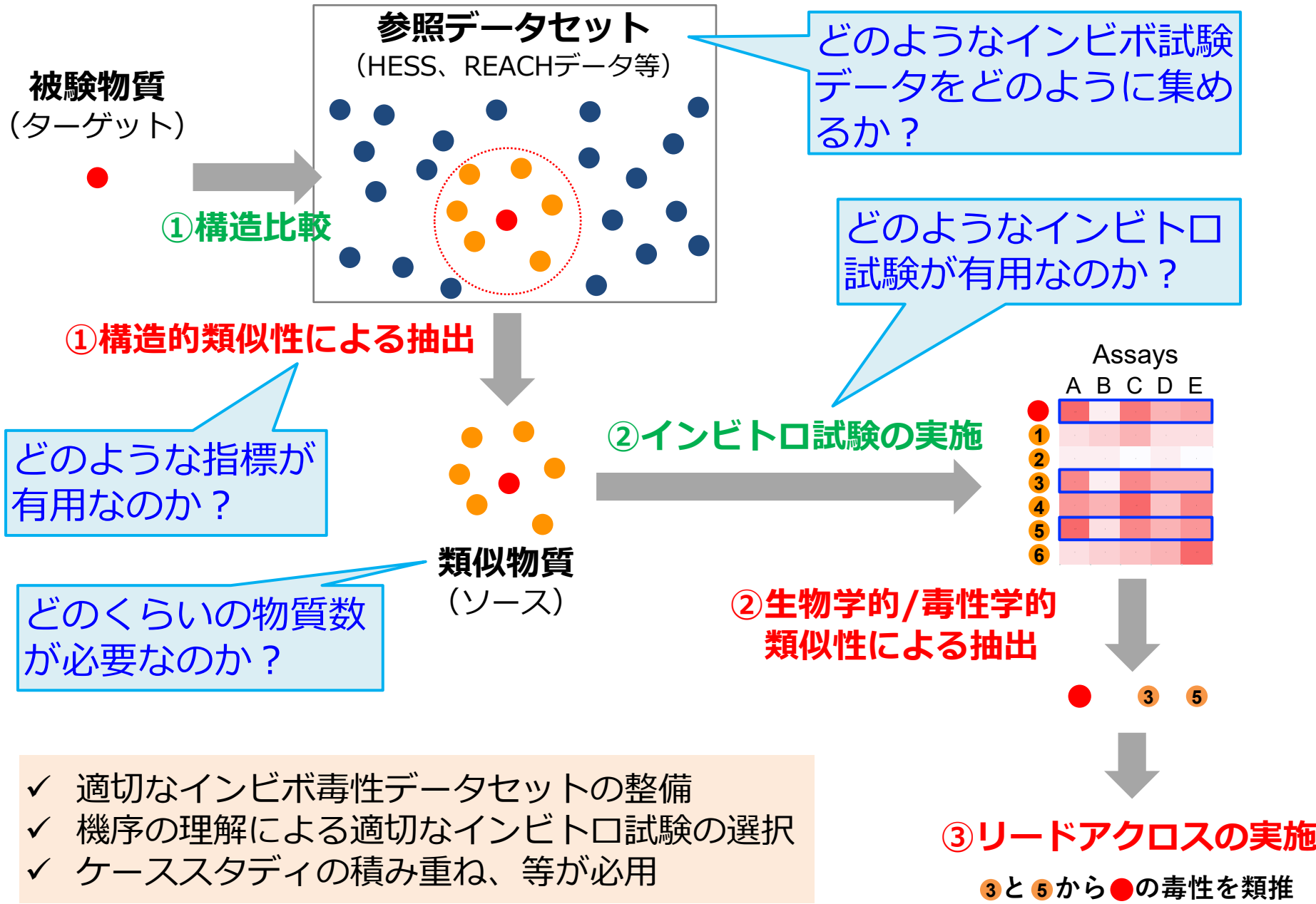
- どんな指標で類似性を判断？
- 化学構造のみ？
生物学的情報が必要？
機序の情報は必要？
- 「似てる」物質とは？
- いくつの類似物質が必要？

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。

インシリコ・インビトロ統合型の2段階リードアクロス





1. 化学構造情報とインビトロ試験結果を用いたリードアクロス手法の開発
2. 複数のエンドポイントを対象とした毒性プロファイルの予測手法に関する基礎検討



1. 化学構造情報とインビトロ試験結果を用いた
リードアクロス手法の開発
2. 複数のエンドポイントを対象とした毒性プロ
ファイルの予測手法に関する基礎検討



使用データセット

被験物質

- HESSに含まれる326物質を使用
- 32化合物を被験物質（テスト物質）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
- 陽性率はgEPにより偏りがあり、18%～55%



