

2023年日化協LRI研究報告会（ウェブ開催）

2023年8月25日

## 日化協LRI第11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（東京理科大学理工学部）

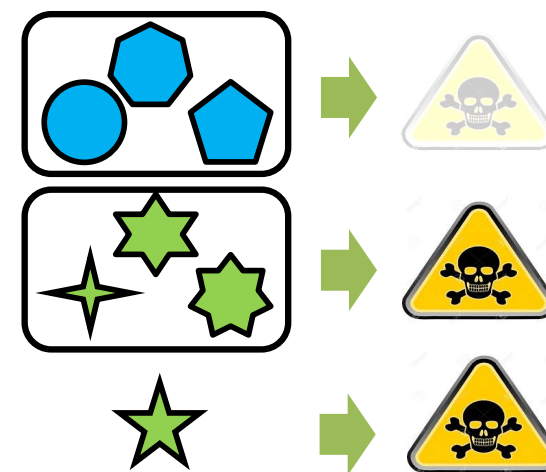


- 化学物質の安全性は主に動物実験結果を基に評価されているが、世界的に動物実験代替法の開発が強く求められている。
- EUにおける、動物実験が行われた化粧品完成品、原料及び配合原料の販売禁止（2013年）、米国環境保護庁による哺乳類を用いた試験の要求停止並びに研究費補助の30%削減（2025年まで）並びに全廃（2035年まで）の発表など、その流れは加速している。
- しかし、全身毒性の評価に重要な反復投与毒性に関しては、その毒性の多様さ、複雑さなどの理由から動物実験代替法の開発は全く進んでいない。
- AI/機械学習への期待は大きいですが、毒性関連の学習用データは少なく、予測根拠情報が得られない、などの問題がある。
- このような状況において、複雑な毒性の評価に、グループイングアプローチ（カテゴリーアプローチ）とリードアクロスが有用かつ現実的な手段と考えられている。

# グルーピングアプローチとリードアクロス

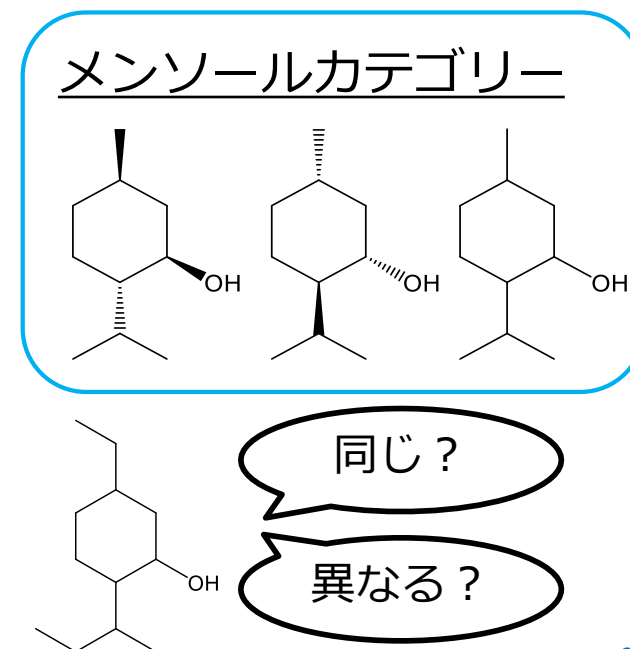


- 化学構造や生物学的特徴が類似した化学物質群をグルーピングし、そのグルーピングに基づき毒性評価を行う。
- 被験物質（未評価）と同じグループに属する物質の毒性試験結果から、被験物質の毒性を類推（リードアクロス）する。



