

令和4～5年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

研究課題名 (研究項目名)	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 (課題番号：JPCAFSC20222206) (2 健康影響発現メカニズムの解明(2) 食品中の化学物質のリスク評価の精緻化に関する研究)
主任研究者	研究者名：吉成 浩一 所属機関：静岡県立大学 薬学部

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

令和4年度～令和5年度（2年間）

2 研究目的

発がん性試験の代替法の開発が望まれているが、非遺伝毒性発がん機序が複雑なこともあり、有用な手法はない。そこで本研究では、食品中化学物質のリスク評価への活用を最終的な目標として、機序情報を利用したリードアクロスによる非遺伝毒性発がん性の評価手法の開発を試みる。具体的には、農薬評価書を活用して被験物質を選定し、肝がんと CAR や PPAR α 等の核内受容体活性化、甲状腺がんと代謝酵素誘導、生殖器がんとホルモン受容体やホルモン代謝酵素への作用、発がんプロモーションと細胞傷害など、発がんへの寄与が知られている細胞内イベントに対して、発がん性・非発がん性物質の影響をインビトロ試験で評価する。そして、それらの実験結果と化学構造情報を用いて化学物質の類似性を評価し、非遺伝毒性発がん性の評価に有効なパラメータの選定を行うことで、リードアクロス手法の確立を目指す。また、これらインビトロ試験の実施により、発がん性物質の機序情報が得られることから、それらを活用して、発がん性物質の機序推定、リスク評価に資する試験を選択し、リスク評価スキームの提示を目指す。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
発がん機序に関連するインビトロ試験の実施	(1) 農薬の発がん性データセットの構築	吉成浩一（静岡県立大学） 竹下潤一（産業技術総合研究所）
	(2) インビトロ試験の実施	吉成浩一（静岡県立大学）
発がん性評価のためのリードアクロス手法の開発	(1) 農薬の化学構造情報データベースの構築	吉成浩一（静岡県立大学） 竹下潤一（産業技術総合研究所）
	(2) 物質間距離計算方法の確立	竹下潤一（産業技術総合研究所）
	(3) リードアクロスの実施と検証	吉成浩一（静岡県立大学） 竹下潤一（産業技術総合研究所）
発がん性リスク評価及び機序推定に有用な試験の提案	(個別課題名なし)	吉成浩一（静岡県立大学） 竹下潤一（産業技術総合研究所）

4 倫理面への配慮について

インビトロ試験等で必要となる遺伝子組換え実験に関しては、一部は既に静岡県立大学遺伝子組換え実験安全委員会へ申請し、承認を受けている。追加の実験が必要になった場合には同様の手続きにより承認を受けた後に実施する。

その他に人権の保護及び法令等の遵守への対応が必要な研究内容はない。

本申請研究では、臨床研究や臨床検体の使用、患者アンケート等を計画していない。したがって人権の保護、個人情報取扱に関する配慮を必要とする研究内容に該当しない。

II 研究内容及び成果等

1 研究項目：発がん機序に関連するインビトロ試験の実施

(1) 個別課題：農薬の発がん性データセットの構築（吉成浩一（静岡県立大学）、竹下潤一（産業技術総合研究所））

食品安全委員会にて公開されている農薬評価書の情報を収集し、化学構造が特定できる農薬の2年間ラット発がん性試験及び慢性毒性/発がん性併合試験の結果を整理した。その結果、雄で369農薬、雌で368農薬の情報が得られた。表1に発がん性を示した農薬の数を示した。本研究では、発症頻度が高く、比較的発現機序情報が得られる9臓器・組織のがん、すなわち肝がん、甲状腺がん、精巣がん、子宮がん、卵巣がん、乳がん、鼻腔がん、胃がん、膀胱・尿道がん、を解析対象とした。なお、本研究では解析及び表記の都合上、悪性・良性の全ての腫瘍を「がん」とした。

これらのデータに基づき、雌雄いずれかにおいて上記9種のがんのいずれかを発症した農薬のうち、市販品が購入可能であった80農薬を本研究の「発がん性陽性物質」とした。他方、2年間試験において上記9種の臓器・組織にいずれの濃度でも発がん関連所見を認めず、市販品を購入可能であった46物質を選択し、本試験の「発がん性陰性物質」とした。

これら126農薬の名称と、各種がんの発症の有無（陽性・陰性）を表2に示した。126農薬の陽性率は、全がんで63.5%、肝がんで25.4%、甲状腺がんで27.0%、精巣がんで10.3%、子宮がんで6.3%、卵巣がんで1.6%、乳がんで1.6%、鼻腔がんで4.0%、胃がんで4.8%、膀胱・尿道がんで5.6%であった。

表1 発がん性を示した農薬数

臓器・組織	肝臓	鼻腔	胃	小腸	膵臓	腎臓	膀胱・尿道	精巣	子宮	卵巣	副腎	眼	皮膚	乳腺	甲状腺	血液	腹腔	脾臓
雄	22	5	5	1	2	4	6	22	-	-	4	4	1	0	37	4	1	0
雌	22	5	4	1	0	3	6	-	12	4	4	1	0	4	18	1	0	1
合計	35	5	6	1	2	5	7	22	12	4	6	4	1	4	41	4	1	1

解析対象のがんをグレーで示した。

P167	ダイムロン	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P169	チアクロブリド	P	N	P	N	P	N	N	N	N	N
P171	チアゾピル	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N
P174	チオシクラムシュウ酸水素塩	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P177	チフェンスルフロンメチル	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P183	テトラジホン	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P187	テブフェンピラド	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
P189	テプラロキシジム	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
P194	トリアゾホス	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P197	トリネキサパックエチル	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P198	トリブホス	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P205	トリルフルアニド	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N
P209	ニテンピラム	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P214	ハロスルフロンメチル	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P215	ピカルブトラゾクス	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N
P221	ピフェントリン	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P223	ピメトロジン	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
P226	ピラジフルミド	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N
P228	ピラゾスルフロンエチル	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P231	ピリダベン	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P234	ピリプチカルブ	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N
P235	ピリフルキナゾン	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N
P239	ピリミジフェン	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P241	ピリミノバックメチル	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N
P242	ピリメタニル	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N
P246	フィブロニル	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N
P253	フェリムゾン	P	N	N	N	N	N	N	P	N	N
P256	フェンチオン	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P258	フェントラザミド	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P
P263	フェンブコナゾール	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N
P266	ブタクロール	P	N	P	N	N	N	N	P	P	N
P271	フルアクリピリム	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
P272	フルアジナム	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N
P278	フルオピラム	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
P280	フルキサピロキサド	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N
P283	フルシラゾール	P	N	N	P	N	N	N	N	N	P
P284	フルセトスルフロン	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N
P290	フルピリミン	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N
P296	フルメツラム	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P304	プロバクロール	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N
P305	プロパニル	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N
P307	プロバルギット	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P309	プロビザミド	P	P	P	P	N	N	N	N	N	N
P313	プロフェノホス	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P316	プロポキシカルバゾンナトリウム塩	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P322	ヘキサコナゾール	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N
P323	ヘキサジノン	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P325	ベノキサコール	P	N	N	N	N	N	N	N	P	N
P337	ベンチアバリカルブイソプロピル	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N
P338	ベンチオピラド	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N
P339	ペンディメタリン	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N
P340	ペントキサゾン	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P
P342	ペンフルラリン	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N
P343	ペンフレセート	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P344	ホサロン	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P345	ボスカリド	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N
P347	ホセチル	P	N	N	N	N	N	N	N	N	P
P354	メソトリオン	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N
P355	メタアルデヒド	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
P356	メタゾスルフロン	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N
P359	メタミドホス	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
P370	メトミノストロピン	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
P371	メトラクロール	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N
P373	メパニピリム	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N

P377	メフェンピルジエチル	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	陽性農薬数	80	32	34	13	8	2	2	5	6	7
	陽性率	63.5%	25.4%	27.0%	10.3%	6.3%	1.6%	1.6%	4.0%	4.8%	5.6%

P：陽性、N：陰性

(2) 個別課題：インビトロ試験の実施（吉成浩一（静岡県立大学））

試験溶液の調製

選定した 126 農薬について、30 mM の dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶液を調製した。溶解性の問題で 30 mM DMSO 溶液が調製できなかった農薬については、溶媒や調製濃度を変更し、30 mM イソプロパノール溶液（1 物質）、30 mM 水溶液（3 物質）、30 mM エタノール溶液（1 物質）、10 mM メタノール溶液（1 物質）を調製した。使用まで -20°C で保管した。

細胞傷害性試験

被験物質の一般的な細胞毒性を把握すると共に、細胞傷害性と発がん性との関連性を明らかにするために、市販のキットを利用して、126 被験物質の細胞傷害性を培地中 LDH 活性及び細胞内 ATP 含量を指標として測定した。また、被験物質のタンパク質反応性や酸化ストレス増強作用の指標として細胞内還元型グルタチオン (GSH) レベルを測定した。

細胞毒性試験で汎用されるヒト肝がん由来 HepG2 細胞（理研バイオリソースセンター）を、3 濃度（0.3、3.0、30 μ M）の被験物質で 48 時間処置し、上清を回収して CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay キット（Promega）を利用して LDH 活性を測定した。培地を回収した残りの細胞をサンプルとして、CellTiter-Glo 2.0 Assay キット（Promega）を利用して、ATP 含量を測定することで溶媒処置群に対する相対的な生細胞数を測定した。細胞傷害により LDH 活性は上昇し、ATP 含量は低下する。これらのアッセイとは別プレートとして HepG2 細胞を播種し、3 濃度（0.3、3.0、30 μ M）の被験物質で 24 時間処置した後に GSH-Glo Glutathione Assay キット（Promega）を利用して細胞内 GSH レベルを測定した。いずれのアッセイにおいても溶媒対照群の値を 1 とした相対値を算出した。結果の概要を表 3 及び図 1 に示した。

陽性・陰性判定においては、LDH アッセイでは 3 濃度のいずれかで 1.2 を超えた農薬、CellTiter アッセイでは 3 濃度のいずれかで 0.95 より小さな値を示した農薬を陽性とした。

細胞傷害性・反応性物質の曝露により細胞内 GSH は消費されて、そのレベルが低下する一方で、それら反応性物質の曝露に伴い GSH 合成が活性化され、GSH レベルは代償的に上昇する。そのため、細胞内 GSH レベルの評価においては、増減の両方向の基準が必要となる。そこで、陽性・陰性の判定では、溶媒対照群の値を 1 とした相対値で、3 濃度のいずれかで 0.9 より小さな値又は 1.1 より大きな値を示した農薬を陽性と判定した。

異物応答性核内受容体活性化作用評価

芳香族炭化水素受容体 (AHR) は、ダイオキシンの受容体として知られ、発がんプロモーション作用を含むダイオキシンの毒性発現に必須な受容体型転写因子である。内因性の AHR を発現するラット肝癌由来 H4IIE 細胞に、AHR 応答配列と TK プロモーターの下流に Firefly ルシフェラーゼ遺伝子を含むレポータープラスミド 3x(XRE)-TK-pGL4.10 並びにコントロールとして TK プロモーターの下流に Renilla ルシフェラーゼ遺伝子を含む pGL4.74[hRluc/TK]を、リバーストランスフェクション法により播種と同時にトランスフェクションした。その 24 時間後から溶媒又は被験物質（3.0、10、30 μ M の