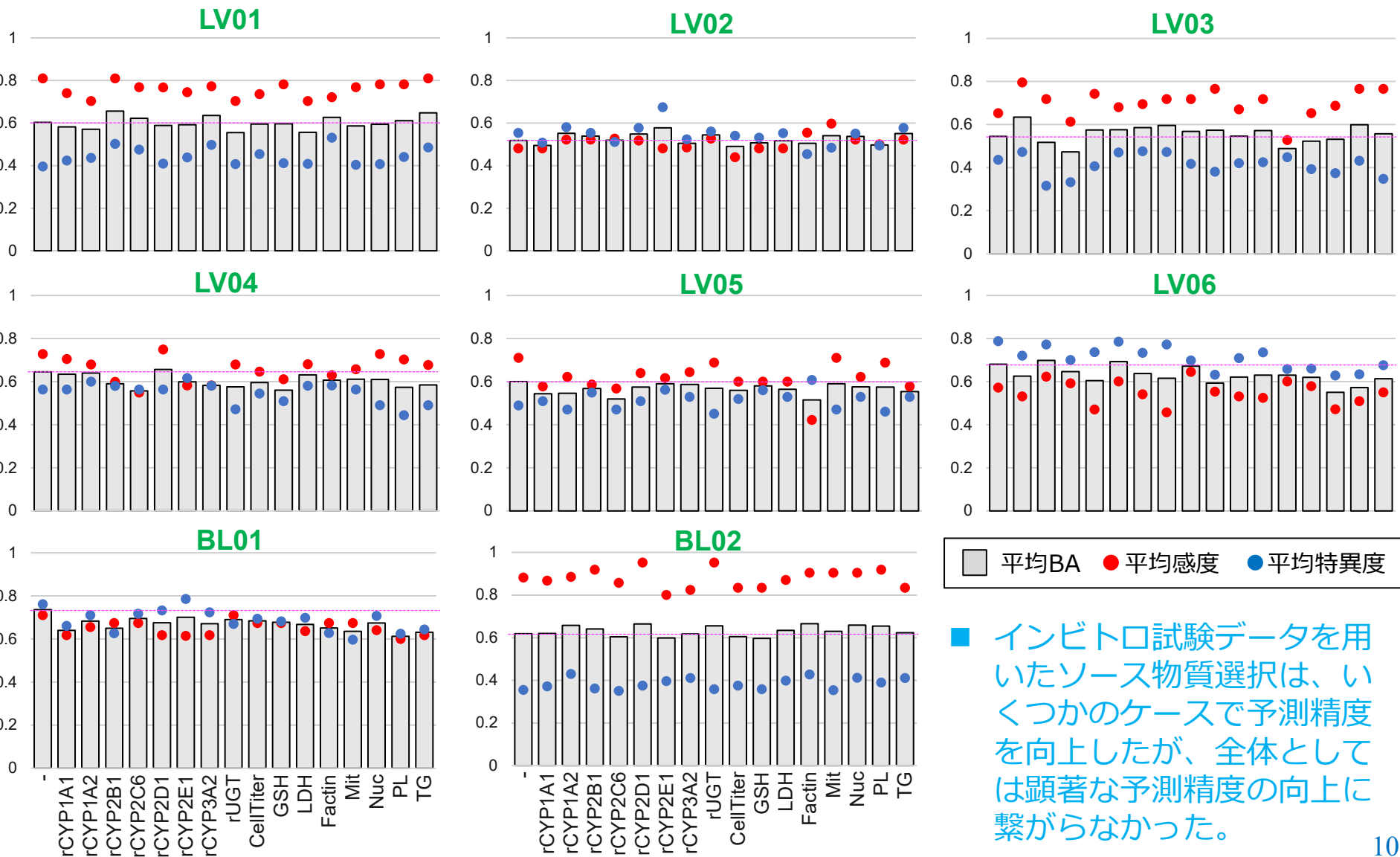
使用したインビトロ試験結果

カテゴリー	パラメーター	陽性基準	陽性率 (%)
細胞毒性試験	LDH	NOEC < 100 μ M (試験濃度 : 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30, 100 μ M)	17.8
	CellTiter		28.2
	GSH	AbsChange > 0.2 (試験濃度 : 1.0, 10, 100 μ M)	26.4
薬物代謝酵素 阻害試験	rCYP1A1	最大阻害活性 > 15% (試験濃度 : 0.1, 1.0, 10 μ M)	38.7
	rCYP1A2		20.9
	rCYP2B1		33.1
	rCYP2C6		29.1
	rCYP2D1		11.7
	rCYP2E1		7.98
	rCYP3A2		24.8
ハイコンテンツ 解析 : 細胞小器 官影響の評価	rUGT		24.2
	Nuc	NOEC < 100 μ M (試験濃度 : 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30, 100 μ M)	32.8
	Mit		61.0
	F-actin		49.4
	TG		35.6
	PL		35.6

※NOEC（無影響濃度）：対照群と比較して有意な影響が認められなかった最高濃度

結果：インビトロ試験を利用したソース物質選択の効果

- 326物質からランダムに32物質を被験物質を選択し、残りの294物質をソース物質の候補とするリードアクロス予測を独立して3回行い、予測精度を算出した。
- 第一次ソース物質数は17物質とし、インビトロ試験結果の一致度でさらに絞り込んだ。





結果：インビトロ試験を利用したソース物質選択結果の詳細

陽性物質

	96化合物中 陽性率	選択による 予測の変化	Cell Titer	GSH	LDH	F-actin	Mit	Nuc	PL	TG	rCYP 1A1	rCYP 1A2	rCYP 2B1	rCYP 2C6	rCYP 2D1	rCYP 2E1	rCYP 3A2	rUGT
LV01	30.2 %	偽陰性→真陽性	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
		真陽性→偽陰性	2	1	3	3	2	1	1	1	2	4	1	1	1	2	1	3
LV02	21.9 %	偽陰性→真陽性	0	0	0	2	3	1	1	1	0	3	1	1	1	0	1	1
		真陽性→偽陰性	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1	1
LV03	26.0 %	偽陰性→真陽性	3	1	2	1	2	3	3	4	4	3	3	2	2	1	2	2
		真陽性→偽陰性	1	1	1	4	2	3	1	2	1	2	4	0	2	0	1	1
LV04	47.2 %	偽陰性→真陽性	1	1	0	1	1	1	0	1	2	0	1	0	0	0	1	2
		真陽性→偽陰性	5	5	2	5	4	1	1	3	3	2	6	7	0	5	7	4
LV05	46.9 %	偽陰性→真陽性	4	4	4	1	4	1	4	0	3	2	3	2	0	2	3	2
		真陽性→偽陰性	9	9	9	14	4	5	5	6	9	6	8	8	4	6	6	3
LV06	44.8 %	偽陰性→真陽性	1	1	1	3	3	0	2	0	3	6	8	4	2	3	0	4
		真陽性→偽陰性	2	3	3	2	3	4	5	1	5	4	7	8	1	4	5	1
BL01	20.8 %	偽陰性→真陽性	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		真陽性→偽陰性	1	1	2	1	1	2	3	2	2	1	1	1	2	2	2	0
BL02	27.1 %	偽陰性→真陽性	0	0	1	2	2	2	1	0	2	1	2	2	2	0	2	2
		真陽性→偽陰性	1	1	1	1	1	1	0	1	2	1	1	2	0	2	3	0