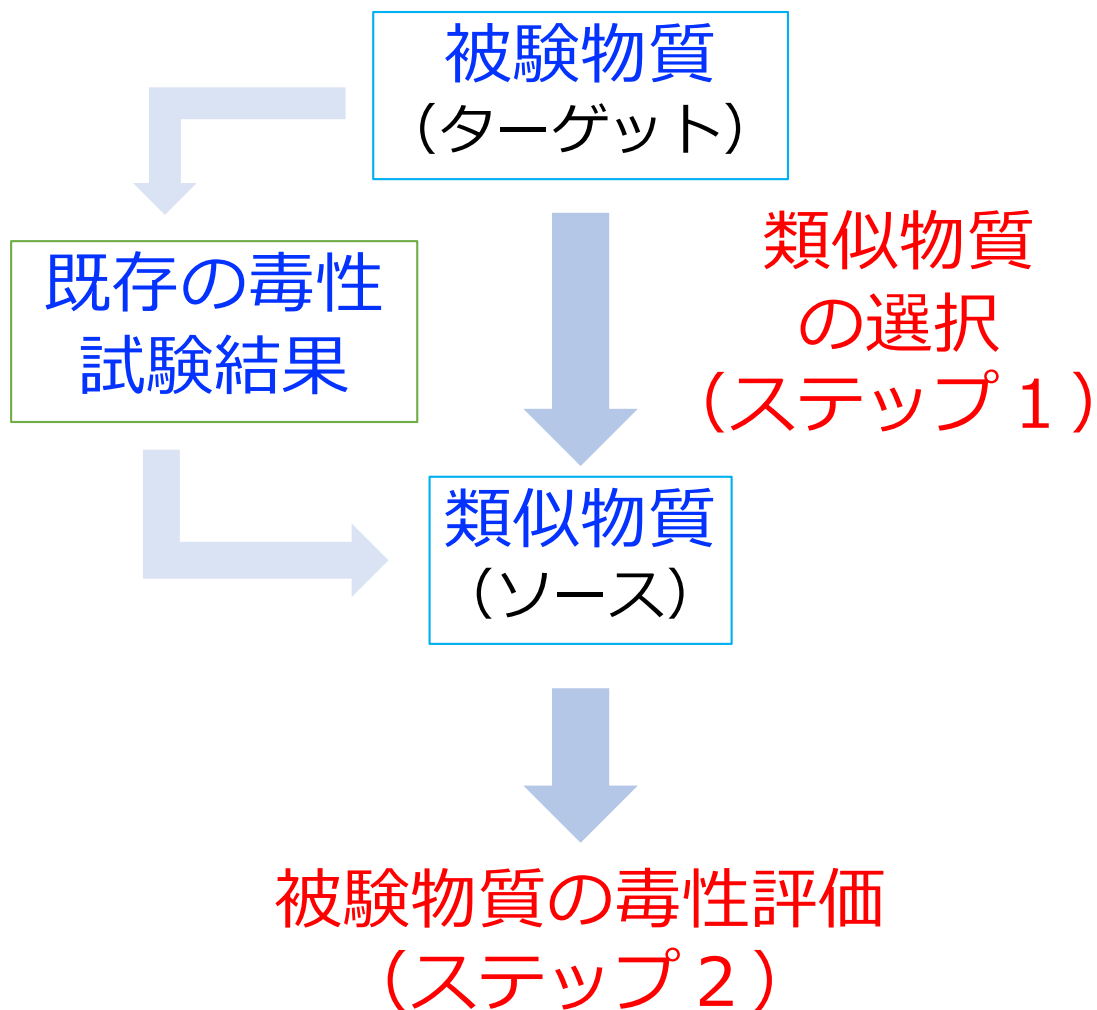
## 既存の手法における問題点

- 類似性は人が判断→主観的で、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？

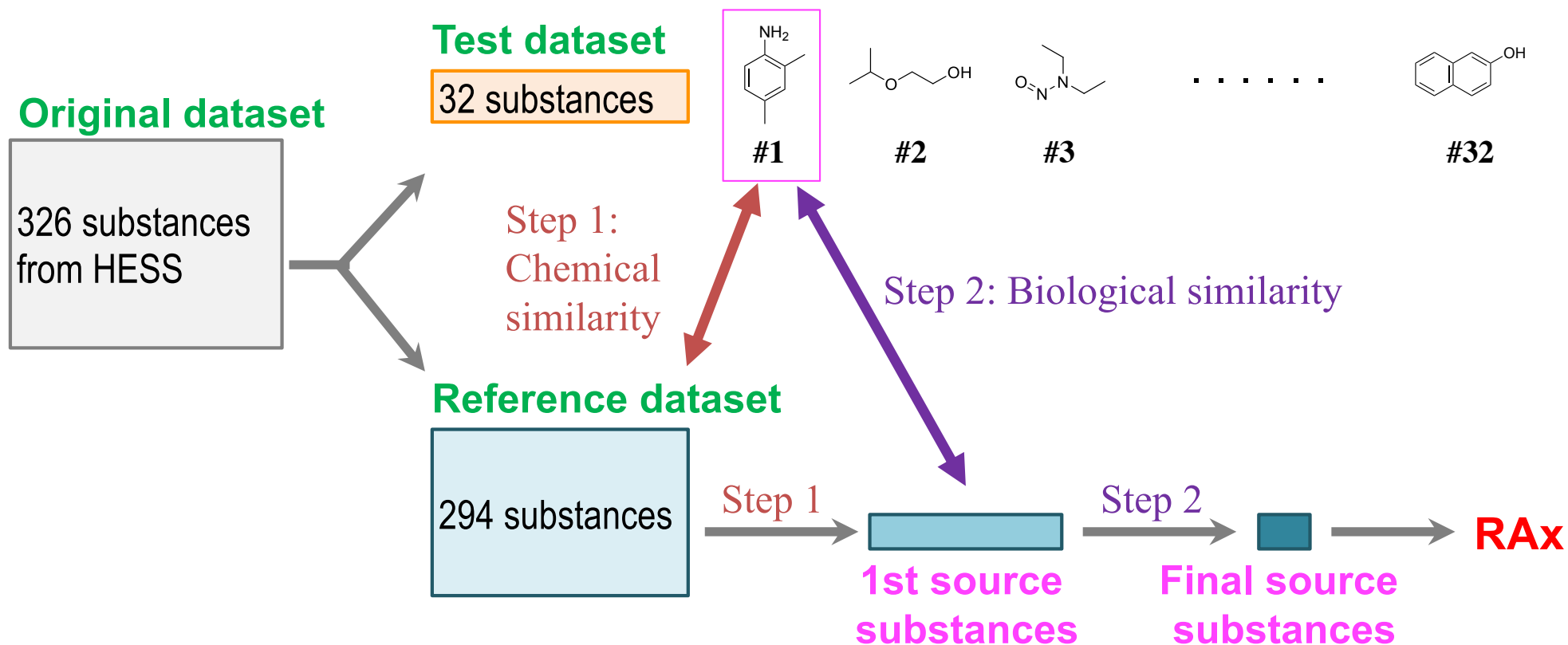
■ 客観的なリードアクロスの実施には、検討すべき項目が多い。



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セットとして、被験物質の化学構造情報やインビトロ試験結果に基づいて参照データセットから類似（ソース）物質を同定し、それらから被験物質の反復投与毒性を予測するための、客観的なリードアクロス手法の開発を目指す。

本発表では、肝と血液の8つのエンドポイントを対象として、化学構造情報とインビトロ試験情報で順次類似性を評価する「2段階リードアクロス」手法開発のこれまでの成果の一部を紹介する。

# 研究方法概略



## データセット

- HESSから326物質（主に化審法基本点検物質）を選択：**Original dataset**
- 1割（32物質）を被験物質としてランダムに選択：**Test dataset**
- 残りを類似物質（ソース物質）検索対象データセットに設定：**Reference dataset**

## 類似物質選択とリードアクロス

- 分子記述子を利用して化学構造が類似する17物質を選択：**1st source subst.**
- 17物質のうち、インビトロ試験結果が一致する物質を選択：**Final source subst.**
- **Final source substances**を用いて、各エンドポイントのリードアクロスを実施
- 全被験物質について同様の操作を行い、予測精度を評価