3濃度)で細胞を24時間処置し、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega)を利用して両ルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクション効率補正用の *Renilla* ルシフェラーゼの値が溶媒群の40%未満となった場合は、強い細胞毒性が認められたとして解析から除外した。その結果、6物質において全ての濃度で細胞毒性が認められ、AHR活性化作用を評価できたのは120物質となった。このうち、3濃度のいずれかで溶媒対照群に対する相対活性が1.7を超えた農薬を陽性と判定した。

核内受容体 PXR は薬物代謝酵素誘導に中心的に働く核内受容体であり、薬物代謝酵素誘導は甲状腺ホルモンの代謝亢進と甲状腺刺激ホルモンの分泌促進を介して甲状腺がんの発症との関連が知られている。そこで、被験物質の PXR 活性化作用を評価した。評価には哺乳細胞ワンハイブリッドシステムを利用し、ラット PXR のリガンド結合ドメイン (LBD) と GAL4 タンパク質の DNA 結合ドメイン (DBD) の融合タンパク質並びに補正用 *Renilla* ルシフェラーゼを発現するプラスミド、GAL4-DBD 応答配列の制御下にあるレポーター遺伝子を発現するプラスミドを、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞に同時にトランスフェクションした。被験物質処置、レポーター活性の測定、細胞毒性の判定等は AHR の評価と同様に行った。その結果、1物質では全濃度で細胞毒性が認められ、PXR 活性化作用を評価できたのは125物質となった。3濃度のいずれかで溶媒対照群に対する相対活性が1.7を超えた農薬を陽性と判定した。

核内受容体 PPAR α は、ペルオキシゾーム増殖薬などにより活性化され、その活性化は齧歯動物における肝発がんと密接に関連することが知られている。そこで、被験物質の PPAR α 活性化作用を評価した。ラット PPAR α の LBD を利用した以外については PXR 評価と同様に行った。その結果、1物質では全濃度で細胞毒性が認められ、PPAR α 活性化作用を評価できたのは125物質となった。3濃度のいずれかで溶媒対照群に対する相対活性が1.5を超えた農薬を陽性と判定した。

核内受容体 RXR α は、PXR や PPAR α 、CAR とヘテロ二量体を形成してそれらの機能を制御する。化学発がんとの直接的な関連性は知られていないが、他の発がん関連核内受容体機能への影響を考慮して、哺乳細胞ワンハイブリッドアッセイにより RXR α に対する被験物質の作用を評価した。ラット RXR α の LBD と GAL4-DBD 融合タンパク質を発現するプラスミド、GAL4-DBD 応答配列の制御下にあるレポーター遺伝子を発現するプラスミド、ならびに補正用 *Renilla* ルシフェラーゼを発現するプラスミドを HepG2 細胞に同時にトランスフェクションした。その後の操作は PXR と同様に行った。3濃度のいずれかで溶媒対照群に対する相対活性が1.8を超えた農薬を陽性と判定した。

結果の概要を表3及び図1に示した。

ホルモン関連核内受容体の活性化及び抑制作用

各種性ホルモン受容体に対する作用を評価するために、エストロゲン受容体 (ER α 及び ER β)、プロゲステロン受容体 (PR) 又はアンドロゲン受容体 (AR) と、その応答配列制御下にあるルシフェラーゼ遺伝子を安定的に発現する HEK293 細胞を樹立し、以下の通り、被験物質の受容体活性化作用 (アゴニスト活性) 及び受容体抑制作用 (アンタゴニスト作用) を評価した。

アゴニスト活性の評価では、ER α 評価用安定発現細胞 HEK293/ERE/ER α (5.0×10^4 cells/100 μ L/well)、ER β 評価用安定発現細胞 HEK293/ERE/ER β (5.0×10^4 cells/100 μ L/well)、AR 評価用安定発現細胞 HEK293/MMTV/AR (2.5×10^4 cells/100 μ L/well) 又は PR 評価用安定発現細胞 HEK293/MMTV/PR (2.5×10^4 cells/100 μ L/well) を96ウェルプレートに播種して24時間培養後、被験物質を3、10又は30 μ Mの濃度で24時間曝露した。培地を除去後、1×Glo Lysis Buffer (Promega) で細胞を溶解し、Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega) を利用してレポーター活性を測定した。アンタゴニスト活性の評価では、上記と同様に細胞を播種し、アゴニスト (ER α 及び ER β : 1 nM エストラジオール、AR : 0.03

nM ジヒドロテストステロン、PR : 0.3 nM プログステロン) 存在下で被験物質を添加し、レポーター活性の低下を評価した。

これらのアッセイを行った際の培養上清を回収し、LDH 活性を測定した。被験物質処置により LDH 活性の相対値が 1.25 を超えた場合、細胞毒性が認められたと判断し、アンタゴニスト活性の値はデータ無しとした。4つの受容体に共通して2物質がいずれの濃度においても細胞毒性のためにデータなしとなったため、これら受容体に対するアンタゴニスト活性については124物質のデータを解析に用いた。結果の概要を表3及び図1に示した。

陽性・陰性の判定には3濃度の誘導倍率のうちの最大値（アゴニスト活性）又は最小値（アンタゴニスト活性）を用い、アゴニスト活性評価では、ER α では2.0倍、ER β では2.5倍、AR及びPRでは1.5倍、アンタゴニスト活性評価では、全ての受容体で0.5倍に閾値を設定した。なお、ER β のアゴニスト活性評価では全被験物質が陰性と判定された。

ラット肝細胞における酵素誘導試験

核内受容体 CAR は、代表的な肝発がんプロモーターであるフェノバルビタールによる発がんの責任タンパク質であり、農薬による肝発がんにおいても重要な役割を果たすと考えられる。また、CAR は肝臓の薬物代謝酵素の誘導にも関与し、CAR 活性化と、甲状腺ホルモンの代謝亢進に伴う甲状腺濾胞細胞の過形成並びに甲状腺がんとの関連も示唆されている。そのため、CAR 活性化作用の評価は、肝がんや甲状腺がんの評価に有用であると考えられるが、受容体の特性上レポーターアッセイでの評価が困難である。吉成らは、CAR が P450 誘導に中心的に働くことを考慮し、ラット肝細胞における P450 誘導、特に CYP2B1 の発現誘導の評価が化学物質の CAR 活性化作用の評価に有用であることを報告している (Sato, *Food Chem Toxicol*, 2022)。そこで本研究でもその評価系を利用した。

雄性 SD ラット由来凍結肝細胞 (Biopredic International, Lot #HEP134050-TA02) を 96 ウェルプレートに 3×10^4 cells/100 μ L/well で播種し、24 時間培養したのち被験物質 (3、10、30 μ M) を 24 時間曝露した。その後、SuperPrep II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO) を利用して cDNA を合成した。次に、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO) 及び PrimeTime qPCR probe (Integrated DNA Technologies) を用いてリアルタイム PCR を行い、標的遺伝子 (*Cyp1a1*、*Cyp2b1*、*Cyp3a1*、*Cyp4a1*) 及び補正用遺伝子 (*Hprt1*) の mRNA レベルを測定した。各標的遺伝子の mRNA レベルは *Hprt1* の mRNA レベルで補正し、溶媒対照群の値に対する相対値で示した。なお、*Cyp2b1* は CAR に加えて PXR や PPAR α による制御も受けることから、*Cyp2b1* mRNA レベルを *Cyp3a1* (PXR の主要標的遺伝子) や *Cyp4a1* (PPAR α の主要標的遺伝子) の mRNA レベルで除した値も算出した。結果の概要を表3及び図1に示した。

陽性・陰性の判定は、2.5 倍を基本的な閾値とし、*Cyp1a1*、*Cyp2b1* 及び *Cyp3a1* では誘導倍率が大きかったことから、10 倍や 40 倍の閾値も設けた。なお、判定には3濃度の誘導倍率のうちの最大値を用いた。

ラット P450 阻害試験

化学物質の中には、親化合物ではなく代謝物が薬効や毒性を発現するものも多い。また、私達の研究室では、CYP1A1 や CYP1B1 の阻害が、内因性 AHR アゴニストのクリアランスを阻害し、間接的に AHR を活性化することを報告している (Yoda, *J Toxicol Sci*, 2022)。そこで本研究では、6種のラット P450 分子種 (CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2C6、CYP2D1、CYP3A2) に対する被験物質の阻害作用を、組換え P450 酵素 (Corning) と発光基質 (Promega) を利用して評価した。実験は当研究

室の既報 (Watanabe, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020、Shimizu, *J Toxicol Sci*, 2021) に基づいて実施した。被験物質の濃度は 0.1、1.0 及び 10 μM とし、溶媒対象に対する残存活性 (%) を 100 から引いた値を阻害活性 (%) とし、0%以下又は 100%以上の値はそれぞれ 0%及び 100%とした。結果の概要を表 3 及び図 1 に示した。

陽性・陰性の判定は、3 濃度の阻害活性のうちの最大値が 15%以上の場合を陽性、それ未満を陰性として行った。

表 3 インビトロ試験結果の主要統計量

Assay ID	Assay	<i>n</i>	Mean	SD	Max.	Median	Min.
1	LDH assay	126	1.98	2.51	18.57	1.18	0.96
2	CellTiter assay	126	0.87	0.24	1.07	0.97	0.00
3	GSH assay	126	0.22	0.32	2.11	0.12	0.01
4	AHR activation	120	1.55	2.04	22.73	1.18	0.65
5	PXR activation	125	6.60	8.95	54.63	2.57	0.63
6	PPAR α activation	125	1.23	0.72	7.70	1.11	0.21
7	RXR α activation	126	1.58	2.94	26.07	1.10	0.77
8	ER α (agonist)	126	2.35	2.60	16.69	1.44	0.00
9	ER β (agonist)	126	1.22	0.37	2.10	1.26	0.00
10	AR (agonist)	126	1.05	0.41	3.50	1.01	-0.01
11	PR (agonist)	126	1.07	0.65	6.84	0.99	-0.01
12	ER α (antagonist)	124	0.83	0.31	1.53	0.93	0.01
13	ER β (antagonist)	124	0.80	0.30	1.64	0.83	0.02
14	AR (antagonist)	124	0.64	0.34	1.54	0.68	0.01
15	PR (antagonist)	124	0.42	0.37	1.37	0.32	0.01
16	<i>Cyp2b1</i> mRNA	126	72	134	809	14.8	0.73
17	<i>Cyp2b1/Cyp3a1</i> mRNA ratio	126	12	19	124	3.25	0.07
18	<i>Cyp2b1/Cyp4a1</i> mRNA ratio	126	86	151	792	6.83	0.57
19	<i>Cyp2b1/Cyp3a1/Cyp4a1</i> mRNA ratio	126	17	36	233	2.70	0.11
20	<i>Cyp1a1</i> mRNA	126	3.8	5.4	26.8	1.9	0.6
21	<i>Cyp3a1</i> mRNA	126	14.5	23.8	121.5	2.9	0.7
22	<i>Cyp4a1</i> mRNA	126	2.6	8.3	81.0	1.1	0.5
23	CYP1A1 inhibition	126	35.9	29.9	98.4	26.9	0.4
24	CYP1A2 inhibition	126	18.4	24.4	98.0	7.5	0.0
25	CYP2B1 inhibition	126	28.2	30.5	99.8	12.9	0.0
26	CYP2C6 inhibition	126	35.1	30.9	99.5	27.6	0.0
27	CYP2D1 inhibition	126	9.2	14.6	88.5	4.5	0.0
28	CYP3A2 inhibition	126	30.5	27.5	94.3	23.7	0.0