陰性物質

	96化合物中 陽性率		Cell Titer	GSH	LDH	F-actin	Mit	Nuc	PL	TG	rCYP 1A1	rCYP 1A2	rCYP 2B1	rCYP 2C6	rCYP 2D1	rCYP 2E1	rCYP 3A2	rUGT
LV01	30.2 %	偽陽性→真陰性	8	4	4	13	8	5	10	8	5	4	9	7	2	3	11	3
		真陰性→偽陽性	4	3	3	4	7	5	7	2	3	1	2	2	1	0	4	2
LV02	21.9 %	偽陽性→真陰性	5	2	6	9	8	8	5	9	6	6	8	3	3	12	3	6
		真陰性→偽陽性	6	4	6	17	13	8	9	7	9	4	8	6	2	2	5	6
LV03	26.0 %	偽陽性→真陰性	3	2	4	7	8	3	5	4	6	0	2	8	4	4	7	5
		真陰性→偽陽性	7	3	5	7	12	9	5	11	4	9	10	11	2	2	5	7
LV04	47.2 %	偽陽性→真陰性	3	2	3	5	3	2	1	3	4	4	6	3	0	3	3	1
		真陰性→偽陽性	4	5	2	4	3	6	8	7	4	2	5	3	0	0	2	6
LV05	46.9 %	偽陽性→真陰性	5	5	4	6	5	5	5	7	6	1	5	5	1	3	4	3
		真陰性→偽陽性	3	1	2	0	6	2	6	5	5	2	2	6	0	0	2	5
LV06	44.8 %	偽陽性→真陰性	2	2	3	3	1	1	1	2	2	2	1	3	1	2	2	0
		真陰性→偽陽性	10	6	6	10	8	9	9	8	6	3	6	6	1	5	3	5
BL01	20.8 %	偽陽性→真陰性	1	0	0	2	1	0	1	0	0	3	1	2	1	3	2	0
		真陰性→偽陽性	6	6	5	12	14	4	11	9	8	7	11	5	3	1	5	7
BL02	27.1 %	偽陽性→真陰性	6	4	5	12	7	7	6	9	7	8	9	5	4	3	4	6
		真陰性→偽陽性	4	4	2	7	7	4	4	5	6	3	8	5	2	0	0	6

- インビトロ試験結果に基づくソース物質の選択により、一部のターゲット物質の予測結果は変化していた。
- 予測が当たるようになった物質数と外れるようになった物質数がおおよそ等しかったために、最終的な精度では変化が認められないことが明らかになった。



方法：部分化学構造に基づくサブグループ化の検討

- 分子記述子の値を参考に、326化合物の中から特定の構造をもつ化合物を抽出し、下記のサブグループを作成した。

サブグループ名	条件	物質数
第一級芳香族アミン	$n\text{ArNH}_2 \geq 1$	23
第二級芳香族アミン	$n\text{ArNHR} \geq 1$	14
芳香族アミン	$n\text{ArNH}_2 \geq 1$ or $n\text{ArNHR} \geq 1$	37
ニトロベンゼン	$n\text{ArNO}_2 \geq 1$	17
フェノール	$n\text{ArOH} \geq 1$	54
芳香族カルボン酸	$n\text{ArCOOH} \geq 1$	13
芳香族エーテル	$n\text{ArOR} \geq 1$	19
多環芳香族炭化水素	$\text{RCI} > 1$ & $n\text{Bnz} \geq 2$	20

除外条件：

多環芳香族炭化水素以外

- ・官能基が結合する芳香環が縮合した多環芳香族の化合物を除外
- ・官能基が結合する芳香環がベンゼン環でない化合物を除外

多環芳香族炭化水素

- ・ベンゼン環同士の縮合が認められない化合物を除外

RCI, ring complexity index

カバー率：136/326 (42%)

- これらサブグループについて、各インビトロ試験結果を利用して肝毒性・血液毒性の予測を行った。



結果：サブグループの毒性陽性率

サブグループ			全体	第一級 芳香族アミン	第二級 芳香族アミン	芳香族アミン	ニトロ ベンゼン	フェノール	芳香族 カルボン酸	芳香族 エーテル	多環芳香族 炭化水素
化合物数			326	23	14	37	17	54	13	19	20
陽 性 率	LV01	細胞死/炎症	0.316	0.391	0.143	0.297	0.235	0.352	0.308	0.474	0.350
	LV02	肝機能低下	0.187	0.174	0.286	0.216	0.059	0.111	0.308	0.158	0.050
	LV03	肝機能亢進	0.270	0.261	0.286	0.270	0.529	0.222	0.385	0.316	0.200
	LV04	胆管障害	0.377	0.478	0.571	0.514	0.294	0.278	0.154	0.526	0.350
	LV05	肝肥大	0.549	0.609	0.429	0.541	0.765	0.537	0.231	0.789	0.400
	LV06	脂質代謝異常	0.442	0.565	0.143	0.405	0.588	0.426	0.231	0.737	0.350
	BL01	凝固異常	0.206	0.087	0.143	0.108	0.000	0.222	0.308	0.158	0.200
	BL02	貧血	0.298	0.739	0.571	0.676	0.765	0.222	0.308	0.632	0.400

- 既存の毒性機序情報に一致して、芳香族アミンやニトロベンゼン類では、貧血陽性率は高かった。
- 機序は不明だが、肝肥大では、ニトロベンゼンや芳香族エーテル類で陽性率が高かった。
- 芳香族エーテルでは脂質代謝異常の陽性率も高かった。

