

令和6年度食品健康影響評価技術研究成果発表会
2025年2月26日 ウェブ開催

**令和4～5年度食品健康影響評価技術研究
化学物質による非遺伝毒性発がんの
新規リスク予測・評価手法の開発
(JPCAFSC20222206)**

**主任研究者
吉成浩一（静岡県立大学薬学部）**

**分担研究者
竹下潤一（産業技術総合研究所）**



本日の内容



- 研究背景・目的
- リードアクロスによる発がん性予測：結果と考察
- 終わりに

本日の内容



- 研究背景・目的
- リードアクロスによる発がん性予測：結果と考察
- 終わりに

研究背景

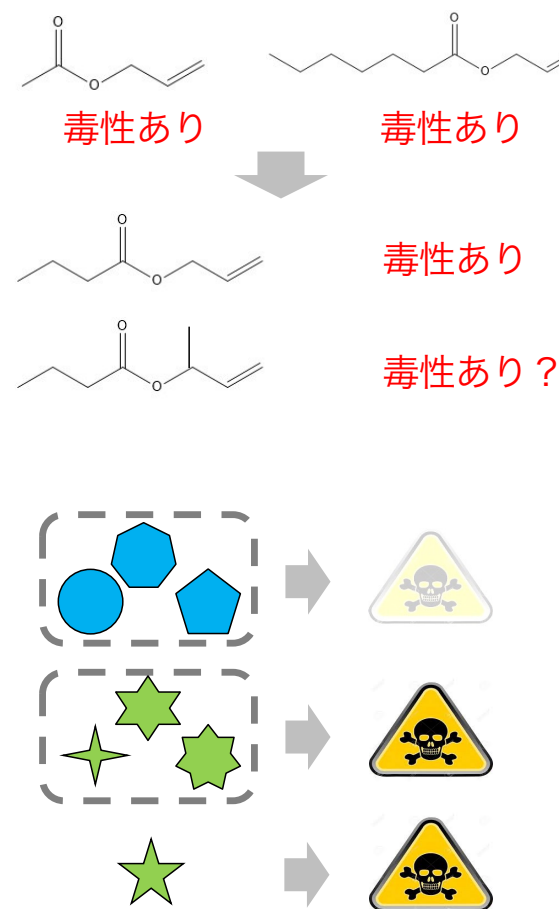


- 化学物質の安全性は主に動物実験結果を基に評価されているが、世界的に動物実験代替法の開発が強く求められている。
- EUにおける動物実験が行われた化粧品完成品、原料及び配合原料の販売禁止（2013年）、米国環境保護庁による哺乳類を用いた試験の要求停止並びに研究費補助の30%削減（2025年まで）並びに全廃（2035年まで）の発表など、その流れは加速している。
- 医薬品開発においても、2023年1月の「米国食品医薬品局近代化法2.0」では、動物試験の義務は撤廃され、患者の安全を優先し、代替法が動物試験と同等であると証明された場合には、評価に利用できることが示された。
- さらに、毒性機序研究の成果等に基づき、adverse outcome pathway (AOP) が構築、整備、公開されている。
- また、microphysiological system (MPS) や人工知能 (AI) /機械学習の技術開発により、限られた物質群における特定のエンドポイントの有無については、ある程度の精度で予測可能になりつつある。

研究背景（続き）



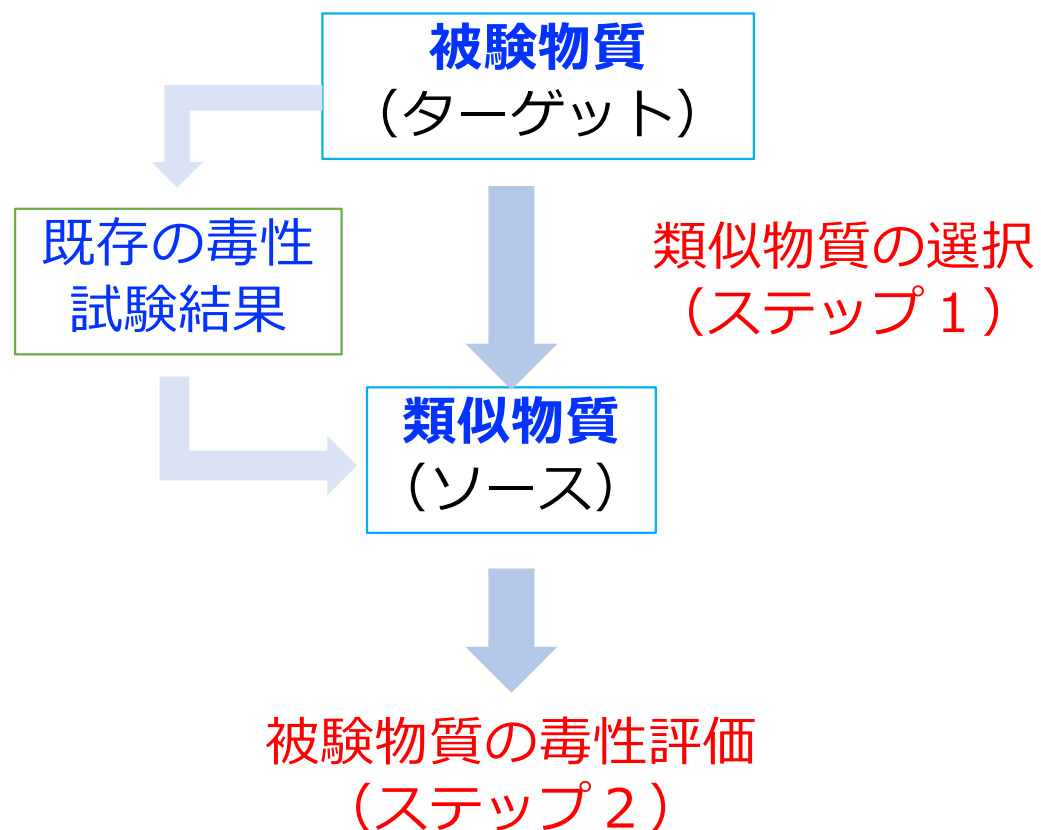
- しかし、化学物質の安全性評価において重要な反復投与毒性や、重篤な毒性である発がん性や生殖発生毒性などに関しては、その毒性の多様さ、複雑さなどの理由から動物実験代替法の開発はほとんど進んでいない。
- AI/機械学習への期待は大きいですが、予測手法を開発するために必要な学習用データが少ないこと、既存の手法では予測の根拠情報が得られないこと、などの課題がある。
- このような状況において、複雑な毒性の評価に、**グルーピングアプローチ**（カテゴリーアプローチ）と**リードアクロス**が有用かつ現実的な手段と考えられている。
- 欧州を中心に、リードアクロスのケーススタディ研究やガイドラインの策定が行われ、規制（REACH等）への応用がなされつつある。



リードアクロスの概要と課題



リードアクロス手法の概略



課題

ステップ1

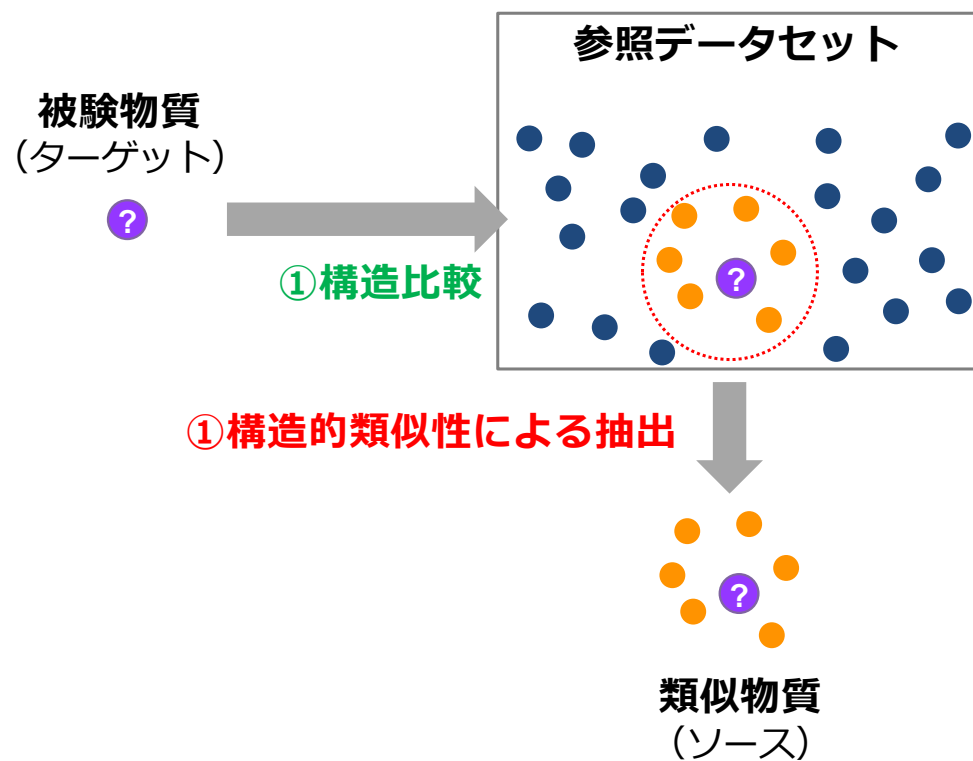
- どのような指標で類似性を判断するか？
- 化学構造のみで十分か？
- どの程度までが似てる物質か？
- 類似物質をどこから選ぶか？
- いくつの類似物質が必要か？