アッセイ 1、4~11、16~28 は 3 濃度のうち最大値、アッセイ 2、12~15 では 3 濃度のうち最低値、アッセイ 3 では 3 濃度における変化量の絶対値の合計値を使用した。核内受容体関連試験 (アッセイ 4~15) では、細胞毒性で「データ無し」となった物質が存在したため、*n*数は 126 となっていない。SD : 標準偏差

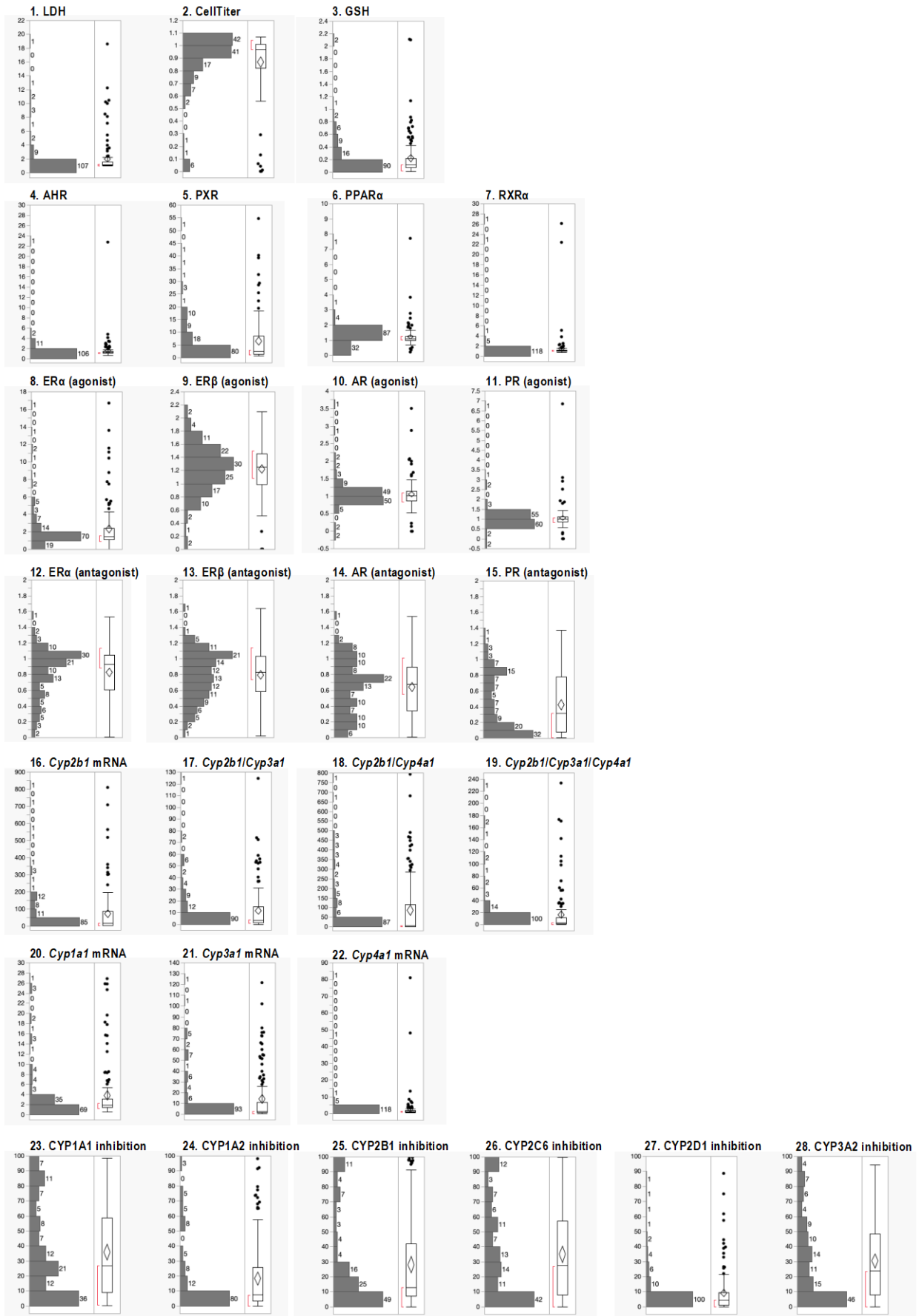


図1 インビトロ試験結果の分布
各インビトロ試験の結果をヒストグラムで示した。

発がん性とインビトロ試験結果の関連性解析

実施した各試験結果と発がん性との関連性を統計学的手法により明らかにするために、各試験結果に閾値を設定して陽性又は陰性の2値として、Fisherの正確確率検定を行った(表4)。また、各がんの有無で被験物質を2群に分けた際の試験結果(測定値)の差についてWilcoxonの順位和検定を行った(表5)。なお、 $P < 0.05$ の場合有意差ありとみなした。

これまでの機序情報から予期されたように、肝がんと *Cyp2b1* mRNA レベルの増加(CAR活性化の指標)、甲状腺がんと PXR 活性化(酵素誘導の指標)、甲状腺がんと *Cyp2b1* mRNA レベル、*Cyp3a1* mRNA レベル及び *Cyp4a1* mRNA レベルの増加、鼻腔がん・胃がんと細胞傷害性試験(LDHアッセイ、GSHアッセイ)などに有意な関連性が認められ、設定したインビトロ試験の妥当性が示された。一方で、ホルモン関連受容体と生殖器関連がんの間には明確な関連性が認められなかった。この原因として、卵巣がんや乳がんでは陽性物質数が少なかったこと(いずれも2物質)などが考えられた。

さらに、精巣がんと AHR 活性化や CYP1A1 阻害、子宮がんと CYP2B1 誘導、鼻腔がん・胃がんと ER α 抑制作用など、予期せぬ関係性も認められた。これらに関しては、今後の発がん機序解明研究に有用な情報となると考えられる。

研究項目2におけるリードアクロス研究では、過去の機序情報と統計的解析の結果が一致していた、肝がん、甲状腺がん、鼻腔がん、胃がん、並びに鼻腔がんや胃がんと同様に上皮細胞傷害が原因として知られている膀胱・尿道がんの5種のがんを対象とした。また、鼻腔がん、胃がん及び膀胱・尿道がんをまとめた「細胞傷害性がん」を定義し、解析対象とした。

表 4 発がん性とインビトロ試験結果の関連性解析 (Fisherの正確確率検定) のP値

Assay ID	Assay	肝臓	甲状腺	精巣	子宮	卵巣	乳腺	鼻腔	胃	膀胱尿道
1	LDH assay	1.000	0.842	1.000	1.000	0.501	1.000	0.175	0.090	0.243
2	CellTiter assay	1.000	0.157	1.000	1.000	0.509	0.509	0.649	0.082	0.130
3	GSH assay	1.000	1.000	0.557	1.000	1.000	0.525	0.069	<u>0.030</u>	0.708
4	AHR activation	1.000	0.772	0.015	0.595	1.000	1.000	1.000	0.585	0.049
5	PXR activation	0.683	<u>0.007</u>	1.000	1.000	0.513	1.000	1.000	1.000	0.700
6	PPARα activation	1.000	1.000	0.040	0.596	1.000	1.000	0.096	1.000	1.000
7	RXRα activation	0.112	0.681	0.593	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.376
8	ERα (agonist) (>2.0)	0.655	0.194	0.754	0.104	0.503	0.503	1.000	0.670	0.193
10	AR (agonist) (>1.5)	0.692	1.000	1.000	1.000	1.000	0.138	1.000	0.365	1.000
11	PR (agonist) (>1.5)	1.000	1.000	0.543	1.000	1.000	1.000	1.000	0.295	1.000
12	ERα (antagonist) (<0.5)	0.589	0.793	0.700	1.000	1.000	1.000	<u>0.003</u>	<u>0.001</u>	0.606
13	ERβ (antagonist) (<0.5)	0.606	0.124	0.460	1.000	1.000	1.000	0.049	0.086	0.620
14	AR (antagonist) (<0.5)	0.278	0.681	0.541	0.711	1.000	1.000	0.053	0.665	1.000
15	PR (antagonist) (<0.5)	0.674	0.039	0.766	1.000	0.518	1.000	0.647	1.000	0.703
16	Cyp2b1 mRNA (>2.5)	<u>0.023</u>	0.122	1.000	0.104	0.491	1.000	0.623	0.352	1.000
16	Cyp2b1 mRNA (>10)	0.839	<u>0.002</u>	1.000	0.068	1.000	1.000	1.000	0.413	1.000
16	Cyp2b1 mRNA (>40)	0.058	0.142	0.376	0.024	1.000	1.000	1.000	0.420	0.700
17	Cyp2b1/Cyp3a1 mRNA ratio (>2.5)	<u>0.038</u>	0.230	0.143	0.139	0.511	0.168	1.000	0.690	1.000
17	Cyp2b1/Cyp3a1 mRNA ratio (>10)	<u>0.041</u>	0.375	0.107	<u>0.042</u>	0.491	1.000	0.623	0.673	1.000
17	Cyp2b1/Cyp3a1 mRNA ratio (>40)	0.145	0.068	0.603	0.529	1.000	1.000	0.372	0.429	0.481
18	Cyp2b1/Cyp4a1 mRNA ratio (>2.5)	0.132	<u>0.010</u>	0.759	0.267	0.552	0.552	1.000	0.399	0.685
18	Cyp2b1/Cyp4a1 mRNA ratio (>10)	0.541	<u>0.009</u>	0.566	0.027	1.000	1.000	0.668	0.682	0.708
18	Cyp2b1/Cyp4a1 mRNA ratio (>40)	<u>0.018</u>	0.053	0.545	0.014	0.547	0.547	0.660	0.663	0.681
19	Cyp2b1/Cyp3a1/Cyp4a1 mRNA ratio (>2.5)	0.101	0.228	0.040	0.063	0.497	0.232	1.000	1.000	1.000
19	Cyp2b1/Cyp3a1/Cyp4a1 mRNA ratio (>10)	0.180	0.049	0.341	0.053	0.514	1.000	0.161	1.000	0.197
19	Cyp2b1/Cyp3a1/Cyp4a1 mRNA ratio (>40)	0.180	0.084	0.612	0.169	1.000	1.000	0.399	0.459	0.134
20	Cyp1a1 mRNA (>2.5)	0.656	0.513	0.061	0.434	0.514	0.089	0.637	1.000	0.197
20	Cyp1a1 mRNA (>10)	0.728	1.000	0.317	1.000	0.168	0.168	1.000	1.000	0.114
21	Cyp3a1 mRNA (>2.5)	0.839	<u>0.002</u>	0.379	0.068	1.000	0.499	0.661	0.094	0.451
21	Cyp3a1 mRNA (>10)	0.818	0.175	0.323	0.205	0.457	0.457	0.325	0.339	1.000
21	Cyp3a1 mRNA (>40)	0.765	0.394	0.382	1.000	0.253	0.253	1.000	1.000	0.239
22	Cyp4a1 mRNA (>2.5)	0.776	<u>0.041</u>	1.000	0.600	1.000	1.000	0.544	0.204	0.592
23	CYP1A1 inhibition	0.518	0.020	0.216	0.715	1.000	1.000	0.660	0.663	0.421
24	CYP1A2 inhibition	0.655	1.000	0.200	1.000	0.503	0.503	0.320	0.670	0.193
25	CYP2B1 inhibition	0.688	0.428	0.771	1.000	1.000	1.000	0.185	0.418	0.705
26	CYP2C6 inhibition	0.300	0.026	1.000	0.476	1.000	1.000	0.647	0.681	0.242
27	CYP2D1 inhibition	0.779	1.000	0.108	0.100	1.000	1.000	1.000	0.590	0.284
28	CYP3A2 inhibition	0.838	1.000	0.383	0.298	0.502	0.196	0.381	0.692	0.131

