

2023年日化協LRI 研究報告会（ウェブ開催）

2023年8月25日

シンポジウム：リスク評価手法の現状と今後

アカデミアにおけるリスク評価手法開発研究

吉成浩一

**静岡県立大学薬学部
衛生分子毒性学分野**



- 化学物質の**有害作用** を理解
- ヒトの**化学物質応答性**



- **安全・有益**な化学物質の開発
- 医薬品副作用の回避
- 疾病の予防・治療

化学物質：医薬品、食品、農薬、食品添加物、
一般工業物質、環境汚染物質...

研究テーマ紹介

核内受容体の機能と作用機序

リガンド

内因性物質

- ステロイドホルモン
- 脂肪酸
- 脂溶性ビタミン
- 甲状腺ホルモン
- 胆汁酸
- ステロール類

異物

- 医薬品
- 食品成分
- 農薬
- 環境汚染物質
- 工業化学物質

受容体

GR

ER

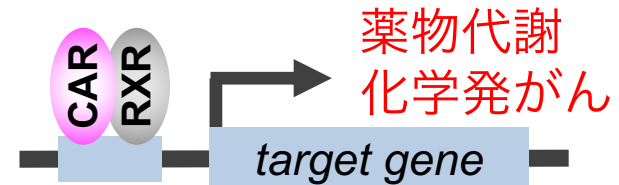
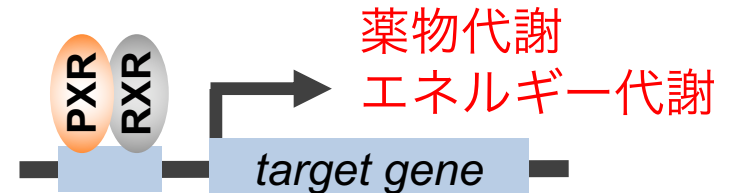
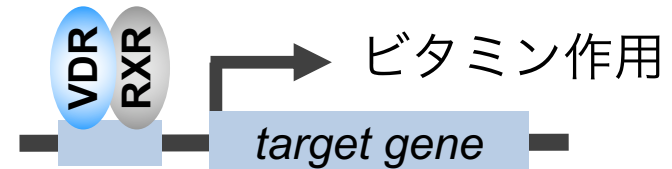
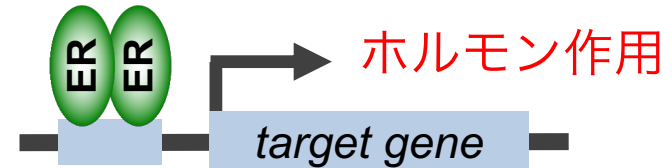
VDR