ステップ2

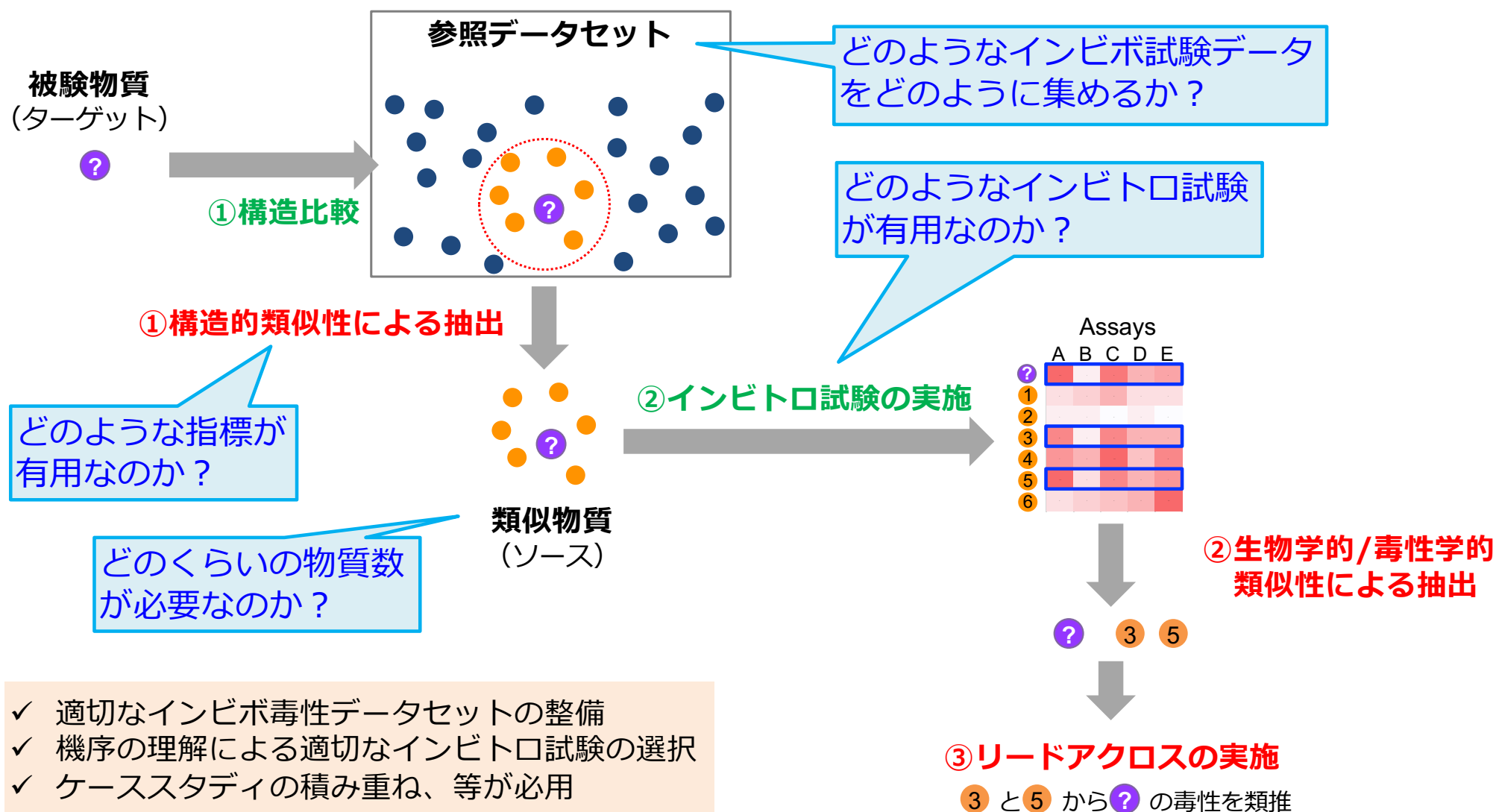
- どのように毒性を判断するか？
 - 多数決でよいのか？ 1つでも毒性物質があれば毒性ありと判断してよいのか？
 - 定量的評価（NOAELの予測等）は可能か？
- など

■ リードアクロスの概念はシンプルだが、実施には課題が多い。

研究アプローチ：インシリコ・インビトロ統合型の2段階リードアクロス



研究アプローチ：インシリコ・インビトロ統合型の2段階リードアクロス



本日の内容



- 研究背景・目的
- リードアクロスによる発がん性予測：結果と考察
- 終わりに

方法：データセットと被験物質



- 農薬評価書からラット 2 年間発がん性試験（反復投与毒性試験併合試験を含む）のデータを収集した。
- 下表のいずれかの臓器に、雌雄いずれかで良性・悪性腫瘍（本研究では「がん」と表記）を生じた80農薬を「発がん物質」、いずれの臓器にも腫瘍を生じなかった46農薬を「非発がん物質」として選択した。
- 上記80農薬はいずれも非遺伝毒性発がん性物質と考察されている。
- 鼻腔がん、胃がん、膀胱・尿路がんをまとめた「細胞傷害性（cytotoxic）がん」を作成し解析に利用した。
- これらの市販品を購入し、インビトロ試験に利用した。

	Liver	Thyroid	Testis	Uterus	Ovary	Breast	Nasal cavity	Stomach	Bladder/urethra	Cytotoxic
Numbers	32	34	13	8	2	2	5	6	7	16
Ratio	25.4%	27.0%	10.3%	6.3%	1.6%	1.6%	4.0%	4.8%	5.6%	12.7%



- ## 本研究におけるリードアクロスの概要



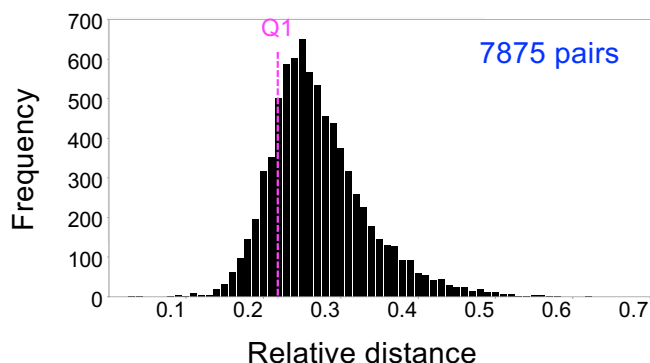
方法：分子記述子・物質間距離の計算、インビトロ試験



分子記述子・物質間距離

- ✓ alvaDescを用いて分子記述子を計算した。
- ✓ 3D記述子、一定値であった記述子を除き、残った2297記述子を利用した。
- ✓ 各記述子を正規化（0～1の値に変換）後、全126物質間（7875ペア）のユークリッド距離を算出した。
- ✓ 計算した距離を、理論上の最大距離（ $\sqrt{2297}$ ）を1とする相対距離に変換した。

相対距離の分布



Max.	0.620
Min.	0.033
Q1	0.229
Median	0.261

インビトロ試験

- ✓ 126物質を以下のインビトロ試験に付した。
- ✓ 各試験について、溶媒対照群の実験誤差をもとに閾値を設定し、「陽性・陰性」を判定し、ソース物質の選択に利用した。

Cytotoxicity in HepG2 cells

LDH assay, CellTiter assay (ATP), cellular GSH levels

Xenobiotic-responsive nuclear receptors (activation)

Rat AHR, PXR, PPAR α , RXR α

Hormone-related nuclear receptors

(agonist/antagonist)

Human ER α , ER β , AR, PR

P450 induction in rat primary hepatocytes

Cyp1a1, Cyp2b1, Cyp3a1, Cyp4a1 mRNA levels

P450 inhibition

Rat CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2C6, CYP2D1, CYP3A2

解析対象のがんと関連AOP



鼻腔がん、胃がん、膀胱がん

- **AOP 115:** Epithelial cytotoxicity leading to forestomach tumors (in mouse and rat)
- **AOP 136:** Intracellular acidification induced olfactory epithelial injury leading to site of contact nasal tumors
- **AOP 121:** Urinary bladder calculi leading to urothelial papillomas and carcinomas (in mouse and rat)

甲状腺がん

- **AOP162:** Enhanced hepatic clearance of thyroid hormones leading to thyroid follicular cell adenomas and carcinomas in the rat and mouse