P < 0.05 の値を赤字で、P < 0.01 の値を太字で示した。これらのうち、同じアッセイ ID の値が表 5 の Wilcoxon の順位和検定でも有意であった場合、下線を付した。アッセイのカッコ内の数字は陽性判定の閾値を示す。

表5 発がん性とインビトロ試験結果の関連性解析（Wilcoxonの順位和検定）のP値

Assay ID	Assay	肝臓	甲状腺	精巣	子宮	卵巣	乳腺	鼻腔	胃	膀胱尿道
1	LDH assay	0.255	0.832	0.534	0.468	0.254	0.675	0.031	0.009	0.655
2	CellTiter assay	1.000	0.154	0.892	0.972	0.188	0.052	0.417	0.083	0.103
3	GSH assay	0.693	0.477	0.718	0.708	0.418	0.208	0.042	0.002	0.907
4	AHR activation	0.783	0.836	0.532	0.267	0.705	0.264	0.259	0.113	0.100
5	PXR activation	0.797	<u>0.036</u>	0.719	0.477	0.154	0.775	0.975	0.977	0.885
6	PPARα activation	0.188	0.344	0.824	0.070	0.414	0.473	0.111	0.138	0.171
7	RXRα activation	0.002	0.221	0.898	0.869	0.946	0.103	0.121	0.206	0.907
8	ERα (agonist)	0.913	0.405	0.480	0.392	0.513	0.464	0.803	0.439	0.044
9	ERβ (agonist)	0.368	0.936	0.232	0.948	0.305	0.305	0.960	0.684	0.587
10	AR (agonist)	0.608	0.993	0.968	0.791	0.807	0.354	0.245	0.362	0.332
11	PR (agonist)	0.458	0.798	0.320	0.545	0.992	0.992	0.424	0.426	1.000
12	ERα (antagonist)	0.321	0.847	0.974	0.586	0.346	0.377	<u>0.026</u>	0.005	0.179
13	ERβ (antagonist)	0.228	0.357	0.826	1.000	0.346	0.223	0.082	0.088	0.279
14	AR (antagonist)	0.844	0.869	0.320	0.780	0.271	0.866	0.073	0.337	0.737
15	PR (antagonist)	0.867	0.156	0.613	0.673	0.388	0.929	0.534	0.958	0.221
16	<i>Cyp2b1</i> mRNA	<u>0.020</u>	<u>0.032</u>	0.718	0.069	0.868	0.838	0.745	0.540	0.450
17	<i>Cyp2b1/Cyp3a1</i> mRNA ratio	0.010	0.203	0.208	<u>0.034</u>	0.552	0.364	0.617	0.718	0.924
18	<i>Cyp2b1/Cyp4a1</i> mRNA ratio	0.103	0.003	0.328	0.062	0.591	0.915	0.910	0.333	0.509
19	<i>Cyp2b1/Cyp3a1/Cyp4a1</i> mRNA ratio	0.072	0.089	0.091	0.033	0.296	0.324	0.424	0.710	0.831
20	<i>Cyp1a1</i> mRNA	0.869	0.501	0.134	0.745	0.899	0.055	0.990	0.586	0.070
21	<i>Cyp3a1</i> mRNA	0.468	0.005	0.400	0.108	0.992	0.279	0.177	0.214	0.229
22	<i>Cyp4a1</i> mRNA	0.206	<u>0.022</u>	0.268	0.438	0.068	0.591	0.832	0.345	0.327
23	CYP1A1 inhibition	0.931	0.172	0.006	0.753	0.675	0.915	0.774	0.904	0.051
24	CYP1A2 inhibition	0.566	0.723	0.046	0.480	0.747	0.296	0.207	0.387	0.141
25	CYP2B1 inhibition	0.860	0.631	0.804	1.000	0.385	0.838	0.094	0.087	0.572
26	CYP2C6 inhibition	0.790	0.181	0.625	0.154	0.605	0.792	0.365	0.891	0.860
27	CYP2D1 inhibition	0.433	0.086	1.000	0.238	0.286	0.094	0.069	0.082	0.047
28	CYP3A2 inhibition	0.551	0.731	0.286	0.166	0.245	0.296	0.424	0.339	0.349

$P < 0.05$ の値を赤字で、 $P < 0.01$ の値を太字で示した。これらのうち、同じアッセイ ID の値が表4の Fisher の正確確率検定でも有意であった場合、下線を付した。

2 研究項目：発がん性評価のためのリードアクロス手法の開発

(1) 個別課題：農薬の化学構造情報データベースの構築（吉成浩一（静岡県立大学）、竹下潤一（産業技術総合研究所））

研究項目1の(1)で構築した農薬データセットを対象として、農薬評価書に記載されているCAS名、IUPAC名、構造式を参照として、SciFinderやReaxys、PubChem等のデータベースを利用してSMILES情報を抽出した。得られたSMILESをもとに、alvaDesc(ver.2.0.14)で分子記述子を計算した。最終的に、126物質全てで計算できた記述子は3405であった。これらデータを発がん性情報及びインビトロ試験結果とまとめて整理し、解析用データの基本セットを構築した。

(2) 個別課題：物質間距離計算方法の確立（竹下潤一（産業技術総合研究所））

i) k -近傍法に用いる設定の調査

リードアクロスのためのアルゴリズムは、比較的単純だが解釈性のある機械学習アルゴリズムのひとつである k -近傍法を基本とすることとした。アルゴリズムを実装するにあたり、少なくとも、用いる変数（分子記述子等）の正規化方法、物質間距離の計算方法、近傍物質の個数(k)の決定方法の3つを定める必要がある。そこで、それぞれの項目について調査した。

i-1) 変数の正規化の方法

よく使われるZ-score正規化（各変数を平均0、分散1に変換する方法で、通常「標準化」とよばれる）とMin-Max正規化（各変数を最小値0、最大値1に変換する方法）は元データの符号が変化してしまう欠点がある。そこでこの2つの正規化に加えて、各変数のオーダーを揃える変換であるDecimal正規化も解析対象とした。

• Z-score 正規化：
$$x_i' = \frac{x_i - \text{Mean}(x)}{\text{sd}(x)}$$

• Min-Max 正規化：
$$x_i' = \frac{x_i - \text{Min}(x)}{\text{Max}(x) - \text{Min}(x)}$$

• Decimals 正規化：
$$x_i' = \frac{x_i}{10^r}$$

（ただし、 $r = \lfloor \log_{10} \max(|x_{ij}|) \rfloor + 1$ 、すなわち各変数の絶対値の最大値が1未満になる最小の整数）

i-2) 2物質間の距離計算の方法

距離の種類は膨大にあるが、 k -近傍法に用いる観点からAlfeilatら（*Big Data*, 2019）の結果において正答率・感度・適合度の観点から予測性の良かった上位10個に入っている距離13個を本研究の解析で用いる候補とした。なおAlfeilatらは、複数のデータセットを用いて複数の距離により k -近傍法で予測を行い、距離設定による精度の違いを網羅的に比較している。

1) ユークリッド距離 (ED) :
$$\text{ED}(x, y) := (\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2)^{1/2}$$

2) マンハッタン距離 (MD) :
$$\text{MD}(x, y) := \sum_{i=1}^n |x_i - y_i|$$

3) ローレンツ距離 (LD) :
$$\text{LD}(x, y) := \sum_{i=1}^n \log(1 + |x_i - y_i|)$$

4) キャンベラ距離 (CanD) :
$$\text{CanD}(x, y) := \sum_{i=1}^n \frac{|x_i - y_i|}{|x_i| + |y_i|}$$

5) ジャッカード距離 (JacD) :
$$\text{JacD}(x, y) := 1 - \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{(|x|^2 + |y|^2 - \sum_{i=1}^n x_i y_i)}$$

6) コサイン距離 (CosD) : $\text{CosD}(x, y) := 1 - \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\|x\| \|y\|}$

7) ダイス距離 (DicD) : $\text{DicD}(x, y) := 1 - \frac{2 \sum x_i y_i}{\|x\|^2 + \|y\|^2}$

8) クラーク距離 (ClaD) : $\text{ClaD}(x, y) := \left(\sum \left(\frac{x_i - y_i}{|x_i| + |y_i|} \right)^2 \right)^{1/2}$

9) ダイバージェンス距離 (DivD) : $\text{DivD}(x, y) := 2 \sum_{i=1}^n \frac{(x_i - y_i)^2}{(x_i + y_i)^2}$

10) 平方カイ二乗距離 (SCSD) : $\text{SCSD}(x, y) := \sum \frac{(x_i - y_i)^2}{|x_i + y_i|}$

11) L^1 距離と L^∞ 距離の平均 (AveD) : $\text{AveD}(x, y) := \frac{1}{2} (\sum_{i=1}^n |x_i - y_i| + \max_i(x_i, y_i))$

12) ホイッターカー距離 (WIAD) : $\text{WIAD}(x, y) := \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \left| \frac{x_i}{\sum_{j=1}^n x_j} + \frac{y_i}{\sum_{j=1}^n y_j} \right|$

13) ハサナット距離 (HasD) : $\text{HasD}(x, y) := \sum_{i=1}^n D(x_i, y_i)$

$$D(x_i, y_i) := \begin{cases} 1 - \frac{1 + \min(x_i, y_i)}{1 + \max(x_i, y_i)} & (\min(x_i, y_i) \geq 0) \\ 1 - \frac{1 + \min(x_i, y_i) + |\min(x_i, y_i)|}{1 + \max(x_i, y_i) + |\min(x_i, y_i)|} & (\min(x_i, y_i) < 0) \end{cases}$$