結果：各サブグループでの毒性所見とインビトロ試験結果の関連性解析の例

- 各サブグループにおいて、各毒性EPと各インビトロ試験結果の関連性を調べ、使用する試験結果の選択に利用した。

- 全てのEPと関連する試験結果は存在しなかった。
- いずれの試験結果とも関連性を示さない肝毒性所見（LV01、LV03）が存在した。

■ データセット全体（326物質）

Assay	BL01	BL02	LV01	LV02	LV03	LV04	LV05	LV06
CellTiter	0.069	1.000	0.895	0.007	0.333	0.800	0.902	0.215
GSH	0.013	0.583	0.788	0.075	0.888	0.367	0.165	0.016
LDH	0.154	0.635	0.213	0.005	0.872	0.552	0.247	0.019
F-actin	0.039	0.335	0.552	0.015	0.901	1.000	0.318	0.316
Mit	0.888	1.000	0.808	0.468	0.610	0.907	0.087	0.068
Nuc	0.013	0.440	0.704	0.010	0.597	0.808	0.156	0.075
PL	0.046	0.206	0.804	0.075	0.435	1.000	0.163	0.130
TG	0.001	0.900	0.536	0.001	1.000	0.634	0.246	0.014
rCYP1A1	0.025	0.025	0.542	0.243	0.799	0.639	0.002	0.001
rCYP1A2	0.180	0.053	0.662	0.294	0.760	0.889	0.076	0.891
rCYP2B1	0.109	0.053	0.057	0.451	0.085	0.029	0.000	0.000
rCYP2C6	0.006	0.231	0.298	0.349	0.272	0.210	0.002	0.005
rCYP2D1	0.199	0.572	0.853	0.044	0.846	1.000	0.492	0.005
rCYP2E1	0.619	0.073	0.826	0.599	0.173	0.675	0.839	0.156
rCYP3A2	0.004	0.326	0.783	0.411	1.000	0.112	0.029	0.010
rUGT	0.037	0.888	0.487	0.185	0.885	0.595	0.003	0.004

■ 第一級芳香族アミン（23物質）

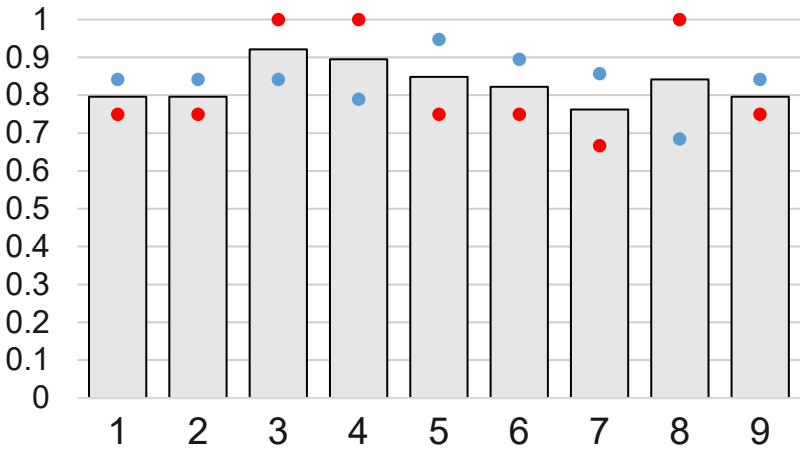
Assay	BL01	BL02	LV01	LV02	LV03	LV04	LV05	LV06
CellTiter	1.000	0.621	1.000	0.004	1.000	1.000	1.000	1.000
GSH	1.000	1.000	1.000	0.194	0.576	0.317	1.000	0.339
LDH	1.000	0.632	0.643	0.002	1.000	1.000	0.162	1.000
F-actin	1.000	0.660	0.669	0.024	1.000	1.000	1.000	0.685
Mit	1.000	1.000	1.000	0.104	0.179	0.680	1.000	0.685
Nuc	1.000	0.621	0.657	0.004	0.318	1.000	1.000	1.000
PL	1.000	1.000	0.343	0.021	1.000	1.000	1.000	0.618
TG	0.526	0.369	1.000	0.008	1.000	1.000	1.000	0.685
rCYP1A1	0.502	0.340	1.000	0.260	0.643	1.000	1.000	1.000
rCYP1A2	1.000	1.000	0.260	0.009	0.539	0.590	1.000	0.604
rCYP2B1	1.000	0.340	1.000	0.260	1.000	1.000	0.228	0.669
rCYP2C6	0.462	1.000	0.643	0.040	1.000	1.000	1.000	1.000
rCYP2D1	1.000	0.539	0.538	0.067	1.000	1.000	1.000	0.560
rCYP2E1	1.000	1.000	0.611	0.194	0.089	1.000	0.611	0.339
rCYP3A2	1.000	0.621	0.023	0.103	1.000	1.000	1.000	1.000
rUGT	1.000	0.539	0.538	0.067	1.000	1.000	0.253	1.000