⋮

PXR

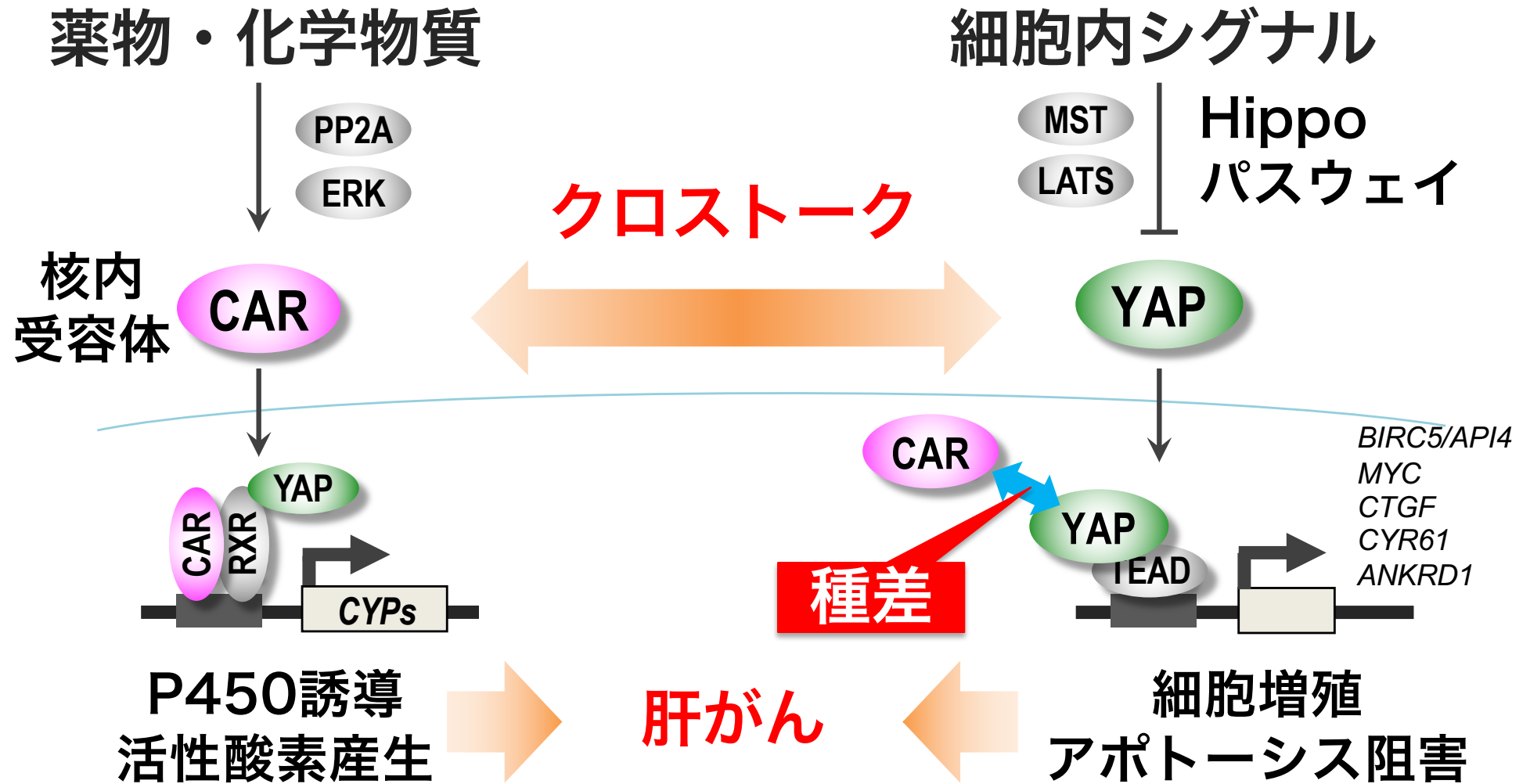
CAR

標的遺伝子・機能



- 生体には様々な化学物質に応答する核内受容体が存在する。
- これらの新たな機能や調節機構を明らかにしたい。

化学物質による肝発がん機構とその種差の解明



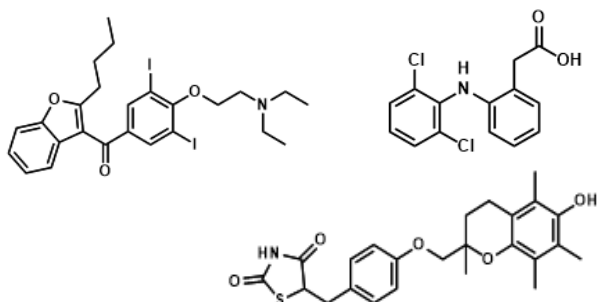
- 肝発がんプロモーターであるフェノバルビタールの発がん機序はよく分かっていなかった。
- 当研究室ではその機序を明らかにしつつあり、近い将来、我々の発見が教科書に載ることを期待している。

肝障害予測・評価手法の開発

化学物質

(医薬品、食品、農薬、化粧品、環境物質等)

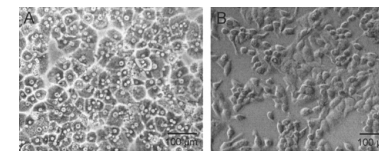
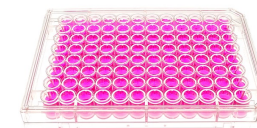
化学構造情報