肝がん

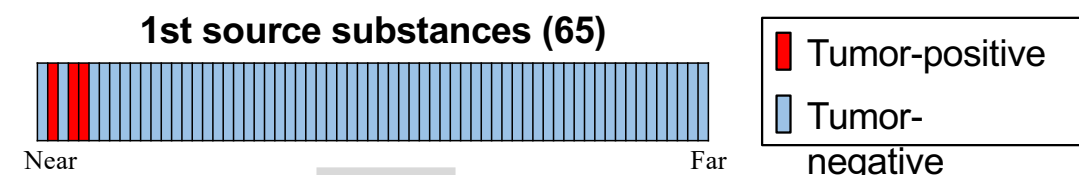
- **AOP 37:** PPAR α activation leading to hepatocellular adenomas and carcinomas in rodents
- **AOP 41:** Sustained AhR activation leading to rodent liver tumours
- **AOP 107:** Constitutive androstane receptor activation leading to hepatocellular adenomas and carcinomas in the mouse and the rat

方法：インビトロ試験結果によるソース物質選択の例



例) GSHアッセイを利用した農薬P032の胃がん予測

ID	Stomach tumor	GSH assay	Prediction	Judge-ment	Final sources	Tumor-positives
P032	Positive	Positive	Negative	False	65	3 (4.6%)



GSHアッセイの結果が、P032と一致する物質のみを最終ソース物質として選択

ID	Stomach tumor	GSH assay	Prediction	Judge-ment	Final sources	Tumor-positives
P032	Positive	Positive	Positive	True	22	3 (13.6%)



データセットの胃がん陽性率：4.8%

- 一次ソース物質の胃がん陽性率： 4.6% ⇒ 判定：陰性
- 最終ソース物質の胃がん陽性率：13.6% ⇒ 判定：陽性

➤ インビトロ試験結果に基づいてソース物質を選択することで、予測が「陰性」から「陽性」に変化し、予測が的中するようになった（False→True）。

結果：発がん性とインビトロ試験結果の関連性

- 発がん性とインビトロ試験結果の関連性を、Fisherの正確確率検定（F）とWilcoxonの順位和検定（W）により解析した。

	Liver		Thyroid		Testis		Uterus		Ovary		Mammary		Nasal cavity		Stomach		Bladder/urethra	
	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W
LDH assay	1.000	0.255	0.842	0.832	1.000	0.534	1.000	0.468	0.501	0.254	1.000	0.675	0.175	0.031	0.090	0.009	0.243	0.655
CellTiter assay	1.000	1.000	0.157	0.154	1.000	0.892	1.000	0.972	0.509	0.188	0.509	0.052	0.649	0.417	0.082	0.083	0.130	0.103
GSH assay	1.000	0.693	1.000	0.477	0.557	0.718	1.000	0.708	1.000	0.418	0.525	0.208	0.069	0.042	0.030	0.002	0.708	0.907
AHR activation	1.000	0.783	0.772	0.836	0.015	0.532	0.595	0.267	1.000	0.705	1.000	0.264	1.000	0.259	0.585	0.113	0.049	0.100
PXR activation	0.683	0.797	0.007	0.036	1.000	0.719	1.000	0.477	0.513	0.154	1.000	0.775	1.000	0.975	1.000	0.977	0.700	0.885
PPARα activation	1.000	0.188	1.000	0.344	0.040	0.824	0.596	0.070	1.000	0.414	1.000	0.473	0.096	0.111	1.000	0.138	1.000	0.171
RXRα activation	0.112	0.002	0.681	0.221	0.593	0.898	1.000	0.869	1.000	0.946	1.000	0.103	1.000	0.121	1.000	0.206	0.376	0.907
ERα (agonist)	0.655	0.913	0.194	0.405	0.754	0.480	0.104	0.392	0.503	0.513	0.503	0.464	1.000	0.803	0.670	0.439	0.193	0.044
ERβ (agonist)	NA	0.368	NA	0.936	NA	0.232	NA	0.948	NA	0.305	NA	0.305	NA	0.960	NA	0.684	NA	0.587
AR (agonist)	0.692	0.608	1.000	0.993	1.000	0.968	1.000	0.791	1.000	0.807	0.138	0.354	1.000	0.245	0.365	0.362	1.000	0.332
PR (agonist)	1.000	0.458	1.000	0.798	0.543	0.320	1.000	0.545	1.000	0.992	1.000	0.992	1.000	0.424	0.295	0.426	1.000	1.000
ERα (antagonist)	0.589	0.321	0.793	0.847	0.700	0.974	1.000	0.586	1.000	0.346	1.000	0.377	0.003	0.026	0.001	0.005	0.606	0.179
ERβ (antagonist)	0.606	0.228	0.124	0.357	0.460	0.826	1.000	1.000	1.000	0.346	1.000	0.223	0.049	0.082	0.086	0.088	0.620	0.279
AR (antagonist)	0.278	0.844	0.681	0.869	0.541	0.320	0.711	0.780	1.000	0.271	1.000	0.866	0.053	0.073	0.665	0.337	1.000	0.737
PR (antagonist)	0.674	0.867	0.039	0.156	0.766	0.613	1.000	0.673	0.518	0.388	1.000	0.929	0.647	0.534	1.000	0.958	0.703	0.221
Cyp2b1 mRNA	0.023	0.020	0.122	0.032	1.000	0.718	0.104	0.069	0.491	0.868	1.000	0.838	0.623	0.745	0.352	0.540	1.000	0.450
Cyp2b1/Cyp3a1 mRNA ratio	0.038	0.010	0.230	0.203	0.143	0.208	0.139	0.034	0.511	0.552	0.168	0.364	1.000	0.617	0.690	0.718	1.000	0.924
Cyp2b1/Cyp4a1 mRNA ratio	0.132	0.103	0.010	0.003	0.759	0.328	0.267	0.062	0.552	0.591	0.552	0.915	1.000	0.910	0.399	0.333	0.685	0.509
Cyp1a1 mRNA	0.656	0.869	0.513	0.501	0.061	0.134	0.434	0.745	0.514	0.899	0.089	0.055	0.637	0.990	1.000	0.586	0.197	0.070
Cyp3a1 mRNA	0.839	0.468	0.002	0.005	0.379	0.400	0.068	0.108	1.000	0.992	0.499	0.279	0.661	0.177	0.094	0.214	0.451	0.229
Cyp4a1 mRNA	0.776	0.206	0.041	0.022	1.000	0.268	0.600	0.438	1.000	0.068	1.000	0.591	0.544	0.832	0.204	0.345	0.592	0.327
CYP1A1 inhibition	0.518	0.931	0.020	0.172	0.216	0.006	0.715	0.753	1.000	0.675	1.000	0.915	0.660	0.774	0.663	0.904	0.421	0.051
CYP1A2 inhibition	0.655	0.566	1.000	0.723	0.200	0.046	1.000	0.480	0.503	0.747	0.503	0.296	0.320	0.207	0.670	0.387	0.193	0.141
CYP2B1 inhibition	0.688	0.860	0.428	0.631	0.771	0.804	1.000	1.000	1.000	0.385	1.000	0.838	0.185	0.094	0.418	0.087	0.705	0.572
CYP2C6 inhibition	0.300	0.790	0.026	0.181	1.000	0.625	0.476	0.154	1.000	0.605	1.000	0.792	0.647	0.365	0.681	0.891	0.242	0.860
CYP2D1 inhibition	0.779	0.433	1.000	0.086	0.108	1.000	0.100	0.238	1.000	0.286	1.000	0.094	1.000	0.069	0.590	0.082	0.284	0.047
CYP3A2 inhibition	0.838	0.551	1.000	0.731	0.383	0.286	0.298	0.166	0.502	0.245	0.196	0.296	0.381	0.424	0.692	0.339	0.131	0.349