結果：サブグループの毒性予測結果の例

■ 第一級芳香族アミン（23物質）

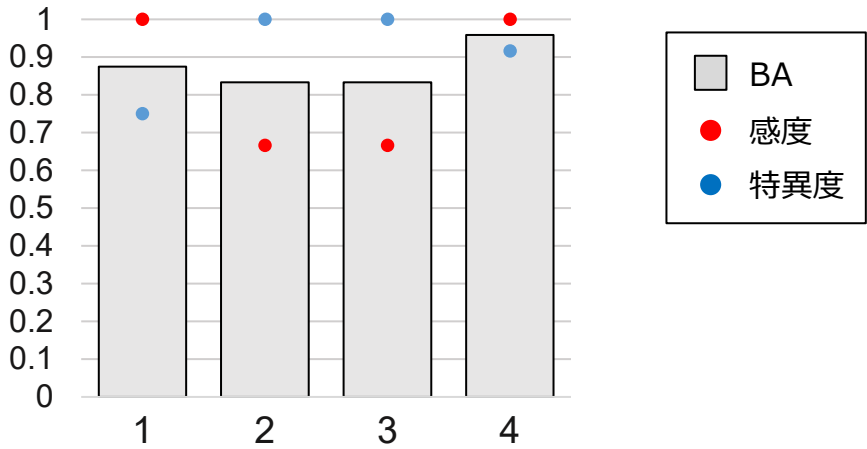
ID	X	Y	p値	相関
1	LV02	LDH	0.0017	正
2	LV02	Nuc	0.0040	正
3	LV02	CellTiter	0.0040	正
4	LV02	TG	0.0079	正
5	LV02	rCYP1A2阻害	0.0087	正
6	LV02	PL	0.0209	正
7	LV01	rCYP3A2阻害	0.0228	正
8	LV02	F-actin	0.0237	正
9	LV02	rCYP2C6阻害	0.0401	正



■ 第二級芳香族アミン（14物質）

ID	X	Y	p値	相関
1	LV05	rCYP1A1阻害	0.0097	正
2	LV05	rCYP2B1阻害	0.0150	正
3	LV05	rCYP3A2阻害	0.0150	正
4	LV06	rCYP2D1阻害	0.0330	正