分子記述子

毒性関連インビトロ試験

- 薬物代謝酵素
- トランスポーター
- 核内受容体
- 細胞傷害性
- 細胞小器官 (HCS)
- 炎症・酸化ストレス



ヒト肝細胞 HepG2細胞

統計解析 機械学習

毒性データ ベース

毒性予測・評価系

- 様々な生体応答、毒性発現機序の理解を進め、インビトロ試験等を利用した毒性予測系を開発する。
- 究極的には化学構造からの予測を目指す。



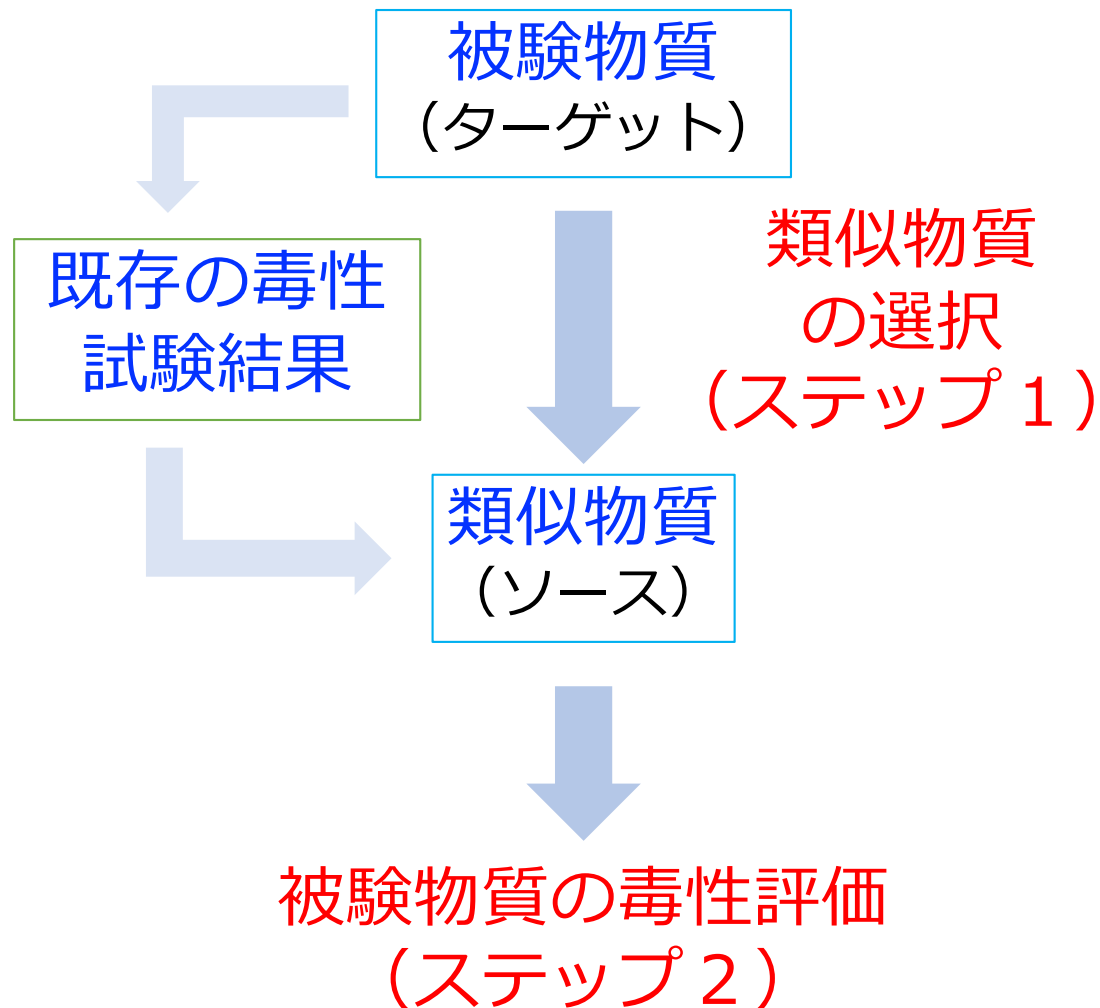
- 研究背景、当研究室の研究紹介
- 我が国における動物実験代替法開発の課題



- 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）とリードアクロスが有用かつ現実的な手段と考えられている。