各距離の性質を考察するために、用いる変数が2個の場合について点(0.1,0.1)を中心とした2次元の等高線と1次元の場合における点0.1から距離のグラフを描いた(図2、図3)。その結果、以下に述べる5つのグループに分けられることがわかった。

(A) 同心円様の等高線をもつ距離 : ED、MD、LD、AveD、HasD

(B) 同符号のみ同心円様の等高線をもつ距離 : CanD、ClaD

(C) 2領域で同心円様の等高線をもつ距離 : JacD、DicD

(D) 4領域で三角形様の等高線をもつ距離 : DivD、SCSD

(E) 放射状の等高線をもつ距離 : CosD、WIAD

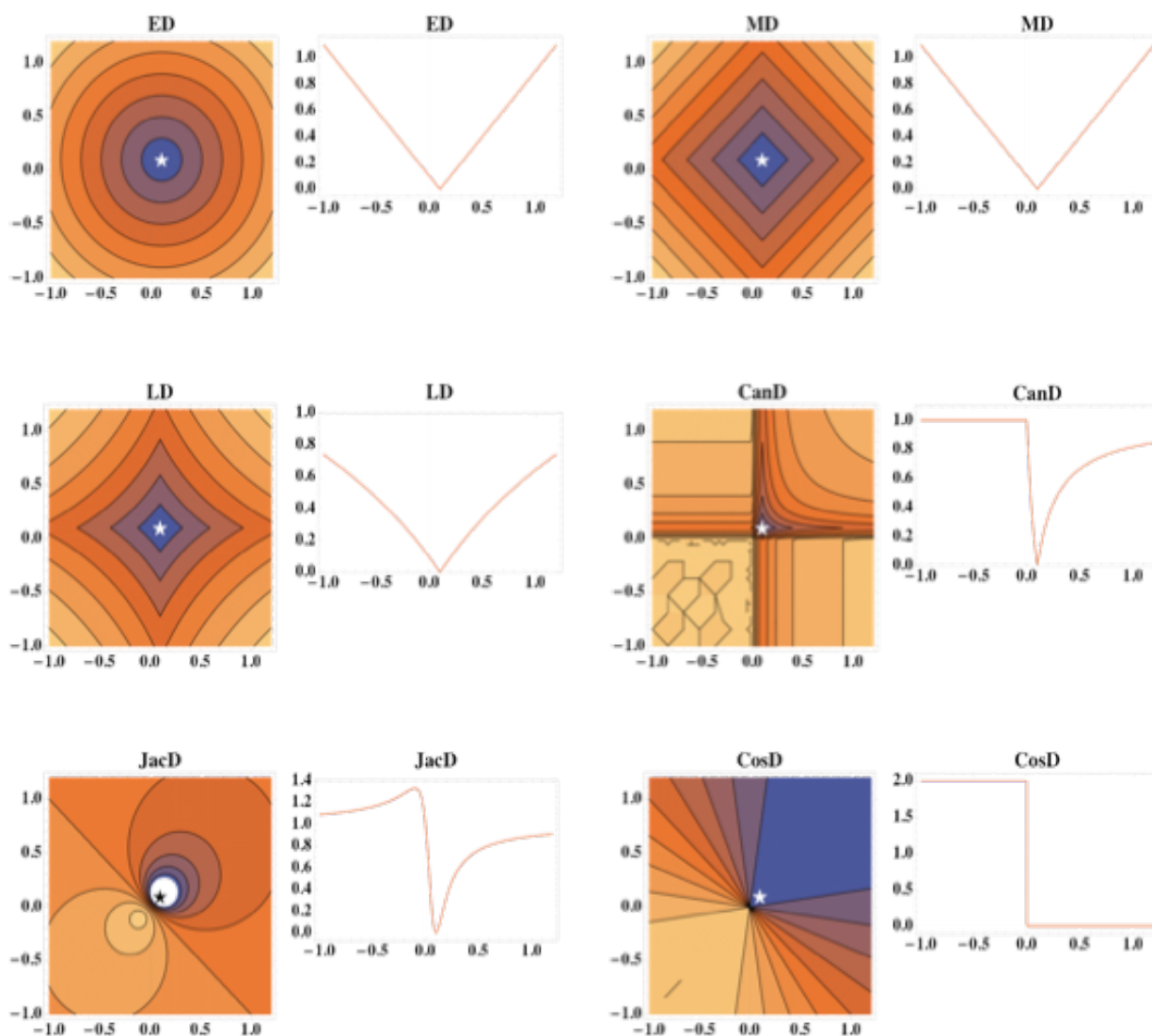


図2 各種距離を利用して作成した2次元の等高線図と1次元での距離①

ED : ユークリッド距離、MD : マンハッタン距離、LD : ローレンツ距離、CanD : キャンベラ距離、JacD : ジャッカカード距離、CosD : コサイン距離をそれぞれ表す。MD は ED よりもくぼんだ等高線であり、1次元では ED と一致する。LD は ED、MD よりもくぼんだ等高線となる。CanD は符号が異なると一律に距離 1 となる。JacD は符号が変わると、距離が大きくなった後に小さくなる。CosD は 1次元では、同じ向きか異なる向きかだけを示す。

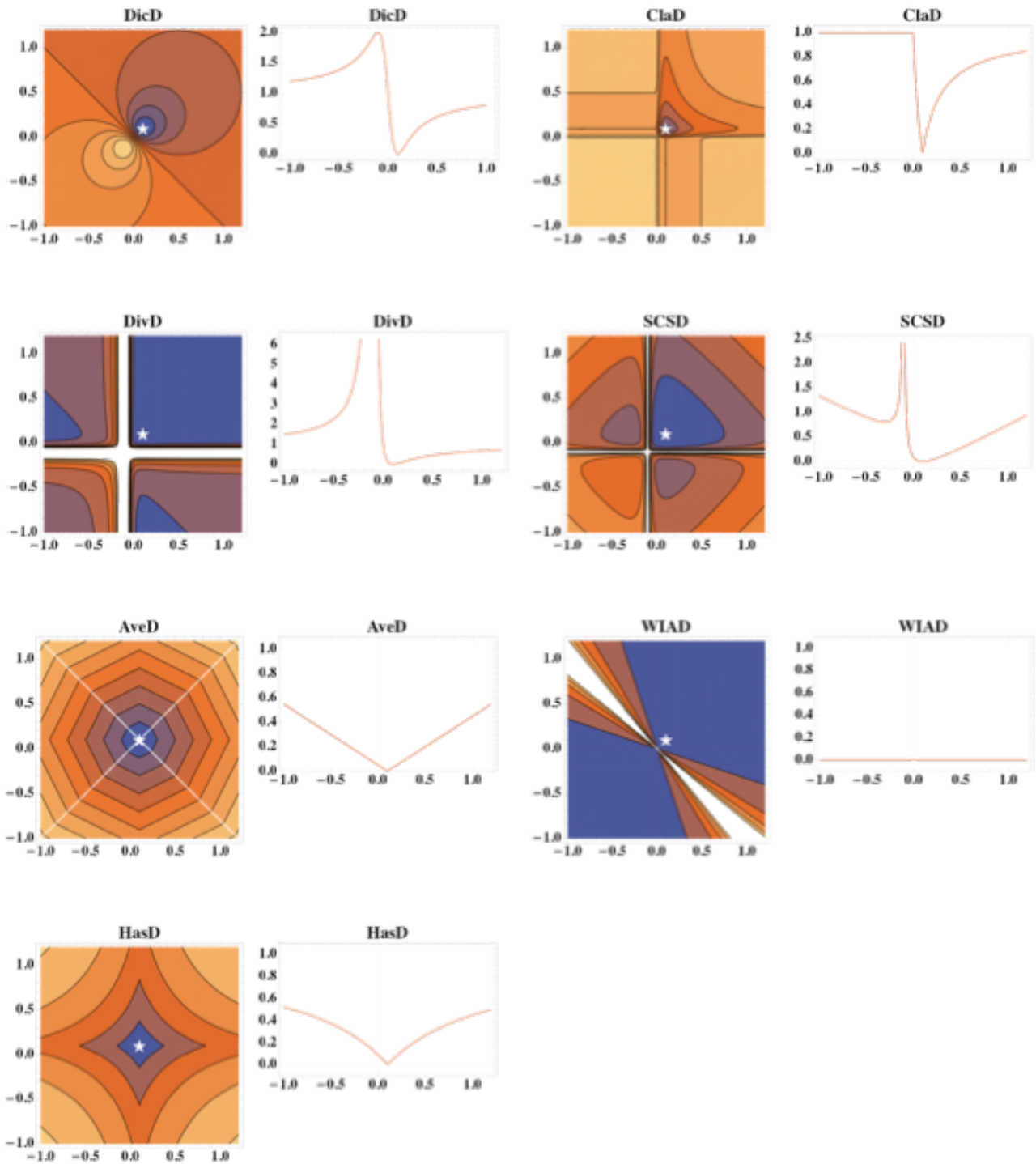


図3 各種距離を利用して作成した2次元の等高線図と1次元での距離②

DicD : ダイス距離、ClaD : クラーク距離、DivD : ダイバージェンス距離、SCSD : 平方カイ二乗距離、AveD : L^1 距離と L^∞ 距離の平均、WIAD : ホイッターカー距離、HasD : ハサナット距離をそれぞれ表す。DicD は符号が変わると、距離が大きくなった後に小さくなる。ClaD は符号が異なると一律に距離 1 となる。DivD と SCSD は符号が変わると、距離が大きくなった後に小さくなる。また漸近線をもつ。AveD と HasD は ED や MD よりもくぼんだ等高線である。WIAD は漸近線をもつ。ただし 1次元の場合は距離を測ることができない。

i-3) 近傍物質の個数の決定方法

説明変数の前処理、物質間距離、変数選択等について比較するために、個数決定の方法について文献を調査し (e.g., Jirina and Jirina, *Proc ISDA2010*, 220-224, 2010; Jirina and Jirina, *New Fundam Technol Data Min*, ch19:369-387, 2011; Hassanat et al., *Int J Comput Sci Inf Secur*, 12:33-39, 2014)、具体的な手順として次のようにまとめることができた。

- 1) 近傍物質候補数 N の平方根 \sqrt{N} を超えない最大奇数 M を決める。
- 2) 各評価対象物質の毒性について、その 1-近傍からの予測、その 3-近傍からの予測、と順番に k を M までの全ての奇数とおいた場合の予測結果を求める。
- 3) 全ての予測結果からの総合判断で各評価対象物質のクラス (がん陽性/陰性) を予測する。ここでの総合判断の方法としては、各予測結果に適切な重みをつけたスコアに基づく方法や、各予測結果による投票形式に基づく方法が考えられる。