結果：発がん性とインビトロ試験結果の関連性

- 発がん性とインビトロ試験結果の関連性を、Fisherの正確確率検定（F）とWilcoxonの順位和検定（W）により解析した。

	Liver		Thyroid		Testis		Uterus		Ovary		Mammary		Nasal cavity		Stomach		Bladder/urethra	
	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W	F	W
LDH assay	1.000	0.255	0.842	0.832	1.000	0.534	1.000	0.468	0.501	0.254	1.000	0.675	0.175	0.031	0.090	0.009	0.243	0.655
CellTiter assay	1.000	1.000	0.157	0.154	1.000	0.892	1.000	0.972	0.509	0.188	0.509	0.052	0.649	0.417	0.082	0.083	0.130	0.103
GSH assay	1.000	0.693	1.000	0.477	0.557	0.718	1.000	0.708	1.000	0.418	0.525	0.208	0.069	0.042	0.030	0.002	0.708	0.907
AHR activation	1.000	0.783	0.772	0.836	0.015	0.532	0.595	0.267	1.000	0.705	1.000	0.264	Nasal/stomach tumors & cytotox assays					
PXR activation	0.683	0.797	0.007	0.036	1.000	0.719	1.000	0.477	0.513	0.154	1.000	0.775						
PPARα activation	1.000	0.188	1.000	0.344	0.040	0.824	0.596	0.070	1.000	0.414	1.000	0.473						
RXRα activation	0.112	0.002	0.681	0.221	0.593	0.898	1.000	0.869	1.000	0.946	1.000	0.103						
ERα (agonist)	0.655	0.913	0.194	0.405	0.754	0.480	0.104	0.392	0.503	0.513	0.503	0.464	1.000	0.803	0.670	0.439	0.193	0.044
ERβ (agonist)	Liver tumors & CAR activation		Thyroid tumors & enzyme induction						0.948	NA	0.305	NA	0.305	NA	0.960	NA	0.684	NA
AR (agonist)									0.791	1.000	0.807	0.138	0.354	1.000	0.245	0.365	0.362	1.000
PR (agonist)									0.545	1.000	0.992	1.000	0.992	1.000	0.424	0.295	0.426	1.000
ERα (antagonist)									0.586	1.000	0.346	1.000	0.377	0.003	0.026	0.001	0.005	0.606
ERβ (antagonist)	0.606	0.228	0.124	0.357	0.460	0.826	1.000	1.000	1.000	0.346	1.000	0.223	0.049	0.082	0.086	0.088	0.620	0.279
AR (antagonist)	0.278	0.844	0.681	0.869	0.541	0.320	0.711	0.780	1.000	0.271	1.000	0.866	0.053	0.073	0.665	0.337	1.000	0.737
PR (antagonist)	0.674	0.867	0.039	0.156	0.766	0.613	1.000	0.673	0.518	0.388	1.000	0.929	0.647	0.534	1.000	0.958	0.703	0.221
Cyp2b1 mRNA	0.023	0.020	0.122	0.032	1.000	0.718	0.104	0.069	0.491	0.868	1.000	0.838	0.623	0.745	0.352	0.540	1.000	0.450
Cyp2b1/Cyp3a1 mRNA ratio	0.038	0.010	0.230	0.203	0.143	0.208	0.139	0.034	0.511	0.552	0.168	0.364	1.000	0.617	0.690	0.718	1.000	0.924
Cyp2b1/Cyp4a1 mRNA ratio	0.132	0.103	0.010	0.003	0.759	0.328	0.267	0.062	0.552	0.591	0.552	0.915	1.000	0.910	0.399	0.333	0.685	0.509
Cyp1a1 mRNA	0.656	0.869	0.513	0.501	0.061	0.134	0.434	0.745	0.514	0.899	0.089	0.055	0.637	0.990	1.000	0.586	0.197	0.070
Cyp3a1 mRNA	0.839	0.468	0.002	0.005	0.379	0.400	0.068	0.108	1.000	0.992	0.499	0.279	0.661	0.177	0.094	0.214	0.451	0.229
Cyp4a1 mRNA	0.776	0.206	0.041	0.022	1.000	0.268	0.600	0.438	1.000	0.068	1.000	0.591	0.544	0.832	0.204	0.345	0.592	0.327
CYP1A1 inhibition	0.518	0.931	0.020	0.172	0.216	0.006	0.715	0.753	1.000	0.675	1.000	0.915	0.660	0.774	0.663	0.904	0.421	0.051
CYP1A2 inhibition	0.655	0.566	1.000	0.723	0.200	0.046	1.000	0.480	0.503	0.747	0.503	0.296	0.320	0.207	0.670	0.387	0.193	0.141
CYP2B1 inhibition	0.688	0.860	0.428	0.631	0.771	0.804	1.000	1.000	1.000	0.385	1.000	0.838	0.185	0.094	0.418	0.087	0.705	0.572
CYP2C6 inhibition	0.300	0.790	0.026	0.181	1.000	0.625	0.476	0.154	1.000	0.605	1.000	0.792	0.647	0.365	0.681	0.891	0.242	0.860
CYP2D1 inhibition	0.779	0.433	1.000	0.086	0.108	1.000	0.100	0.238	1.000	0.286	1.000	0.094	1.000	0.069	0.590	0.082	0.284	0.047
CYP3A2 inhibition	0.838	0.551	1.000	0.731	0.383	0.286	0.298	0.166	0.502	0.245	0.196	0.296	0.381	0.424	0.692	0.339	0.131	0.349

- 肝がん、甲状腺がん、鼻腔がん、胃がんでは、予期した関連性が認められた。
- ホルモン関連性とホルモン関連受容体作用との間に関連性は認められなかった。



結果：細胞傷害関連がん

解析対象のがんと関連AOP



鼻腔がん、胃がん、膀胱がん

- **AOP 115:** Epithelial cytotoxicity leading to forestomach tumors (in mouse and rat)
- **AOP 136:** Intracellular acidification induced olfactory epithelial injury leading to site of contact nasal tumors
- **AOP 121:** Urinary bladder calculi leading to urothelial papillomas and carcinomas (in mouse and rat)

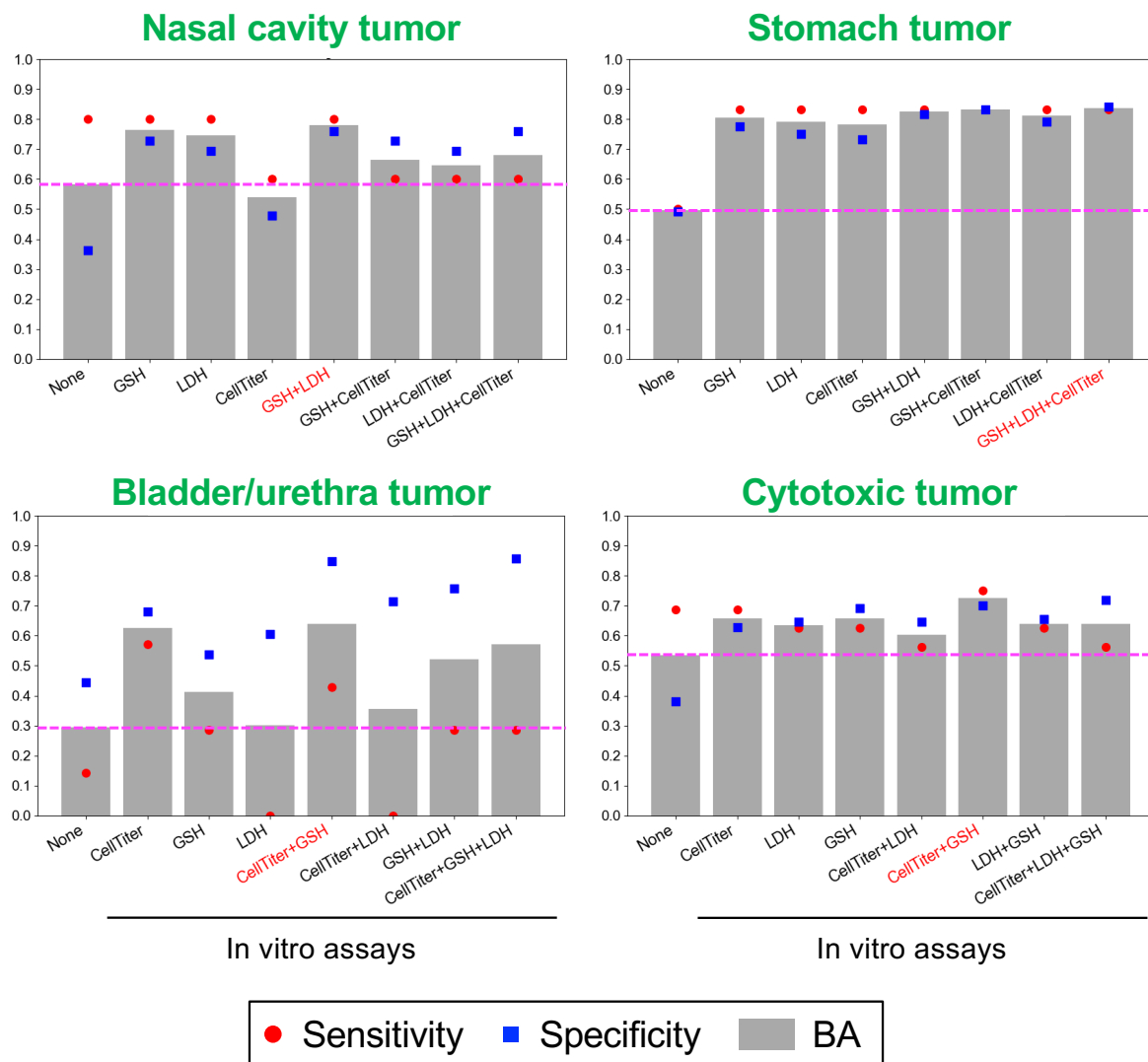
甲状腺がん

- **AOP162:** Enhanced hepatic clearance of thyroid hormones leading to thyroid follicular cell adenomas and carcinomas in the rat and mouse

肝がん

- **AOP 37:** PPAR α activation leading to hepatocellular adenomas and carcinomas in rodents
- **AOP 41:** Sustained AhR activation leading to rodent liver tumours
- **AOP 107:** Constitutive androstane receptor activation leading to hepatocellular adenomas and carcinomas in the mouse and the rat

結果：細胞傷害性関連がん – インビトロ試験利用の効果



Fisherの正確確率検定 P 値

Types of tumors	Nasal cavity	Stomach	Bladder/urethra	Cytotoxic
# positives	5	6	7	16
LDH	0.175	0.090	0.243	0.015
CellTiter	0.649	0.082	0.130	0.029
GSH	0.069	0.030	0.708	0.167