# 研究方法概略（2）

## エンドポイント（EP）

- 28日間反復投与毒性試験で認められる代表的所見をグループ化
- **肝臓6種**（細胞死/炎症、肝機能低下、肝機能亢進、胆管障害、肥大、脂質代謝異常）、**血液2種**（凝固障害、貧血）

## 化学構造の類似性評価

- alvaDesc**分子記述子**（2649種）を使用
- 物質間の**ユークリッド距離**を算出

## インビトロ試験による類似性評価

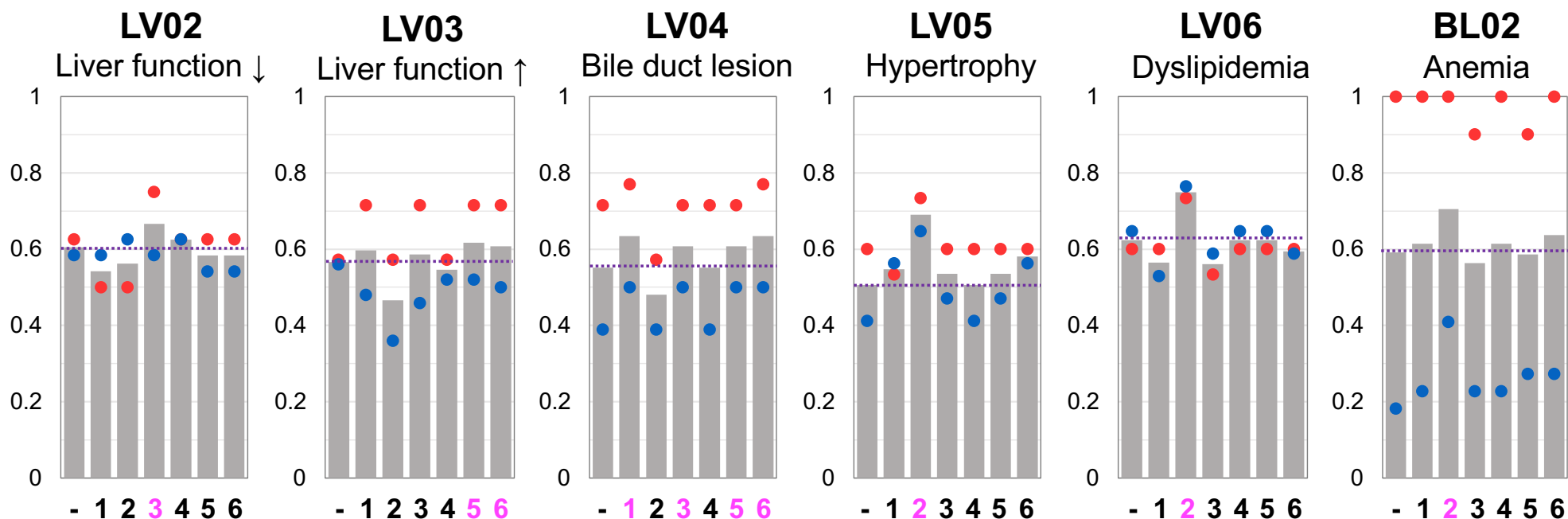
- 細胞傷害試験：**CellTiterアッセイ**（細胞内ATP含量）、LDH放出試験、細胞内GSHレベル
- HepG2細胞を用いた**ハイコンテンツ解析**（核、ミトコンドリア、F-アクチン、中性脂肪蓄積、リン脂質蓄積の37パラメータ）
- ラット**P450阻害試験**（7種）
- 閾値を設定して実験値を2値化（陽性/陰性）
- **毒性EPとの統計学的関連性を基に試験を選択**

## 2段階リードアクロスの結果（その1）



1: Cytotox    4: Combination A  
2: P450       5: Combination B  
3: HCA        6: Ensemble