以下の解析では、Hassanat (2014)で提案された方法 (以下、Hassanat の方法) を利用することとした。

ii) 記述子の正規化と物質間距離がリードアクロスの精度に与える影響

研究項目 1 の (1) で構築した農薬データセットに含まれる全物質を対象に研究項目 2 の (1) と同様の解析を行った結果、全物質で計算できた分子記述子は 2822 個であった。分子記述子情報のみで本項目の解析は可能であるため、全物質と 2822 個の分子記述子を解析用データとした。

i-1)、i-2)で検討対象とした正規化と距離の違いがリードアクロスの予測精度へ与える影響を考察するために、解析用データを 5 分割し、各サブセットに含まれる物質の毒性を残り 4 つのサブセットから予測して精度を算出する 5 分割交差検証を用いた。陽性数が 5 未満の臓器では 5 分割交差検証の方法を適切に実施できないため、表 1 の解析対象臓器のうち、肝臓 (35)、甲状腺 (41)、精巣 (22)、子宮 (12)、鼻腔 (5)、胃 (6)、膀胱/尿道 (7) を対象とし解析を行った (カッコ内の数字は各臓器での陽性数を表す)。なお、予測精度を表す指標としては正答率、感度、特異度、BA (balanced accuracy; 感度と特異度の算術平均) を用いた。

表 6 に臓器ごとに各正規化手法の BA と感度を順位化し、それぞれの平均順位をまとめた。その結果、BA と感度の両方で Decimal 変換、Min-Max 変換、Z-score 変換の順に平均順位が高かった。特に、感度について Decimal 変換と Min-Max 変換の平均順位差に比べ、Min-Max 変換と Z-score 変換の平均順位差は大きかった。以上から Decimal 変換を採用する、もしくは良く使われる変換を利用したい場合は Min-Max 変換を採用することが望ましいと考えられた。

以下に、Decimal 正規化の場合について臓器ごとの解析結果の要約を記載する。

- 肝臓: BA はどの距離でも 0.5 前後、感度と特異度では良い距離と悪い距離の差が大きく 0.5 を下回る距離も多かった。
- 甲状腺: BA は 0.54~0.66 程度、感度と特異度では良い距離と悪い距離の差が大きく 0.5 を下回る距離もあったが、その個数は肝臓よりは少なかった。
- 精巣: BA と感度はどの距離でも 0.5 以下、特異度は 0.63~0.74 程度であった。
- 子宮: BA は 0.66~0.71 程度、感度は 0.50~0.67 程度、特異度は 0.75~0.83 程度であった。
- 鼻腔: BA は 0.63~0.80 程度、感度は 0.60 か 0.80、特異度は 0.65~0.80 程度であった。
- 胃: BA は 0.70~0.86 程度、感度は 0.67~1.0、特異度は 0.69~0.80 程度であった。
- 膀胱/尿道: BA は 0.65~0.74 程度、感度は 0.43~0.71、特異度は 0.62~0.76 程度であった。

まとめると、胃、鼻腔、子宮はどの距離及びどの精度指標でも比較的高い予測精度が得られた。一方で、精巣と肝臓ではどの距離、どの精度指標でも比較的低い予測精度を示した。

表7に Decimal 正規化を利用した場合の距離ごとの7臓器の平均予測指標を示す。表7より、BA と感度では平方カイ二乗距離が最も高く、特異度ではジャッカド距離とダイス距離が最も高い結果となった。ただし、BA ではどの距離も平方カイ二乗距離に比べて 0.05 以内であったため、物質間距離の種類によって大きな差は見られなかった。また、感度と特異度を比較すると、トレードオフの関係が明らかになった。つまり、感度と特異度の両方が高い場合、BA も高くなるが、そのような性質を有する理想的な距離はないことが示された。感度と特異度の差が最も小さかった距離はローレンツ距離であったが、今回解析対象とした 13 種類の距離の中で、感度でも特異度でも中位くらいの性能であった。さらに、臓器や精度指標によって、精度が良い距離が異なることも確認された。

表6 (a)解析対象7臓器におけるBAの13距離の平均順位、(b)解析対象7臓器における感度の13距離の平均順位

正規化手法	肝臓	甲状腺	精巣	子宮	鼻腔	胃	膀胱/尿道	平均順位
(a)								
Z-score	3	3	3	2	1	3	1	2.3
Min-Max	1	1	1	3	3	2	3	2.0
Decimal	2	2	2	1	2	1	2	1.7
(b)								
Z-score	3	3	3	2	1	3	1	2.3
Min-Max	1	1	1	3	3	2	3	2.0
Decimal	2	2	2	1	2	1	2	1.7

表7 Decimal正規化を用いた場合の13距離における7臓器の平均予測指標と順位

精度指標 距離	BA		感度		特異度	
	平均値	順位	平均値	順位	平均値	順位
ユークリッド距離	0.617	12	0.531	12	0.703	6
マンハッタン距離	0.638	3	0.590	4	0.685	8
ローレンツ距離	0.634	5	0.586	7	0.682	9
L^1 と L^∞ の平均距離	0.638	2	0.590	4	0.686	7
ハサナット距離	0.636	4	0.590	4	0.681	10
キャンベラ距離	0.620	10	0.616	3	0.624	12
クラーク距離	0.615	13	0.619	2	0.610	13
ジャッカド距離	0.632	6	0.543	10	0.721	1
ダイス距離	0.629	7	0.537	11	0.721	1
ダイバージェンス距離	0.629	7	0.546	9	0.712	4
平方カイ二乗距離	0.641	1	0.654	1	0.627	11
コサイン距離	0.618	11	0.521	13	0.715	3
ホイッタカー距離	0.627	9	0.550	8	0.703	5

以上の結果から、分子記述子情報のみから予測しやすい臓器と予測しにくい臓器があると明らかになった。また、どの指標も平均的に良いという望ましい性質をもつ距離はないことも明らかになった。ただし、距離によって精度の性質が異なるにもかかわらず、BA は一部の臓器と距離を除いて大きな差がないことが確認された。

そこで、複数の距離を組み合わせることで利用し予測するアプローチが有効である可能性を考え、2種類の多数決アプローチと1種類の決定木アプローチについて予測精度を算出した。それぞれのアプローチについてその方法と結果の概要を以下に述べる。なお、それぞれのアプローチのイメージを図4と図5に示した。



図4 多数決アプローチのイメージ図
RAxは単独の距離によるリードアクロスを表す。

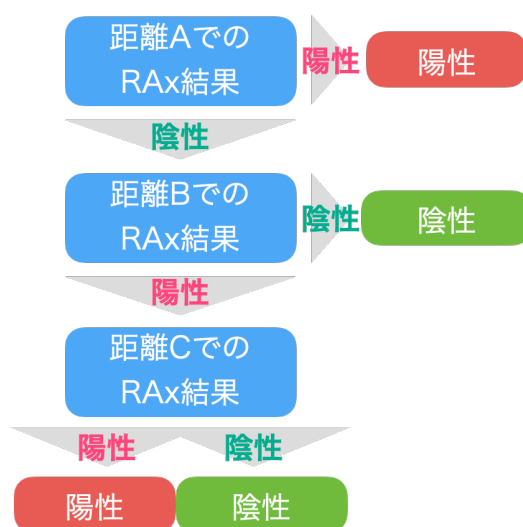


図5 決定木アプローチのイメージ図
RAxは単独の距離によるリードアクロスを表す。

多数決アプローチ①

感度が平均的に良かった平方カイ二乗距離、特異度が平均的に良かったジャカード距離、BAがこの2つの距離について平均的に良かった L^1 距離と L^∞ 距離の平均距離の3つそれぞれの距離によるリードアクロス結果の多数決によって最終予測結果を決定する方法である。このアプローチでは、単独の距離でBAが最大となる距離に比べて予測精度が悪くなった臓器が多かったが、子宮のみについては全ての予測指標が単独の距離によるリードアクロスに比べて向上した(表8)。

多数決アプローチ②

感度と特異度での順位差が少なく、かつ距離グループが異なるローレンツ距離・ダイバージェンス距

離・ホイッタカー距離の3つそれぞれの距離によるリードアクロス結果の多数決によって最終予測結果を決定する方法である。このアプローチの結果は、概ね多数決アプローチ①と同様の傾向であった（表9）。

決定木アプローチ

次の3つのステップで最終予測結果を決定する方法である。この方法では、甲状腺を除き単独の距離によるリードアクロスの感度に比べ大幅に感度が向上した。一方で、子宮を除き単独の距離によるBAよりもBAが悪くなった。（表10）

STEP1：感度が平均的に良かった平方カイ二乗距離によるリードアクロスで陽性と予測された物質は、最終予測結果を陽性とする。

STEP2：STEP1で陰性と予測された物質について、特異度が平均的に良かったジャカード距離によるリードアクロスで陰性と予測された物質の最終予測結果を陰性とする。

STEP3：STEP1とSTEP2で最終予測結果が決定されなかった物質は、 L^1 距離と L^∞ 距離の平均距離によるリードアクロス結果を最終的な予測対象とする。

3つのアプローチの結果から、単純に複数の距離による予測結果を組み合わせても全体的な予測精度を向上させることは難しいこと、一方で、感度もしくは特異度を優先させたい場合には、BAは犠牲になるが決定木アプローチは有効な手法となる可能性があることが明らかになった。

表8 (A)多数決アプローチ①での予測精度と、(B)臓器別のBAが最大であった距離での予測精度

(A)	正答率	BA	感度	特異度	(B)	正答率	BA	感度	特異度
肝臓	0.503	0.508	0.514	0.502	肝臓	0.587	0.529	0.457	0.601
甲状腺	0.617	0.540	0.439	0.640	甲状腺	0.505	0.658	0.854	0.462
精巣	0.620	0.479	0.318	0.640	精巣	0.653	0.496	0.318	0.674
子宮	0.822	0.747	0.667	0.828	子宮	0.746	0.708	0.667	0.749
鼻腔	0.773	0.688	0.600	0.776	鼻腔	0.792	0.796	0.800	0.792
胃	0.768	0.800	0.833	0.767	胃	0.806	0.861	1.000	0.806
膀胱/尿道	0.710	0.642	0.571	0.713	膀胱/尿道	0.757	0.736	0.714	0.758

表9 (A) 多数決アプローチ②での予測精度と、(B) 臓器別の BA が最大であった距離での予測精度

(A)	正答率	BA	感度	特異度	(B)	正答率	BA	感度	特異度
肝臓	0.508	0.536	0.571	0.502	肝臓	0.587	0.529	0.457	0.601
甲状腺	0.628	0.567	0.488	0.646	甲状腺	0.505	0.658	0.854	0.462
精巣	0.631	0.463	0.273	0.654	精巣	0.653	0.496	0.318	0.674
子宮	0.817	0.744	0.667	0.822	子宮	0.746	0.708	0.667	0.749
鼻腔	0.784	0.693	0.600	0.787	鼻腔	0.792	0.796	0.800	0.792
胃	0.762	0.797	0.833	0.761	胃	0.806	0.861	1.000	0.806
膀胱/尿道	0.727	0.651	0.571	0.730	膀胱/尿道	0.757	0.736	0.714	0.758