← 一次ソースのみ (None) のBA

- 全分子記述子（2297記述子）を利用して一次ソース物質を選択した。
- 3種類の細胞傷害性関連試験の結果を、単独または組合せて使用した。
- いずれのがんにおいても、インビトロ試験結果でソース物質を絞り込むことで一致率が向上した。
- 膀胱・尿路がんにおける精度が低かった理由として、インビトロ試験が適切ではなかった可能性があり、関連性解析の結果もこれを支持している。

結果：細胞傷害性関連がん – 記述子選択の効果

- 記述子のみの精度が必ずしも高くなかったことから、発がん性に関連のある記述子を選択した。

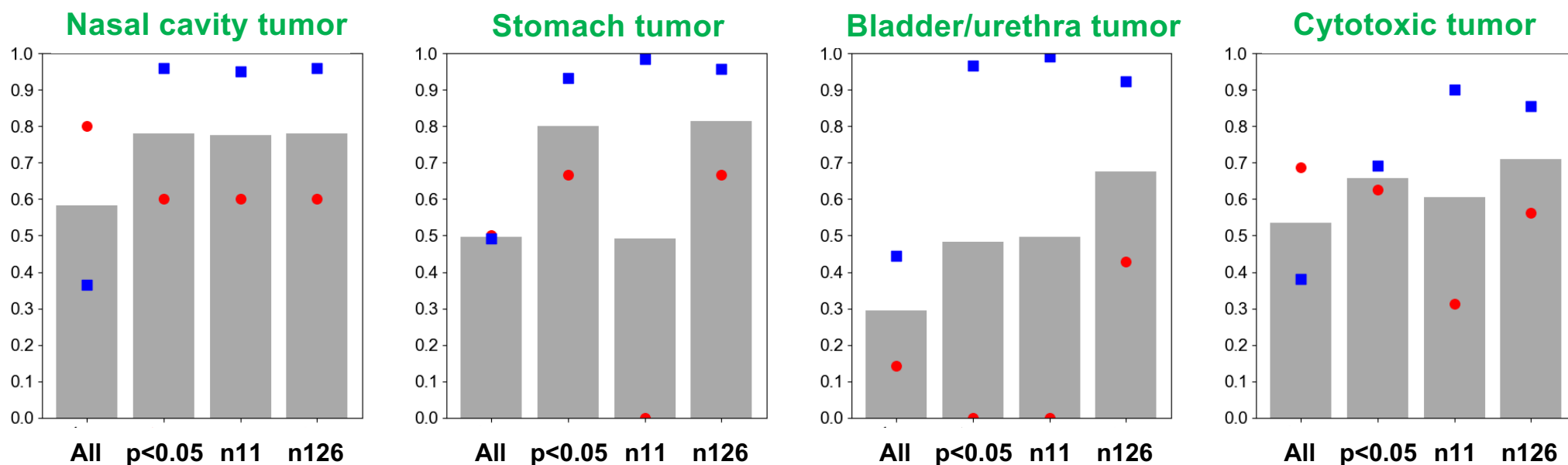
All 一定数値ではない3D記述子を除く全記述子

$p < 0.05$ 相関係数 > 0.99 の記述子ペアの片方を削除後、Wilcoxon 順位検定で各がんの有無で有意差 ($p < 0.05$) が認められた記述子

n11 $p < 0.05$ のうち、 p 値が低い上位11記述子

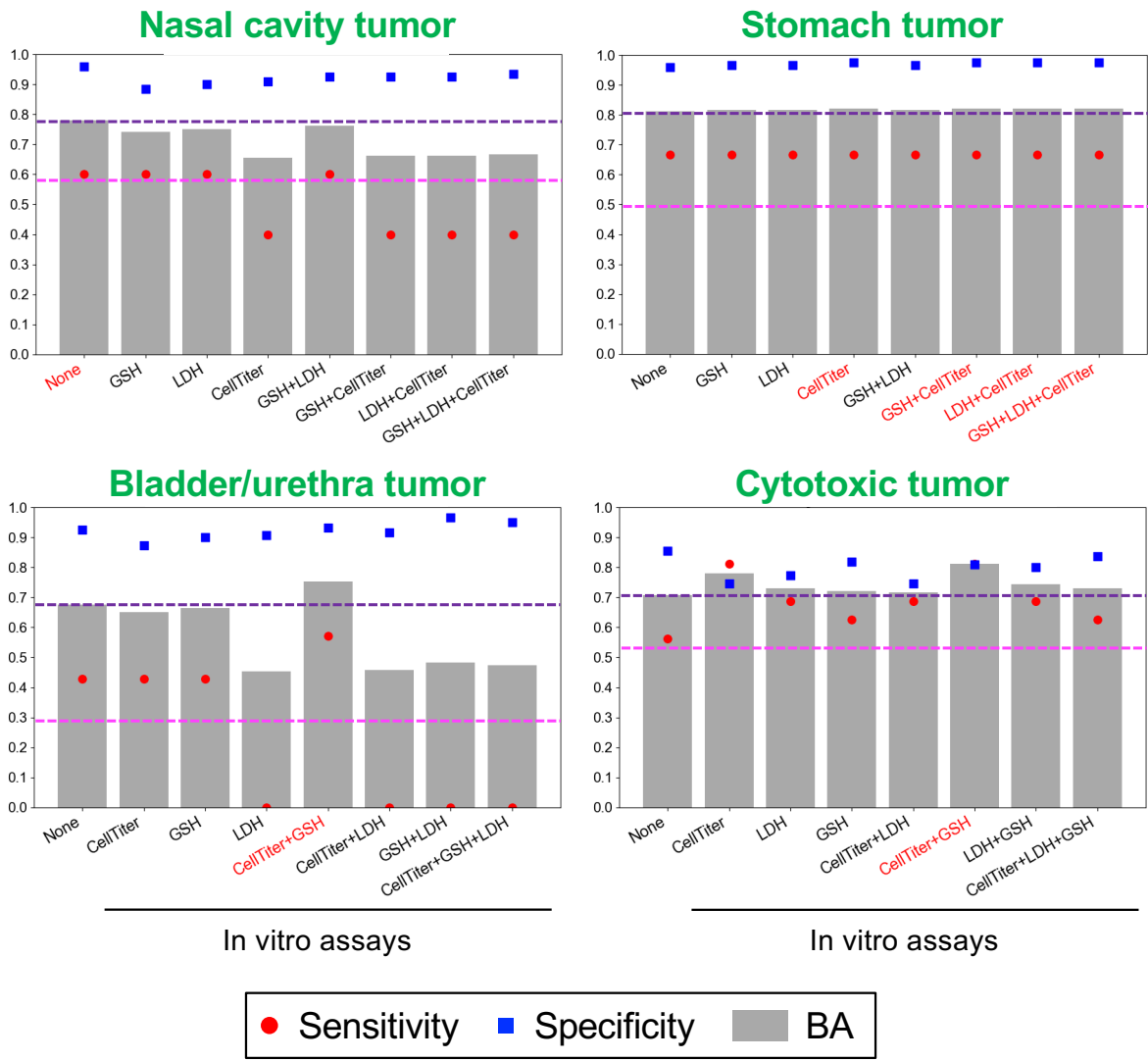
n126 $p < 0.05$ のうち、 p 値が低い上位126記述子

● Sensitivity ■ Specificity ■ BA



- 発がん性に関連する分子記述子を選択することで特異度の著しい向上が認められ、結果として全体の一致率も向上した。

結果：細胞傷害性関連がん



一次ソースのみ
(None) のBA

n126

All

Fisherの正確確率検定p値

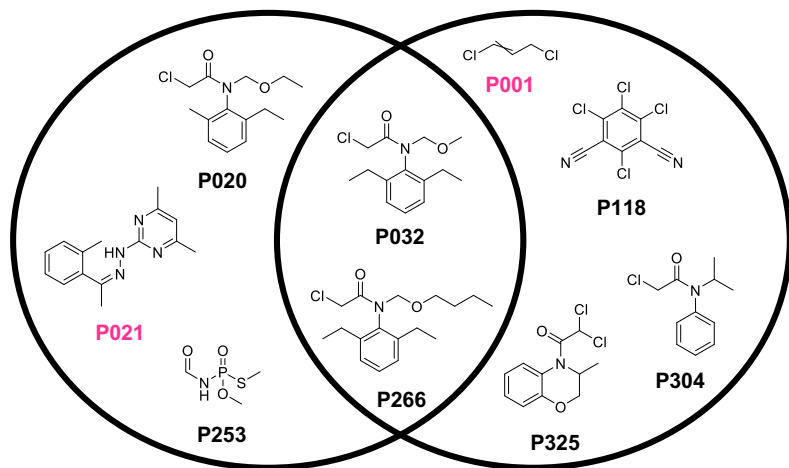
Types of tumors	Nasal cavity	Stomach	Bladder/urethra	Cytotoxic
# positives	5	6	7	16
LDH	0.175	0.090	0.243	0.015
CellTiter	0.649	0.082	0.130	0.029
GSH	0.069	0.030	0.708	0.167

- N126記述子セットを用いて一次ソース物質を選択したのち、インビトロ試験によりソース物質の絞り込みを行った。
- 鼻腔がんではインビトロ試験による絞り込みの効果は認められなかったが、その他のがんでは絞り込みによる精度向上が認められた。
- 最終的なBAは0.75~0.82となった。