リードアクロス手法の概略



課題

ステップ1

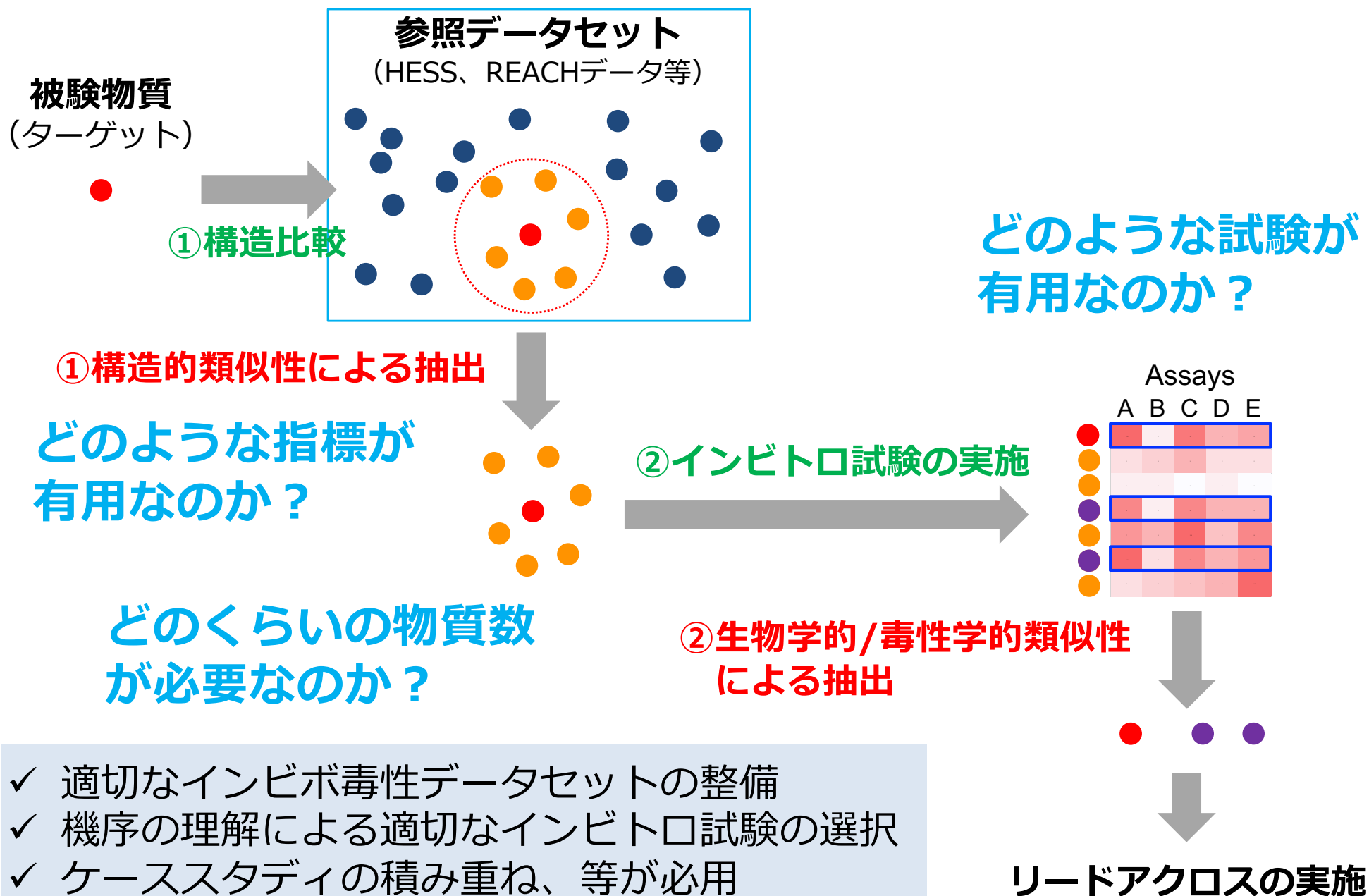
- どんな指標で類似性を判断？
- 化学構造のみ？
生物学的情報が必要？
機序の情報は必要？
- どの程度までが似てる物質？
- いくつの類似物質が必要？