■ BA    ● Sensitivity    ● Specificity



- インビトロ試験結果に基づいてソース物質を選択すると、多くのEPで予測精度が向上した。
- 特に、P450試験を利用した場合に向上の程度が顕著であった。
- 複数の試験結果を組み合わせた場合に、必ずしも単独利用の場合よりもよい精度が得られることはなかった。

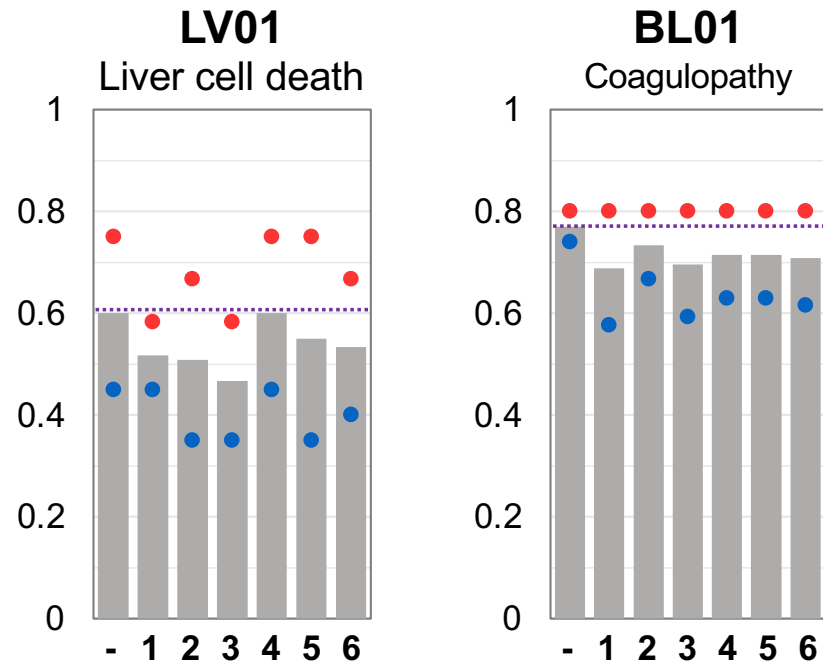


## 2段階リードアクロスの結果（その2）



1: Cytotox    4: Combination A  
2: P450        5: Combination B  
3: HCA         6: Ensemble

■ BA    ● Sensitivity    ● Specificity



gEP	Cytotox		P450		HCA	
	Para.	p-value	Para.	p-value	Para.	p-value
LV01	LDH	0.3014	rCYP2B1	0.1397	Mit	0.3686
BL01	GSH	0.0206	rCYP3A2	0.0026	TG	0.0009

- LV01とBL01では、インビトロ試験結果によるソース物質選択は、予測精度を向上しなかった。試験の種類によってはむしろ低下させた。
- LV01では、いずれの試験カテゴリーにおいてもgEPとの関連性が高い試験がなく、関連性の低い試験を用いたことが原因かもしれない。
- BL01では、分子記述子を用いたRAXで既に高い予測精度が得られていたために、精度向上が認められなかった可能性がある。



- 分子記述子を利用してソース物質を選択した後に、インビトロ試験結果に基づいてソース物質をフィルタリングすることで、多くのEPでリードアクロス精度が向上した。特に、P450試験でその効果が強く認められた。一方、複数試験の組み合わせの効果は認められなかった。
- 効果が認められた物質、認められなかった物質の特徴把握を含めて、結果の検証を進める。
- 現時点では、試験結果を陽性/陰性の2値に変換して利用しているが、複数の試験結果を効果的に利用するために、実測値やそれを用いた距離に基づく類似性評価を検討する。
- EPによっては今回用いた試験結果では統計学的な関連性が認められなかったことから、他の試験データの活用も検討する。
- さらに、第一段階の化学構造情報を用いた類似性評価に関しても、分子記述子、正規化手法、物質間距離、ソース物質数、等の検討を進める。