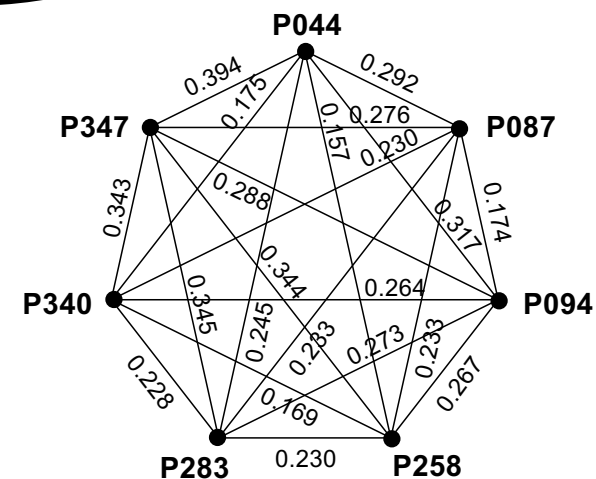
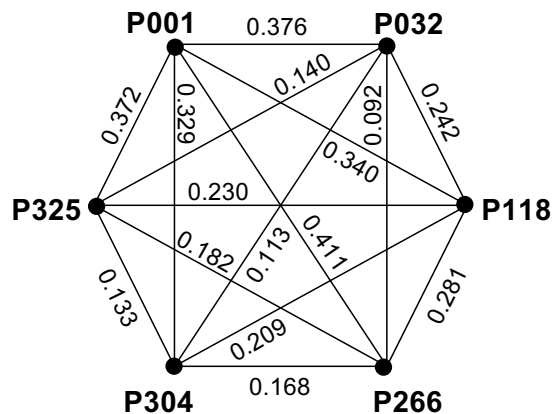
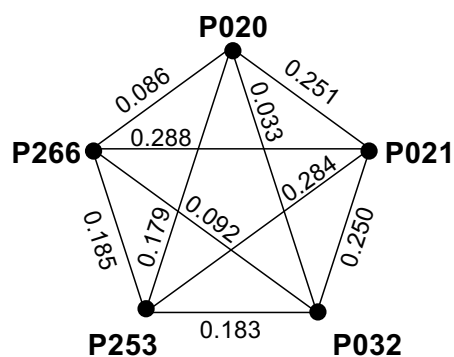
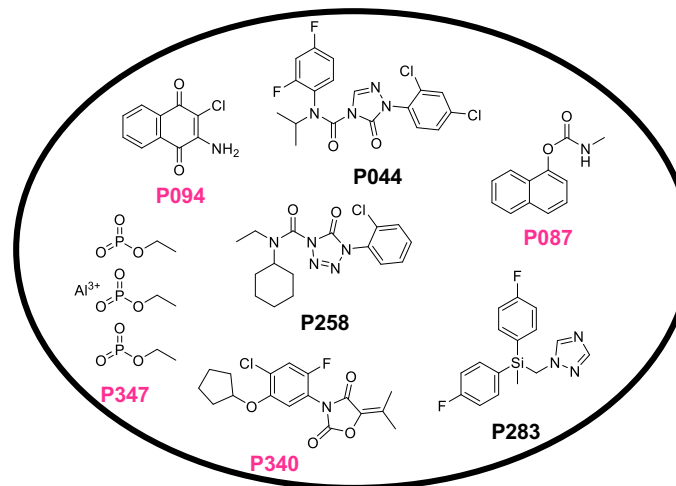
細胞傷害性関連がん陽性物質の化学構造と類似性



Nasal cavity tumor Stomach tumor



Bladder/urethra tumor





結果：甲状腺がん

解析対象のがんと関連AOP



鼻腔がん、胃がん、膀胱がん

- **AOP 115:** Epithelial cytotoxicity leading to forestomach tumors (in mouse and rat)
- **AOP 136:** Intracellular acidification induced olfactory epithelial injury leading to site of contact nasal tumors
- **AOP 121:** Urinary bladder calculi leading to urothelial papillomas and carcinomas (in mouse and rat)

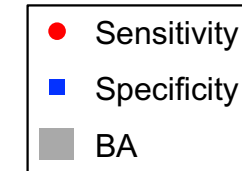
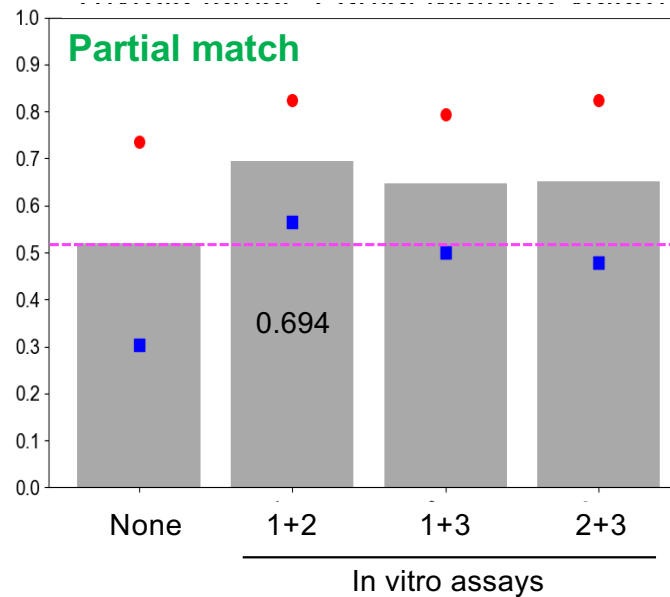
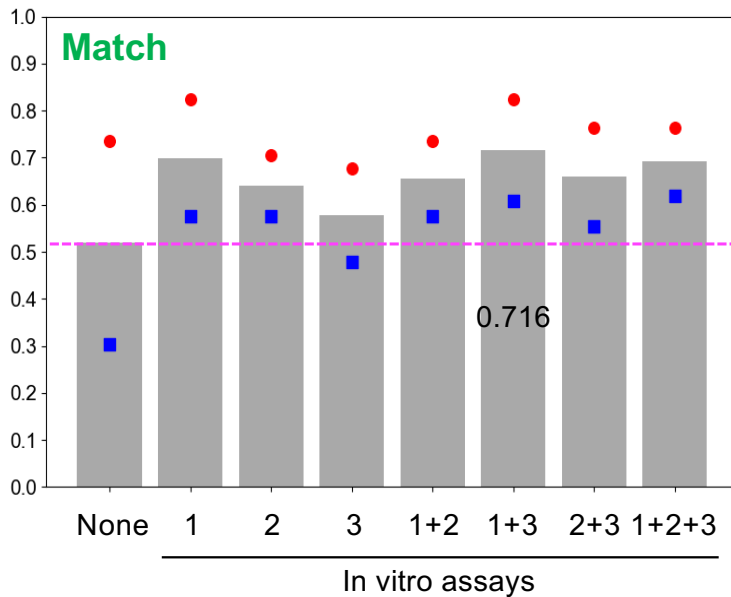
甲状腺がん

- **AOP162:** Enhanced hepatic clearance of thyroid hormones leading to thyroid follicular cell adenomas and carcinomas in the rat and mouse

肝がん

- **AOP 37:** PPAR α activation leading to hepatocellular adenomas and carcinomas in rodents
- **AOP 41:** Sustained AhR activation leading to rodent liver tumours
- **AOP 107:** Constitutive androstane receptor activation leading to hepatocellular adenomas and carcinomas in the mouse and the rat

結果：甲状腺がん（陽性率 34/126 : 27.0%）



Fisherの正確確率検定p値

	Thyroid
AHR activation	0.772
PXR activation	0.007
PPARα activation	1.000
Cyp2b1 mRNA (>2.5)	0.122
Cyp2b1 mRNA (>10)	0.002
Cyp1a1 mRNA	0.513
Cyp3a1 mRNA	0.002
Cyp4a1 mRNA	0.041

Assays used

1. **Cyp2b1 mRNA (>10)**
2. **Cyp3a1 mRNA (>2.5)**
3. **PXR activation**

Matchでは用いた全ての試験で一致した物質を、**Partial match**では、いずれかの試験で一致した物質を最終ソース物質とした。

- インビトロ試験結果を用いて最終ソース物質を選択することで、感度と特異度が共に向上した。
- その効果は特にCyp2b1 mRNAデータを用いたときに強く認められた。
- PXR活性化作用またはCyp3a1 mRNAとの組み合わせにより、若干の精度向上が認められた。異なる機序による酵素誘導評価が効果的であった可能性がある。
- いずれの条件においても感度が高く、特異度は低かった。



結果：肝がん

解析対象のがんと関連AOP



鼻腔がん、胃がん、膀胱がん

- **AOP 115:** Epithelial cytotoxicity leading to forestomach tumors (in mouse and rat)
- **AOP 136:** Intracellular acidification induced olfactory epithelial injury leading to site of contact nasal tumors
- **AOP 121:** Urinary bladder calculi leading to urothelial papillomas and carcinomas (in mouse and rat)