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。 9

化学構造情報とインビトロ試験結果を利用した体系的なリードアクロス





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）

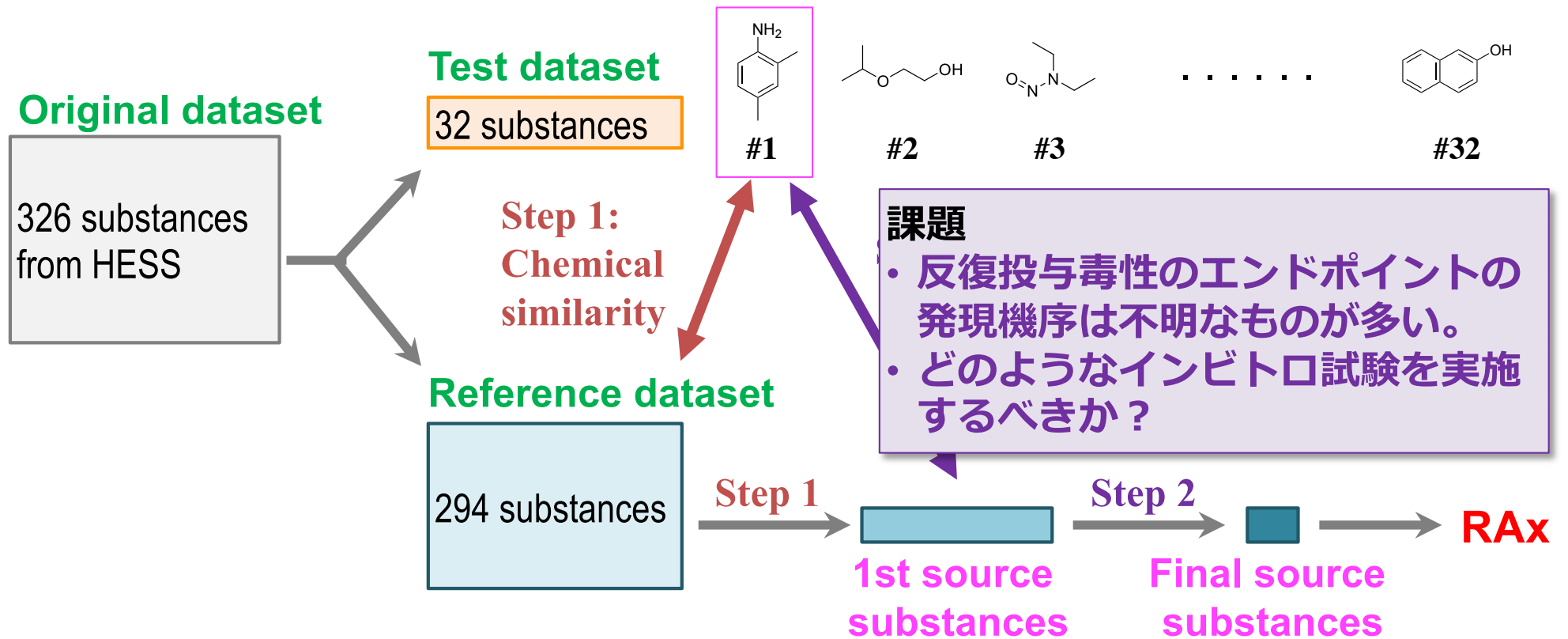
：鈴木知道（東京理科大学理工学部）

目的・概要

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）物質を抽出し、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。