表10 (A) 決定木での予測精度と、(B) 臓器別の BA が最大であった距離での予測精度

(A)	正答率	BA	感度	特異度	(B)	正答率	BA	感度	特異度
肝臓	0.363	0.495	0.657	0.332	肝臓	0.587	0.529	0.457	0.601
甲状腺	0.473	0.543	0.634	0.452	甲状腺	0.505	0.658	0.854	0.462
精巣	0.525	0.449	0.364	0.535	精巣	0.653	0.496	0.318	0.674
子宮	0.743	0.746	0.750	0.743	子宮	0.746	0.708	0.667	0.749
鼻腔	0.607	0.702	0.800	0.604	鼻腔	0.792	0.796	0.800	0.792
胃	0.639	0.817	1.000	0.633	胃	0.806	0.861	1.000	0.806
膀胱/尿道	0.568	0.640	0.714	0.565	膀胱/尿道	0.757	0.736	0.714	0.758

iii) 変数選択のための組合せ最適化問題の定式化

リードアクロスに用いる変数は、用いる変数で2物質間距離を計算した場合に同グループ間（陽性物質同士、陰性物質同士）の物質対ではなるべく近く、異グループ間（陽性物質と陰性物質）の物質対ではなるべく遠くなることを望ましい。そこで、まず「異グループの物質対の平均距離÷同グループ物質対の平均距離」がなるべく大きくなる変数の組み合わせを探索する問題を、次の組合せ最適化問題（0-1 整数計画問題）として定式化した。

$$\begin{array}{ll} \text{最大化} & \frac{\text{異グループの物質対の平均距離}}{\text{同グループの物質対の平均距離}} \\ \text{制約条件} & x_i \in \{0,1\} (i = 1, \dots, N) \end{array}$$

ここでリードアクロスに用いることが可能な変数を変数1, 変数2, ..., 変数Nと番号づけ、 x_i を距離計算に変数*i*を用いる場合に1を、用いない場合に0を取る2値変数とした。

この組合せ最適化問題について厳密な解を求めることは一般的には不可能であるため、近似最適解を求める手法の1つであるアニーリング法を用いて求解することを試みた。しかしながら、特定の臓器を対象とし複数の距離について近似最適解の求解を行ったところ、実用的な時間では予測精度の向上に寄与できるほどの分子記述子の組み合わせが見つけられなかった。アニーリング法ではリードアクロスに用いる変数を増やしたり減らしたりする操作を相当な回数行うが、その操作を行う度に全ての物質間距離を再計算した上でリードアクロスを実際に行う必要がある。しかし、本研究の解析用データの物質数と分子記述子数は比較的大きいため、全ての物質対の距離計算自体に多少の時間を要すること、また Hassanat の方法自体が複数の近傍数 k にてリードアクロスを行う必要があることから、アニーリング法の中での1回の遷移（用いる変数を1つ増減させること）ごとに実施する計算自体に時間がかかる。そのため、実用的な求解時間では十分な解探索ができず、得られた近似最適解である分子記述子の組み合わせでは予測精度の向上があまり得られなかったと考えられる。今後、全物質間距離の再計算に関する理論的な知見（全物質間距離の再計算に関する漸化式の導出など）を見出すことができれば、リードアクロスに用いる変数選択に、組合せ最適化を実用的な求解時間で活用できる

可能性はあるだろう。

そこで、組合せ最適化問題を求解することで最良な変数組み合わせを探索するのではなく、各変数の予測精度への寄与度を予測することが可能な実験計画法（2水準直交表）を用いて変数選択するアプローチも検討した。計算時間の関係から以下に述べる具体的な手順を2分割交差検証を用いて行った。なお、解析データはii)と同様である。

- ① 学習用データ（Tdata）に含まれる記述子から同一値であるものを削除し、相関関係がとて強い記述子群から代表の分子記述子を1つずつ選択する前処理を行い、残った1811個の分子記述子を解析に用いる分子記述子として抽出した。
- ② 予測対象とする臓器での陽性率を算出した。この陽性率を `out_th1` とおく。
- ③ Tdata の各分子記述子を Min-Max 正規化し、この変換を行ったパラメータを用いて検証用データ（Vdata）の各分子記述子も変換した。
- ④ さらに Tdata を陽性・陰性比率を保ったまま 2:1（TTdata と TVdata）に分割した。
- ⑤ 抽出した1811個の記述子を2048次元のアダマール行列（2水準直交表）の2列目～1812列目に割当て、各行について1となっている分子記述子のみを用いて TVdata の各物質 i (i は各物質を表す番号) の陽性スコアと陰性スコアを TTdata の物質から算出し、次で定義する陽性確率 p_i を算出した。

$$p_i = \frac{\text{陽性スコア}}{\text{陽性スコア} + \text{陰性スコア}}$$

- ⑥ アダマール行列の各行 j について、`logloss` とよばれる量を参考に次の量を算出した。この量は小さいほど正しい予測をしていることを表す。

$$\text{mlogloss}(j) = -\frac{1}{\text{Vdata の陽性物質数}} \sum_{\text{陽性物質}} \log(p_i) - \frac{1}{\text{Vdata の陰性物質数}} \sum_{\text{陰性物質}} \log(1 - p_i)$$

- ⑦ 各分子記述子についてアダマール行列で1となっている行の `mlogloss` の和を算出した。この和の値が小さいほど正しい予測に寄与している分子記述子であると考えられる。
- ⑧ リードアクロスを行う記述子を M 個とした場合、`mlogloss` 和が小さい順に M 個の分子記述子を用いて Vdata の毒性を Tdata からリードアクロスで予測することで予測精度を定量化した。

以上の手順は陽性数が6以上でないと実施できないため、表1にある臓器のうち、肝臓（35）、甲状腺（41）、精巣（22）、子宮（12）、胃（6）、膀胱/尿道（7）、副腎（6）の7臓器を対象に、分子記述子61個（Tdataの1/3）を選択した場合について分子記述子選択をしない場合との予測精度を比較した。なお、副腎はインビトロ試験を利用した解析では解析対象外であるが、ここでは解析対象を増やすために追加した。カッコ内の数字は各臓器での陽性数を表す。物質間距離については最も一般的なユークリッド距離と、i)で構築した5グループから1つずつ選択したハサナット距離、ダイス距離、ホイッタカー距離、キャンベラ距離、ダイバージェンス距離の計6種類について解析を行った。

表11に正答率、BA、感度、特異度の7臓器での平均値を、(A)分子記述子選択ありの場合と(B)分子記述子選択なしの場合のそれぞれについて示した。なお、表(A)中の緑字は平均精度が0.01以上改善したことを、赤字は0.01以上改悪したことを表す。ユークリッド距離とホイッタカー距離では全ての指標が改善し、ハサナット距離では全ての指標が改悪した。また、ダイス距離では感度以外が改善し、感度は改悪した。キャンベラ距離とダイバージェンス距離では感度のみが改善し、感度以外が改悪した。

表 11 正答率・BA・感度・特異度の7臓器での平均値

	(A)	正答率	BA	感度	特異度	(B)	正答率	BA	感度	特異度
ユークリッド距離		0.74	0.59	0.41	0.76		0.71	0.54	0.36	0.72
ハサナット距離		0.69	0.56	0.44	0.69		0.71	0.58	0.45	0.71
ダイス距離		0.81	0.57	0.31	0.84		0.70	0.52	0.33	0.72
ホイッタカー距離		0.73	0.62	0.50	0.74		0.71	0.55	0.38	0.72
キャンベラ距離		0.41	0.49	0.59	0.39		0.66	0.58	0.50	0.66
ダイバージェンス距離		0.58	0.52	0.45	0.58		0.69	0.54	0.37	0.70

(A)は分子記述子の選択をした場合、(B)は分子記述子の選択をしなかった場合である。表(A)中の緑字は分子記述子の選択によって平均精度が0.01以上改善したことを、赤字は0.01以上改悪したことを表す。

iv) (2) のまとめ

ii)の結果より、分子記述子の正規化については Decimal 正規化が最も予測精度が良いが、よく利用されている Z-score 正規化と Min-Max 正規化であれば Min-Max 正規化の方が予測精度が良いことが示された。また、物質間距離については1つだけの距離を利用したい場合は、対象臓器や精度指標に関わらず予測精度の観点から最も良い距離を決めることはできないこと、そして BA については距離間で精度に大きな違いがあまり確認できないことが明らかになった。また、iii)の結果より分子記述子の選択は、ユークリッド距離とホイッタカー距離を用いた場合には精度指標に関わらず精度向上が見込まれることがわかった。そのため以下の解析では、正規化については Min-Max 正規化を、距離についてはユークリッド距離とホイッタカー距離のうち、一般的に理解が容易であるユークリッド距離を利用することとした。

物質間距離に関する先行研究の多くでは高次元小標本のデータ(=記述子が多く、物質数が少ないデータ)で k -近傍法を用いる場合には、距離の選択が予測精度に大きく寄与することやユークリッド距離は精度が低く推奨されないことが報告されている。しかし、今回の解析結果はそれら先行研究とは異なるものであり、毒性試験データにはなんらかの特徴的な構造が内在している可能性がある。この構造を解明することができれば、その知見を元に k -近傍法の最良な適用方法が提案できるかもしれない。先行研究では陽性数と陰性数とが不均衡なデータのみで解析されることは少なく、予測精度の指標として BA はあまり利用されていない。そのため、不均衡データのみを対象としていることが本研究と既存研究の結果の差異を生み出している要因の1つとして考えられる。また、分子記述子選択についても本解析では、一般的な多変量解析手法で推奨されている学習用データの1/3の個数を選択した。しかし一般的には選択する個数によって結果は変わるため、適切な個数については今後検討していきたい。例えば、Huaら(Bioinformatics, 2005)では、 k -近傍法における説明変数(分子記述子)の個数は学習用データの個数が増えてもあまり変わらず、データ数(物質数)が10~5000程度では $k = 9, 10$ が良いと報告されている。そのため、一般的な多変量解析手法とは最適な選択個数は大きく変わる可能性がある。ただし、物質間距離設定でも述べたように毒性試験データの場合は既存研究結果がそのまま当てはまらない場合もあるため、より詳しい解析が必要であると考えている。

(3) 個別課題：リードアクロスの実施と検証（吉成浩一（静岡県立大学）、竹下潤一（産業技術総合研究所））

上述の、発がん性とインビトロ試験結果の統計学的な関連性解析の結果に基づいて、i) 細胞傷害性と関連する鼻腔がん、胃がん、膀胱・尿道がん、並びにii) 肝がん、iii) 甲状腺がんをリードアクロスの解析対象とした。

i) 細胞傷害性関連がん（鼻腔がん、胃がん、膀胱・尿道がん）

本解析では、鼻腔がん、胃がん、膀胱・尿道がんの3種のがんについてそれぞれ解析を行うと共に、これらのがんをまとめて「細胞傷害性がん」というカテゴリーを作成し、いずれかで陽性であった物質を「細胞傷害性がん」陽性として解析を行った。

126物質について、alvaDesc (ver.2.0.14) を用いて3D記述子以外の分子記述子を計算し、全物質で一定値を示したものを除外した。得られた2297分子記述子について、最小値が0、最大値が1になるように正規化 (Min-Max正規化) した。