* 赤字は、各gEP内で最も高い精度が得られた試験



■ 各サブグループにおいて、特定のgEPとインビトロ試験結果の組み合わせで高い予測精度が得られた。



結果：サブグループ間の予測精度比較：LV02-LDHのケース

全体

LDH

LV02

	0	1	計
0	226	39	265
1	42	19	61
計	268	58	326

p=0.005

芳香族アミン

LDH

	0	1	計
0	24	5	29
1	3	5	8
計	27	10	37

p=0.021

第一級芳香族アミン

LDH

	0	1	計
0	17	2	19
1	0	4	4
計	17	6	23

p=0.002

第二級芳香族アミン

LDH

	0	1	計
0	7	3	10
1	3	1	4
計	10	4	14

p=1.000

ニトロベンゼン

LV02

	0	1	計
0	13	3	16
1	1	0	1
計	14	3	17

p= 1.000

フェノール

	0	1	計
0	34	14	48
1	4	2	6
計	38	16	54

p= 1.000

芳香族エーテル

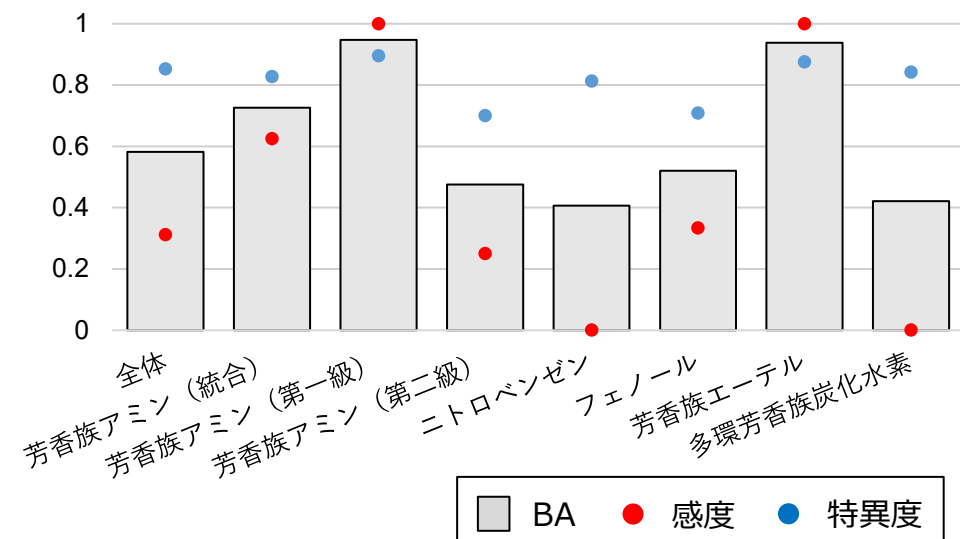
	0	1	計
0	14	2	16
1	0	3	3
計	14	5	19

p=0.013

多環芳香族炭化水素

	0	1	計
0	16	3	19
1	1	0	1
計	17	3	20

p=1.000



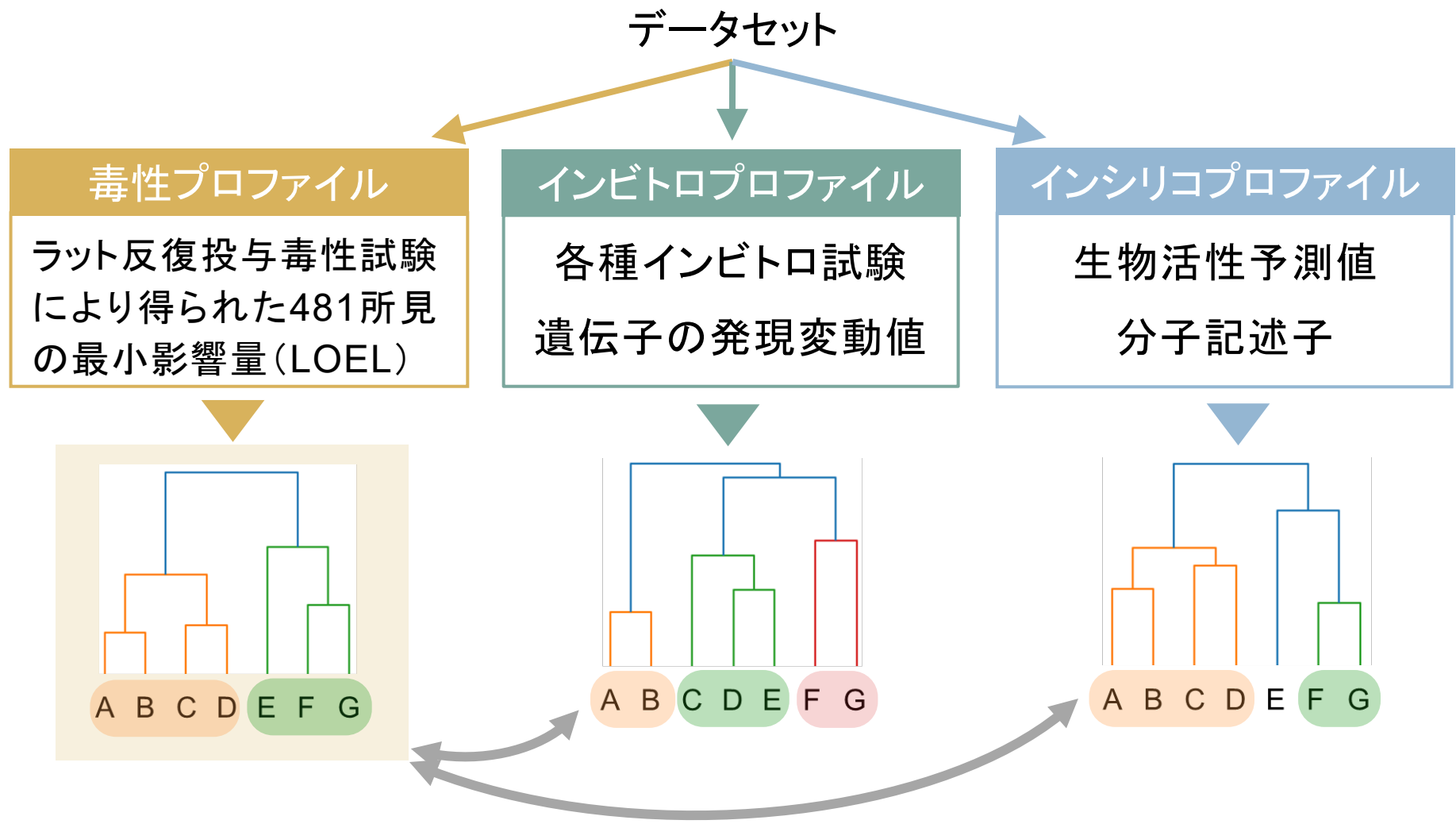
- インビトロ試験結果に基づく予測の精度はサブグループ毎に異なった。
- LV02とLDH試験結果で有意な関連が認められたサブグループでは、予測精度は相対的に高かった。



1. 化学構造情報とインビトロ試験結果を用いた
リードアクロス手法の開発
2. 複数のエンドポイントを対象とした毒性プロ
ファイルの予測手法に関する基礎検討

研究項目2：リードアクロスを利用した毒性プロファイルの予測

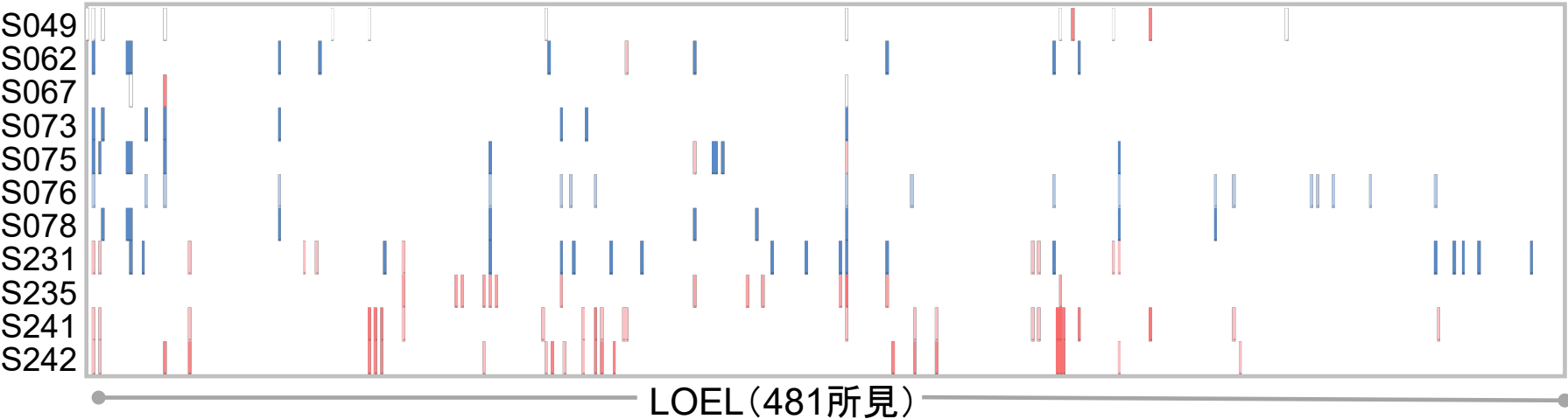
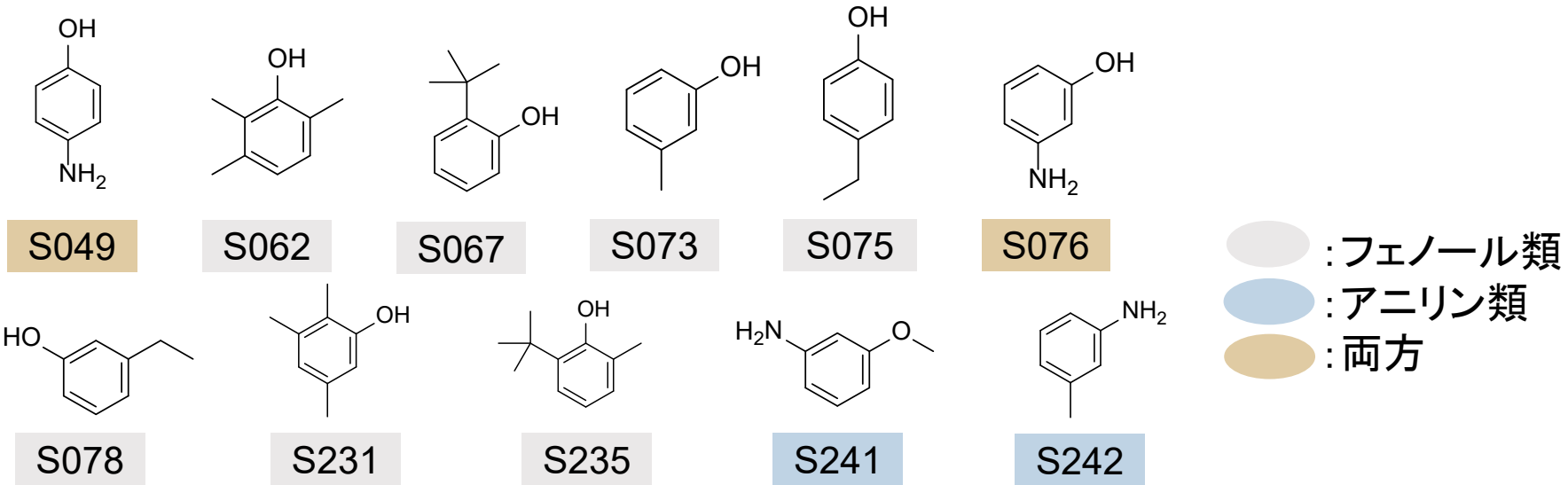
- 既存の毒性予測手法は、単一のEPを目的変数としているが、そのような方法では、反復投与毒性を予測するには非常に多くの予測モデルを構築する必要がある。
- 複数のEP（毒性プロファイル）を予測する手法の確立を目指すべきではないか。