現在、肝毒性と血液毒性を対象として、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」手法の構築に向けた解析を実施している。

研究方法概略



データセット

- HESSから326物質（主に化審法既存点検物質）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

使用するインビトロ試験データの選択



試験データとその陽性率

Category	Parameter	Positive ratio
Cytotox	LDH	16.0%
	CellTiter	26.9%
	GSH	25.2%
P450	CYP1A1	38.8%
	CYP1A2	21.4%
	CYP2B1	32.3%
	CYP2C6	29.3%
	CYP2D1	11.6%
	CYP2E1	8.2%
	CYP3A2	24.8%
HCA	Nuc	31.6%
	Mit	60.9%
	Factin	48.6%
	TG	34.7%
	PL	34.7%

使用するインビトロ試験変数の選択

- gEPの有無と各実験データの関連性をFisherの正確確率検定により解析
- 各カテゴリの中で、最も関連性の高かった変数を解析に使用

gEP	Cytotox		P450		HCA	
	Para.	p-value	Para.	p-value	Para.	p-value
LV01	LDH	0.3014	rCYP2B1	0.1397	Mit	0.3686
LV02	CellTiter	0.1233	rCYP2D1	0.0933	TG	0.0102
LV03	CellTiter	0.4636	rCYP2B1	0.0361	Nuc	0.3998
LV04	GSH	0.3330	rCYP2B1	0.0141	TG	0.4479
LV05	GSH	0.1376	rCYP2B1	0.0004	Mit	0.0549
LV06	LDH	0.0242	rCYP2B1	0.0004	TG	0.0136
BL01	GSH	0.0206	rCYP3A2	0.0026	TG	0.0009
BL02	GSH	0.3792	rCYP1A1	0.0087	PL	0.2850

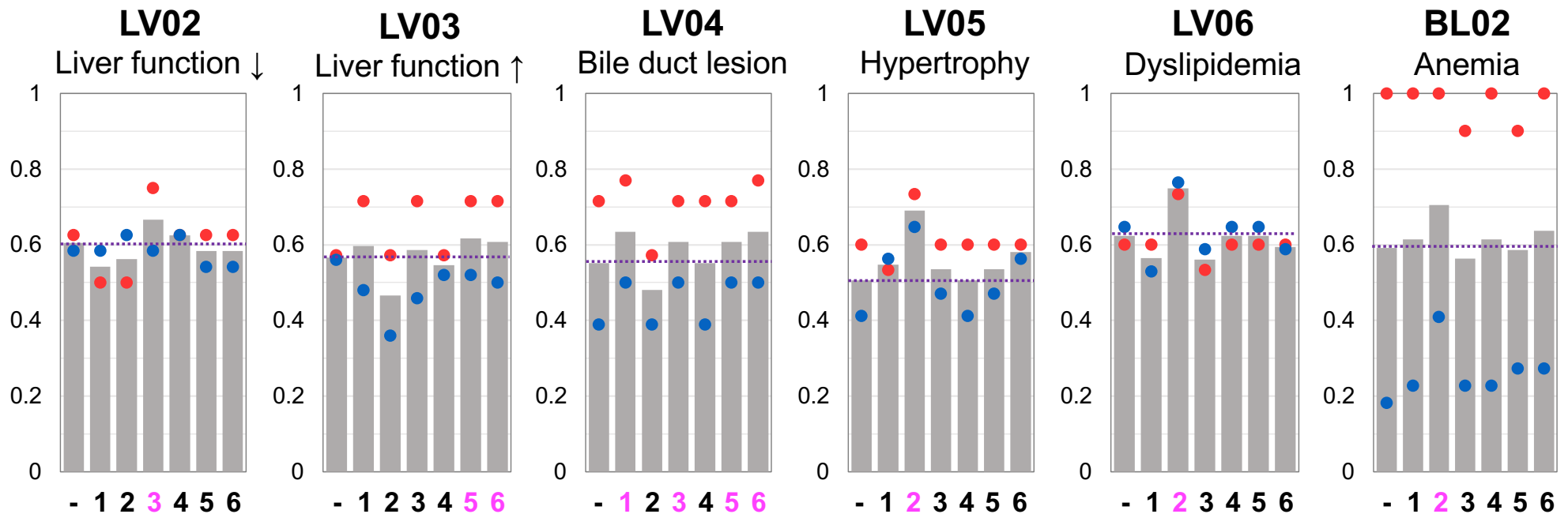
p<0.01
 p<0.05

2段階RAxの結果 (その1)