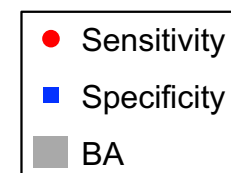
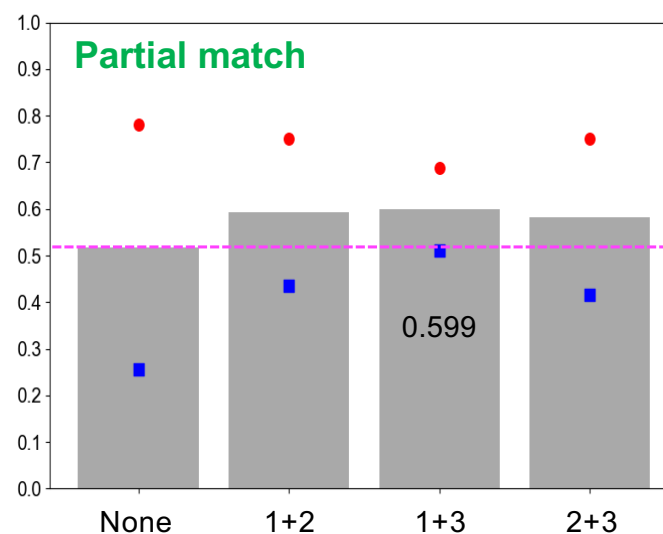
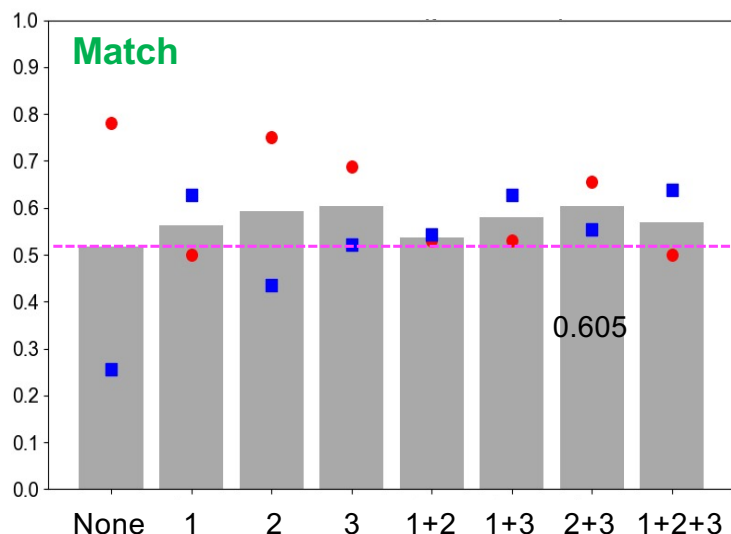
甲状腺がん

- **AOP162:** Enhanced hepatic clearance of thyroid hormones leading to thyroid follicular cell adenomas and carcinomas in the rat and mouse

肝がん

- **AOP 37:** PPAR α activation leading to hepatocellular adenomas and carcinomas in rodents
- **AOP 41:** Sustained AhR activation leading to rodent liver tumours
- **AOP 107:** Constitutive androstane receptor activation leading to hepatocellular adenomas and carcinomas in the mouse and the rat

結果：肝がん（陽性率 32/126 : 25.4%）



Fisherの正確確率検定p値

	Liver
AHR activation	1.000
PXR activation	0.683
PPARα activation	1.000
RXRα activation	0.112
<i>Cyp2b1</i> mRNA (>2.5)	0.023
<i>Cyp2b1</i> mRNA (>10)	0.839
<i>Cyp2b1/Cyp3a1</i> ratio (>2.5)	0.038
<i>Cyp2b1/Cyp4a1</i> ratio (>2.5)	0.132
<i>Cyp2b1/Cyp4a1</i> ratio (>40)	0.018
<i>Cyp1a1</i> mRNA	0.656
<i>Cyp3a1</i> mRNA	0.839
<i>Cyp4a1</i> mRNA	0.776

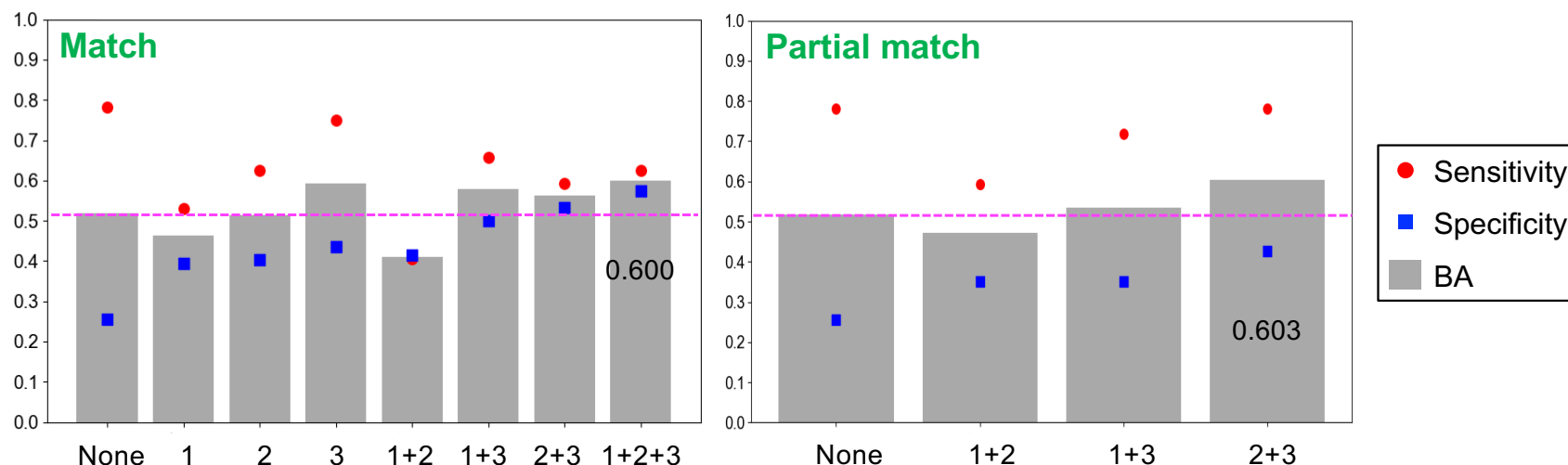
Assays used

1. *Cyp2b1* mRNA (>2.5)
2. *Cyp2b1/Cyp3a1* ratio (>2.5)
3. *Cyp2b1/Cyp4a1* ratio (>40)

Matchでは用いた全ての試験で一致した物質を、**Partial match**では、いずれかの試験で一致した物質を最終ソース物質とした。

- 構造情報のみを利用した場合の感度が0.8程度と高かった。特定の構造グループが多い農薬データセットの特徴によると考えられる。
- インビトロ試験結果によるソース物質の選択は、予測精度を向上したが、効果は限定的であった。肝発がん機序は多様であるが、*Cyp2b1*（CAR活性化の指標）関連の指標のみを使用したことによる可能性がある。
- 感度はいずれの条件でも低下したが、特異度は大きく上昇した。機序関連試験の実施により、発がん物質と構造が類似した非発がん物質を正しく判定できたことによると考えられる。

結果：肝がん（陽性率 32/126 : 25.4%） # 2



Assays used

1. GSH assay
2. ERα agonist
3. Cyp2b1 mRNA (>2.5)

Matchでは用いた全ての試験で一致した物質を、**Partial match**では、いずれかの試験で一致した物質を最終ソース物質とした。

- 肝がんを目的変数、各試験結果を説明変数とするランダムフォレスト予測モデルを作成し、寄与率の高い3変数を選択して解析した。
- 予測精度向上の程度は、Cyp2b1 mRNAレベルのデータのみを使用した場合と同定度であった。
- ただし、複数の異なる機序の変数の組み合わせは特異度の向上に繋がることが示された。

Fisherの正確確率検定p値

	Liver
LDH assay	1.000
CellTiter assay	1.000
GSH assay	1.000
AHR activation	1.000
PXR activation	0.683
PPARα activation	1.000
RXRα activation	0.112
ERα (agonist)	0.655
ERβ (agonist)	NA
AR (agonist)	0.692
PR (agonist)	1.000
ERα (antagonist)	0.589
ERβ (antagonist)	0.606
AR (antagonist)	0.278
PR (antagonist)	0.674
Cyp2b1 mRNA (>2.5)	0.023
Cyp2b1 mRNA (>10)	0.839
Cyp2b1/Cyp3a1 ratio (>2.5)	0.038
Cyp2b1/Cyp4a1 ratio (>2.5)	0.132
Cyp2b1/Cyp4a1 ratio (>40)	0.018
Cyp1a1 mRNA	0.656
Cyp3a1 mRNA	0.839
Cyp4a1 mRNA	0.776
CYP1A1 inhibition	0.518
CYP1A2 inhibition	0.655
CYP2B1 inhibition	0.688
CYP2C6 inhibition	0.300
CYP2D1 inhibition	0.779
CYP3A2 inhibition	0.838