方法：データセット

- HESSデータセットから、雄性ラット28日間/48日間反復投与毒性試験データが存在するアニリン・フェノール性物質を11個選択した。





方法：毒性プロファイルに基づくグルーピング

- 1. LOEL（415所見）に毒性クラスを設定した
 - ① ≤ 30 mg/kg/d ② 30～300 mg/kg/d
 - ③ ≥ 300 mg/kg/d ④ LOELなし, >1000 mg/kg/d
- 2. データセット内全物質でクラス4を示す所見を削除（残り73所見）
- 3. データセット内全物質ペアで一致率に基づく毒性クラススコアを計算

クラスが完全に一致 = 1 クラスが前後 = 0.5 それ以外 = 0

	所見1	所見2	...	所見73	平均		A	B	C
物質A	クラス1	クラス3		クラス4		A	1	0.4	0.8
物質B	クラス1	クラス4		クラス1		B	0.4	1	0.4
スコア	1	0.5		0	0.4	C	0.8	0.4	1

毒性クラススコア

- 4. 作成した行列（1-毒性クラススコア）を入力データとし、階層的クラスタリングを実施

方法：毒性プロファイルと類似するプロファイルを作成可能な変数の探索



- 各種変数を用いたプロファイリングとグルーピングを行い、毒性プロファイルに基づくグルーピングとの類似性を調べた。
- 11×11のスピアマン相関行列を作成し、これを距離行列に変換したのちに階層的クラスタリングを実施した。

➤ 分子記述子プロファイル：513変数

alvaDescで計算可能な4179記述子から、全物質で一定値を示す記述子、並びに相関が高い（ ≥ 0.99 ）記述子の一方を削除した。

➤ 生物活性予測値プロファイル：6162変数

PASSソフトウェアで計算された生物活性予測値（Pa-Pi）について、常に一定値を示すパラメータを削除したのち、11物質で相関が高い（ ≥ 0.99 ）パラメータの一方を削除した。