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

■ BA ● Sensitivity ● Specificity



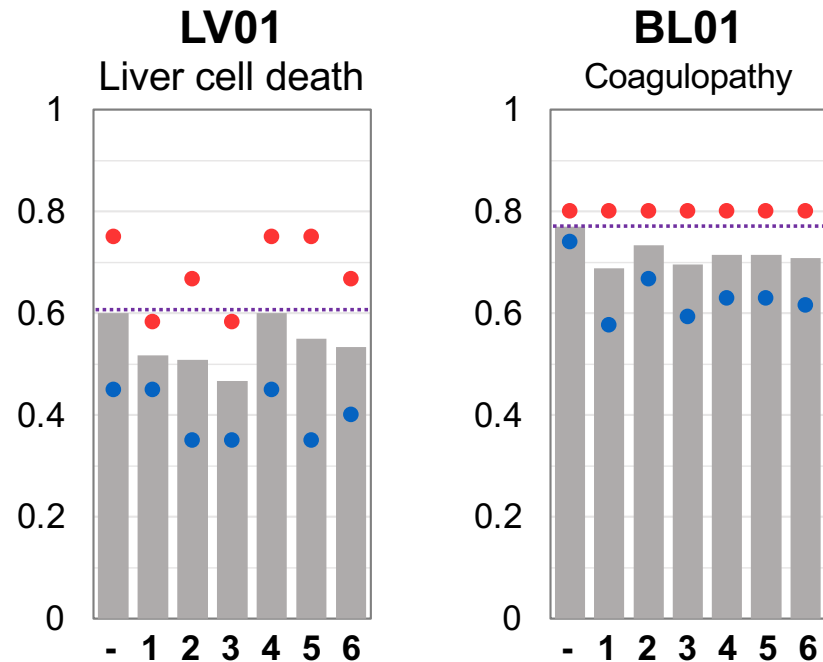
- インビトロ試験結果に基づいてソース物質を選択すると、多くのEPで予測精度が向上した。
- 特に、P450試験を利用した場合に向上の程度が顕著であった。
- 複数の試験結果を組み合わせた場合に、必ずしも単独利用の場合よりもよい精度が得られることはなかった。

2 段階RAX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。



- 毒性発現機序が複雑な全身毒性においては、**リードアクロス**による予測・評価がレギュラトリーサイエンスの観点からも現実的なアプローチになると考えられる。
- リードアクロスの実施には検討すべき事項は多いが、これまでの報告は毒性物質のケーススタディが中心であり、陰性物質も含めた体系的・網羅的な研究が必要と考えている。
- 反復投与毒性、発がん性、発達神経毒性などを対象に、化学構造情報とインビトロ試験情報に基づいた体系的なリードアクロス手法の基礎研究を実施している。
- インビトロ試験結果が精度向上に有用であることは示されつつあるが、機序が不明なエンドポイントも多く、さらなる精度向上には毒性発現機序の解明研究も必要である。



- 研究背景、当研究室の研究紹介
- 我が国における動物実験代替法開発の課題



KAKEN：科学研究費助成事業

データベース

検索対象研究

- 基盤研究S、A、B、C
- 2010年以降採択

S：5,000万円～2億円/5年間
 A：2,000万円～5,000万円/3～5年間
 B：500万円～2,000万円/3～5年間
 C：500万円以下/3～5年間