- 農薬の発がん性試験情報をもとに被験物質を選定し、化学構造情報と発がん機序関連試験結果を利用したリードアクロス手法の確立を目指した。
- 上皮細胞傷害と関連する鼻腔がん、胃がん、膀胱がんでは、AOPと関連する比較的単純な細胞毒性試験の結果が予測精度の大幅な上昇に繋がった。発がん性と関連する分子記述子の選択も精度向上に有用であった。（論文投稿中）
- 甲状腺がんでは、AOPから予想された通り、酵素誘導関連試験結果を利用することで、予測精度が向上した。甲状腺ホルモン合成阻害など、他の機序試験の活用によりさらなる精度向上が期待される。
- 肝がんでは、農薬の主要な肝発がん機序であるCAR活性化と関連する試験（CYP2B1誘導）結果を利用することで予測精度が向上した。これは、特異度の向上に起因しており、機序情報を利用することで発がん物質と構造が類似する非発がん物質を正しく判定できたためと考えられる。他方、精度向上には改善の余地が認められたため、統計学的には有意ではなかったが、AOPが確立されているAHRやPPARαのデータも活用した検討も必要と考えられる。

本日の内容



- 研究背景・目的
- リードアクロスによる発がん性予測：結果と考察
- 終わりに

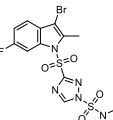
肝発がん性物質の判定結果

True positive False negative

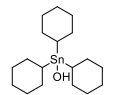
ID	評価書対象農薬	None	Single					Match															Partial match										TP率
			CFR101CFR101-2-01	CFR101CFR101-2-02	CFR101CFR101-2-03	CFR101CFR101-2-04	CFR101CFR101-2-05	CFR101CFR101-2-06	CFR101CFR101-2-07	CFR101CFR101-2-08	CFR101CFR101-2-09	CFR101CFR101-2-10	CFR101CFR101-2-11	CFR101CFR101-2-12	CFR101CFR101-2-13	CFR101CFR101-2-14	CFR101CFR101-2-15	CFR101CFR101-2-16	CFR101CFR101-2-17	CFR101CFR101-2-18	CFR101CFR101-2-19	CFR101CFR101-2-20	CFR101CFR101-2-21	CFR101CFR101-2-22	CFR101CFR101-2-23	CFR101CFR101-2-24	CFR101CFR101-2-25	CFR101CFR101-2-26	CFR101CFR101-2-27	CFR101CFR101-2-28	CFR101CFR101-2-29	CFR101CFR101-2-30	
P020	アセトクロール																																66%
P038	イソキサフルトール																																81%
P040	イソピラザム																																91%
P072	オキサジアゾン																																66%
P074	オキサジクロメホン																																84%
P087	カルバリル																																100%
P092	キザロホップPテフリル																																50%
P102	クレソキシムメチル																																41%
P128	シクラニリド																																47%
P135	ジクロベニル																																34%
P162	スルホキサフル																																25%
P187	テブフェンピラド																																47%
P189	テブラロキシジム																																34%
P223	ビメトロジン																																41%
P226	ピラジフルミド																																100%
P241	ピリミノバックメチル																																97%
P271	フルアクリピリム																																63%
P278	フルオピラム																																97%
P280	フルキサピロキサド																																100%
P290	フルピリミン																																97%
P309	プロピザミド																																88%
P337	ベンチアバリカルブイソプロピル																																100%
P342	ベンフルラリン																																44%
P370	メトミノストロビン																																100%
P371	メトラクロール																																97%
P001	1,3-ジクロロプロペン																																0%
P025	アミスルプロム																																0%
P031	アメトリン																																16%
P149	シヘキサチン																																0%
P151	シメコナゾール																																72%
P355	メタアルデヒド																																3%
P373	メバニピリム																																78%



P001



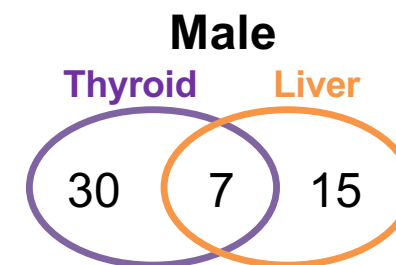
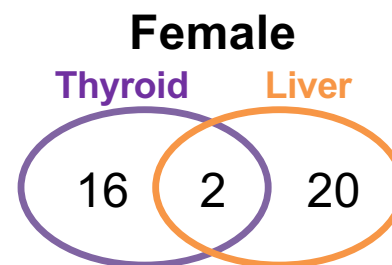
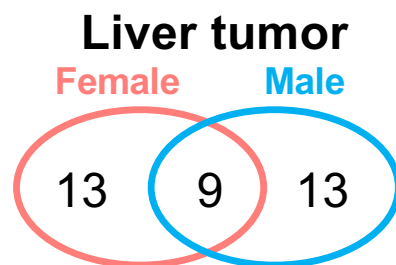
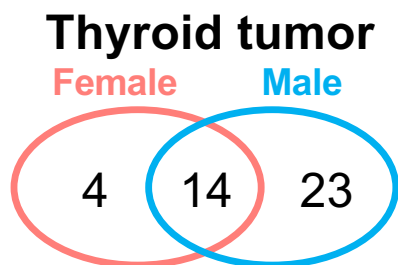
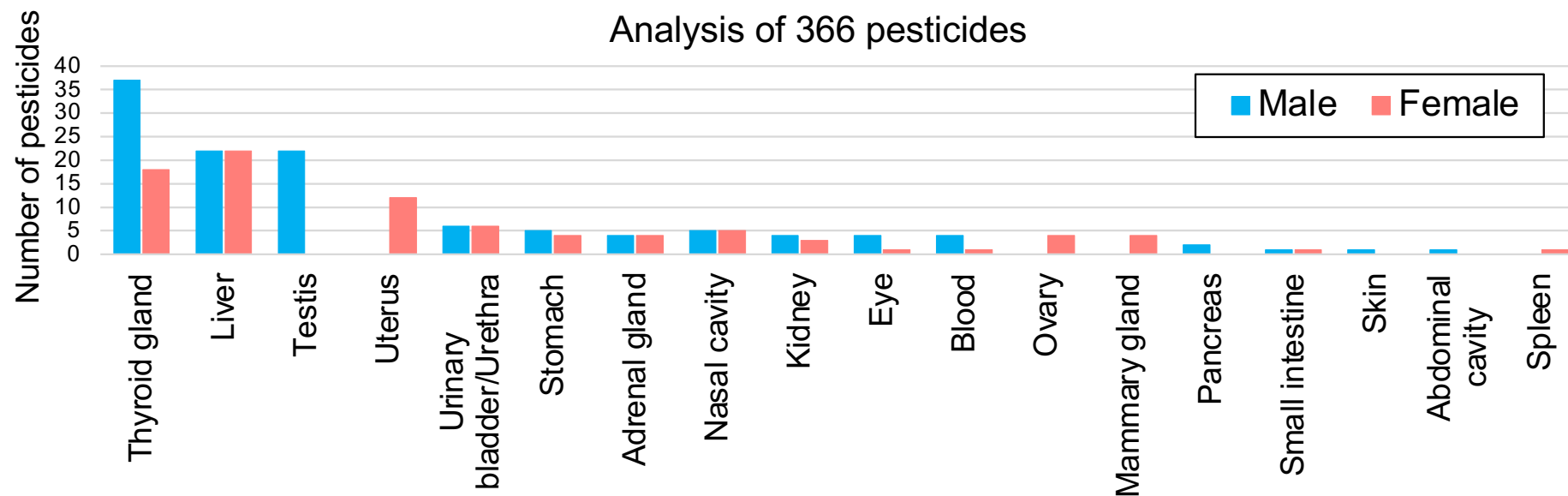
P025



P149

- P001、P025、P149は、いかなる条件においても正しく判定できなかった。
- これらの構造的類似物質（一次ソース物質）は、0（P001）または1であった。
- エンドポイントの種類によっては化学構造に基づく選択を実施すべきではない可能性がある。

毒性試験データを活用した予測における課題：性差



- 肝がん、甲状腺がんの発がん性には大きな性差が認められる。
- 機序（AOP）では性差は小さいと考えられ、代謝・体内動態の性差が示唆される。
- このような毒性試験結果をどのように毒性予測モデル開発に適用するか？



- 本研究により、リードアクロスによる非遺伝毒性発がん性の予測には、
 - ✓ 発がん性に関連する分子記述子の選択が有用であること
 - ✓ 発がん機序関連インビトロ試験の試験結果を利用したソース物質の選択が有用であること
 - ✓ 発がん機序をできる限り網羅する複数試験の利用が重要であることが示唆された。

- 一方、発がん機序が完全に明確になっていない肝がんなどでは、機序を網羅した試験の実施は困難であるため、リードアクロス手法の開発と並行して、機序解明研究やAOPの構築が必要であると思われる。

謝辞



静岡県立大学薬学部

水野航介

阿部湧介

原川ゆう

内田奈那

芝田南美

佐藤清美

佐々木崇光

菅野裕一郎

志津怜太

保坂卓臣

大岡 央

中山知恵

衛生分子毒性学分野

研究室メンバー

産業技術総合研究所

竹下潤一

東京理科大学

鈴木知道

研究費

内閣府食品安全委員会

ご清聴ありがとうございました。