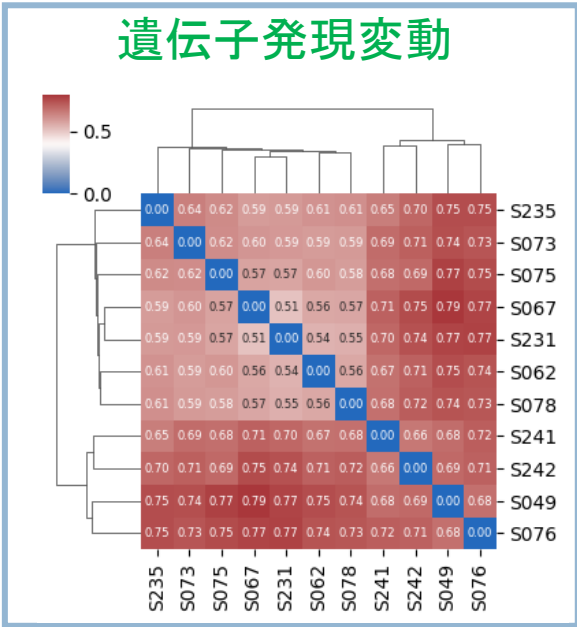
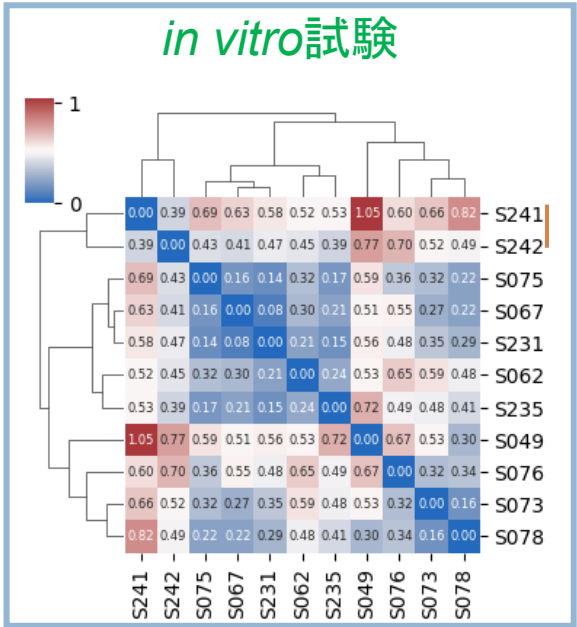
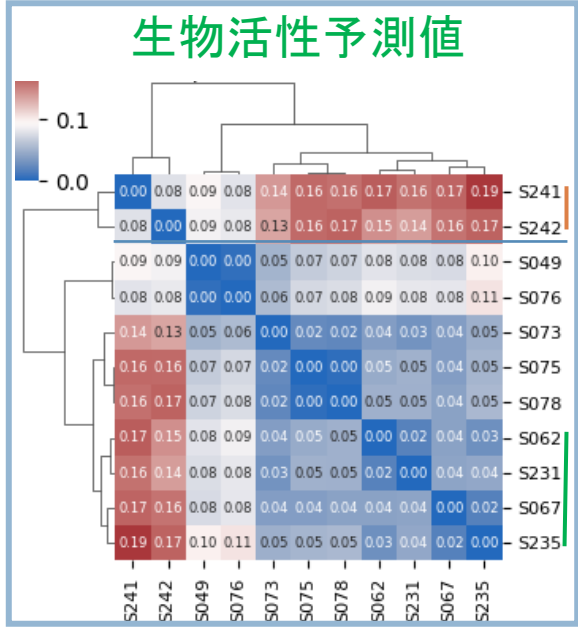
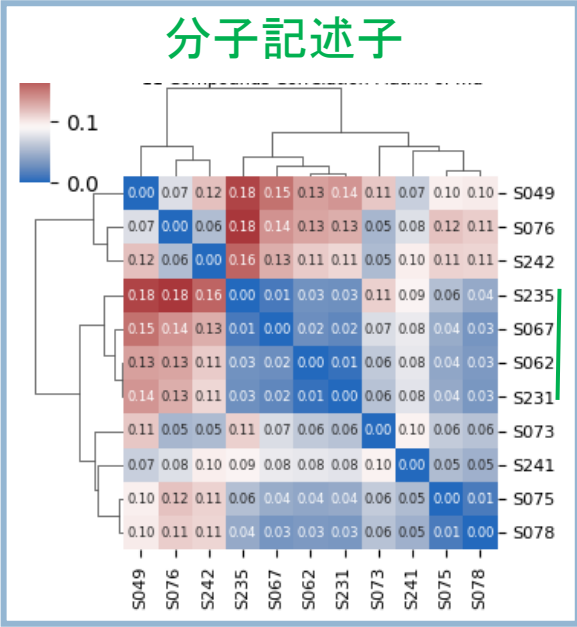
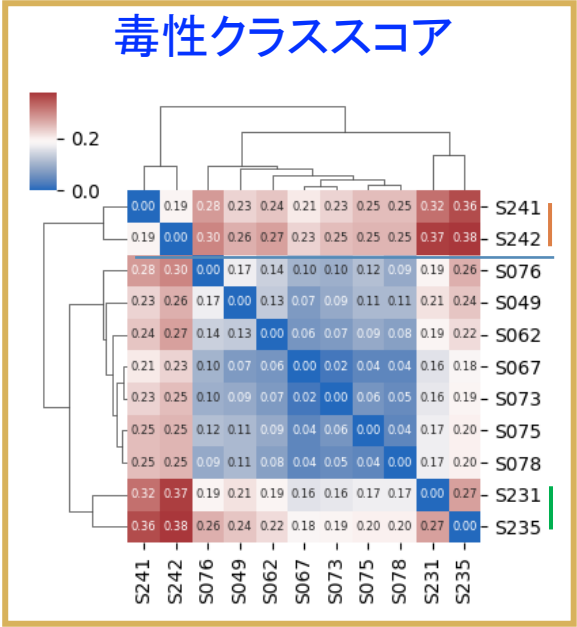
➤ *in vitro*試験結果プロファイル：30変数

P450阻害・誘導試験、細胞障害試験、核内受容体活性化試験、HCA（NOEC_w）を使用した。HCAは11物質でNOECが100 μ Mではない値が一番多いパラメータを代表値とした。

➤ 遺伝子発現変動プロファイル：17442変数

ラット肝細胞に被験物質（100 μ M）を曝露し、RNA-seq解析を実施した。検出された遺伝子について溶媒対照群との発現変動倍率を利用した。

結果：リードアクロスを利用した毒性プロファイルの予測



■ 生物活性予測値を用いたグルーピングが最も毒性クラススコアのグルーピングと類似していた。



本LRI研究成果のまとめ

- HESS搭載物質やREACH登録物質（約2000物質）の反復投与毒性所見のデータセットを整備し、グループエンドポイントを8種（肝毒性関連6種、血液毒性関連2種）設定し、リードアクロスにおける毒性判定基準、類似性評価に使用する分子記述子やソース物質の選択方法、物質間距離の種類を検討し、決定した。
- インビトロ試験結果を活用した2段階リードアクロスのケーススタディを実施し、一部の物質ではインビトロ試験結果を用いた絞り込みにより毒性が正しく予測されるが、同時に化学構造情報だけで正しく予測された物質の毒性を誤判定へと変化させる場合もあることが明らかになった。
- 部分化学構造に着目して化学物質をサブグループ化し、インビトロ試験結果を利用した肝毒性・血液毒性の予測を行ったところ、サブグループの種類（芳香族アミン等）とインビトロ試験の組合せによっては、高精度で毒性の予測が可能であることが明らかになった。
- アニリン・フェノール類を用いたケーススタディにより、複数の毒性EPに基づく毒性プロファイルの予測手法を探索し、ソフトウェアで算出した生物活性予測値の利用が有用であることが示された。