キーワード	S	A	B	C
-	1,177	8,583	41,108	159,257
動物実験代替法	1	8	27	80
機械学習	89	489	1,455	3,304
機械学習 + 動物実験代替法	1	1	1	4
三次元培養	4	24	137	392
三次元培養 + 動物実験代替法	0	1	4	14
iPS細胞	29	191	738	1,785
iPS細胞 + 動物実験代替法	0	5	10	21

「リードアクロス」は2件のみ



The 35th Annual Meeting of
the Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments

日本動物実験代替法学会 第35回大会

会期 2022年11月18日金～20日回

会場 静岡県立大学 草薙キャンパス
静岡市駿河区谷田52-1

大会長 吉成 浩一 静岡県立大学薬学部

テーマ **協働と協調で築く
新たな時代の3Rs**

一般演題募集 2022年6月開始予定

● 日本動物実験代替法学会第35回大会事務局
静岡県立大学薬学部 衛生分子毒性学分野内
〒422-8526 静岡市駿河区谷田52-1
TEL: 054-264-5685 FAX: 054-264-5685
E-mail: jsaae35@gmail.com

● 運営事務局
株式会社 静鉄アド・パートナーズ
〒420-0837 静岡市葵区日出町8番3号 静鉄日出町ビル1F
TEL: 054-252-3131 FAX: 054-254-1831
E-mail: jsaae35@shizutetsu-ad.co.jp

<https://jsaae35.secand.net/>

開催概要

特別講演：3題

シンポジウム：9セッション

参加者数：589名（招待者含む）

ポスター発表：74演題

シンポジウム

- Update on **skin sensitisation** and **photoallergy**
- 3Rsの原則に貢献するシミュレーションの戦略的活用
- 発達神経毒性の現状と今後の課題
- Strategy for development of in vitro immunotoxicity
- Context of Useから考える**microphysiological system**
- 動物実験代替法はどこまで活用可能か？ **業界における活用**の現状と課題
- 動物実験教育に係るアーカイブからの3Rs
- **動物を用いない新たなリスク評価アプローチ法 (Next Generation Risk Assessment)の開発 ～化粧品**の全身毒性評価に向けて～
- **ヒトiPS細胞**技術を活用した創薬応用研究の最前線

参加者数の割には一般演題数が少ない？



検索方法

- 対象：**第50回日本毒性学会 学術年会（2023年、横浜）**
- 一般演題 ポスター：318題、口頭：43題、**計361題**
- 要旨集を「**代替法or代替**」、「**リードアクロス**」、「**IATA**」で検索

結果

「代替法/代替」

ポスター：**16演題**、口頭発表：**5演題**

大学：13題（10機関）、企業：4題、PMDA：1題、国立衛研：2題
（1演題は内容的に代替法ではない）

「リードアクロス」

ポスター発表：**5演題**

（3題：吉成研、1題：コーセー株式会社、1題：サンスター株式会社）

「IATA」

ポスター発表：**1演題**（国立衛研：勝谷、山田ら）

25演題/361演題（6.9%）

The Toxicology Forum: Understanding through Dialogue



Understanding through Dialogue



ABOUT THE FORUM ▾

MEETINGS ▾

MEMBERSHIP ▾

SPONSORSHIP ▾

COLLABORATION ▾

AWARDS ▾



The Toxicology Forum is an international non-profit organization that is devoted to **fostering deliberative dialogue** which shapes decision-making and outcomes on critical issues in toxicology and its applications for purposes of promoting and protecting public health.

<https://toxforum.site-ym.com>

**LRI研究の一環として、ディスカッションの場を作ろうと考えています。
ご興味のある方はご連絡ください。**



- 世界的な動物実験削減の要求に対応するため、多くの基礎・応用研究が必要である。
- しかし、我が国においては研究費・研究人口の両面において欧米に比べて大きく遅れている。
- 日化協LRI等の支援を受けながら、私達はリードアクトスの基礎研究に取り組んでいるが、解決すべき課題は多く、1研究グループでできることは限られている。
- 我が国における、動物実験によらない化学物質のリスク評価体制の構築には、個々の研究の進展だけでなく、産官学の研究者・関係者の**対話**と**協働**が必須である。