インビトロ試験結果については、溶媒対照群の値を1とする相対値に変換し、各実験の溶媒対照群の標準誤差 (SD) を参考に3SD程度の閾値を設定して、LDHアッセイでは1.2を超える値、CellTiterアッセイでは0.95未満、GSHアッセイでは0.9未満または1.1を超える値を陽性とした。なお、GSHレベルでは、反応性化学物質の曝露により化学物質との反応に伴う細胞内レベルの低下と代償的な合成促進による細胞内レベルの増加が起こりうるため、両方向に閾値を設定した。

これら化学構造情報とインビトロ試験結果を用いて、以下の方法でリードアクロスを行った。方法の概要を図6に示す。得られた全分子記述子 (2297種) の値を利用して全物質間のユークリッド距離を算出し、これらを理論上の最大値 (分子記述子数の平方根) で除し、相対距離とした。次に、全物質ペア (7857ペア) の相対距離の第一四分位の値を類似性の閾値として設定し、各物質について閾値内に存在する物質を類似物質 (ソース物質) として選定した。得られたソース物質中の発がん性陽性率が、データセットの発がん性陽性率 (各がん種ごとに異なる値) を上回った場合、被験物質を発がん性陽性と判定した。この作業を全126物質について実施し、予測結果の正誤を基に、感度、特異度、一致率、BAを算出し、予測精度の指標とした。

リードアクロスにインビトロ試験を用いる場合には、分子記述子で選択したソース物質 (一次ソース物質) のうち、インビトロ試験結果の陽性・陰性の2値が被験物質と一致する物質のみをソース物質 (最終ソース物質) として予測を行った。得られた結果を図7に示し、各がんの結果の概要を以下に記す。

鼻腔がん : $P < 0.2$ の2試験 (LDHアッセイ、GSHアッセイ) の結果を単独で用いた場合にBAが向上し、両者を組み合わせた場合には、BAはさらに向上した。感度と特異度の差も小さくなった。一方、 $P = 0.649$ のCellTiterアッセイを用いた場合にはBAは低下した。

胃がん : 3種の試験のいずれの結果を用いた場合においても予測精度の向上が見られた。また、単一の試験結果を用いた場合に比べて、複数の試験結果を組み合わせて用いることで予測精度がさらに向上し、BAは3試験全てを用いたときに最も高かった。

膀胱/尿道がん : $P < 0.2$ の2試験 (LDHアッセイ、CellTiterアッセイ) の結果を単独で用いた場合、BAが上昇した。 $P = 0.708$ であったGSHアッセイの結果を用いた場合にも、その程度は小さいがBAの上昇は認められた。また、単一の試験結果を用いた場合に比べて、複数の試験結果を組み合わせて用いた場合には、特異度は上昇するが感度が低下するケースが多く、BAは大きく変化しなかった。3試験全てを用いたときに最も高いBAが得られたが、CellTiterアッセイと単独で用いた場合に最も高い感度が

得られた。

細胞傷害性がん：3種の試験のいずれの結果を用いた場合にも予測精度の向上が見られた。わずかではあるが、複数試験を組み合わせることで精度の上昇が認められ、3試験全ての結果を用いた場合に最も大きなBAが得られた。

以上の結果より、解析対象としたいずれのがんにおいても、インビトロ試験結果を用いてソース物質を絞り込むことで、リードアクロスの精度が向上することが示された。

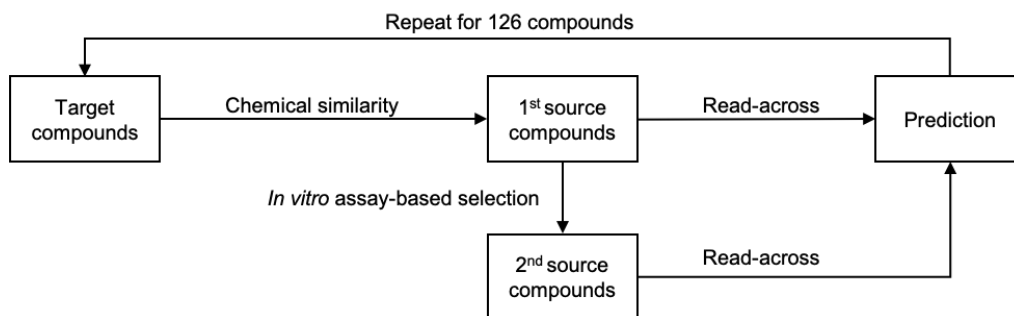


図6 本研究におけるリードアクロス手法の概要

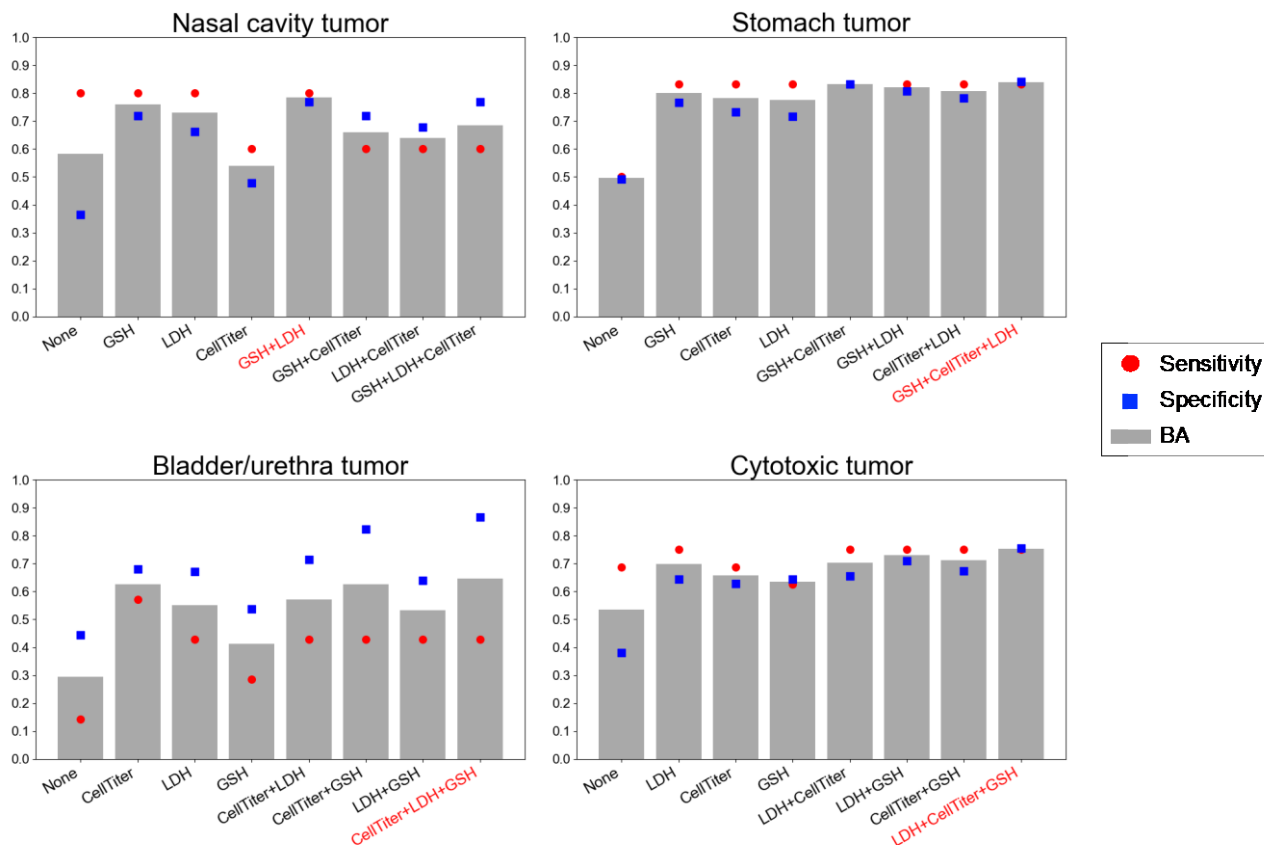


図7 分子記述子及びインビトロ試験結果を利用したリードアクロス結果

横軸はインビトロ試験（Noneは分子記述子のみ）を示す。最も高いBAが得られた条件を赤字で示した。

上記解析では、計算可能な全記述子（2297記述子）を一次ソース物質の選択に使用した。しかし、分子記述子のみを使用したリードアクロスの精度が必ずしも高くなかったこと、また、毒性学的に関連のあるインビトロ試験結果を利用することでリードアクロスの精度が向上したことから、分子記述子についても各がんに関連のあるものを選択することで、精度の向上が認められるのではないかと考え、記述子の選択を実施した。

まず、全記述子のうち、相関係数が大きな記述子を削除した。次に、Wilcoxonの順位和検定を実施して、各がんに関連がある（ $P < 0.05$ ）記述子を「 $p < 0.05$ 」セットとして各がんについて選択したところ、鼻腔がん、胃がん、膀胱・尿道がん、及び細胞傷害性がんについてそれぞれ142、455、48及び469記述子が得られた。一般に、被験物質数と比較して高次元のデータは予測には適していないとされていることから、各がんについて上位126個（被験物質数と同数）の記述子を選択し、これらを「n126」セットとして定義した。さらに、上位11個（ $\sqrt{126}$ の近似整数）の記述子を含む「n11」セットを定義した。そして、これら4セットの記述子を使用して物質間ユークリッド距離を計算し、上記と同様に一次ソース物質を選択してリードアクロスを実施した。結果を図8に示す。

全てののがんについて、「 $p < 0.05$ 」セットは全記述子（2297記述子）を用いた場合よりも高い特異度とBAを示した。感度については、胃がんでは向上したが、他の腫がんでは低下した。「n11」セットでは、全てののがんで特異度は向上したが、感度は低下し、胃がん及び膀胱・尿道がんでは、特異度は1、感度は0となった。「n126」セットでは、胃がん及び膀胱・尿道がんでは、感度、特異度及びBAがいずれも向上したが、鼻腔がん及び細胞傷害性がんでは、感度は全記述子を利用した場合に比べて低下した。解析した全てのがんについて、「n126」セットを用いた場合のBAが最も高く、鼻腔がん、胃がん、膀胱・尿道がん、細胞傷害性がんでは、それぞれ0.779、0.846、0.714、0.709であった。

最後に、高いBAが得られた「n126」セットの記述子で一次ソース物質を選択したのち、インビトロ試験結果により最終ソース物質を選択してリードアクロスを実施した（図9）。その結果、鼻腔がんでは、インビトロ試験結果の利用による予測精度の向上は認められなかった。胃がんでは、単一の試験結果を用いた場合では精度の向上は認められなかったが、複数の試験を組み合わせることで、感度、特異度、BAの向上が認められた。膀胱・尿道がんでは、LDHアッセイとGSHアッセイを組み合わせ使用した場合、特異度に影響を与えることなく感度とBAが向上した。細胞傷害性がんでは、インビトロ試験結果の利用により、感度とBAが向上した。LDHアッセイとCellTiterアッセイを組み合わせ使用した際に最も高い感度とBAが得られた。

全体として、図7に示した全分子記述子を用いた場合に比べると、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の大きな向上には繋がらなかったが、概ね精度が向上する傾向は認められた。これは、がんに関連する分子記述子を選択することで、分子記述子のみを用いたリードアクロスにおいても0.7~0.8程度のBAが得られたことによると考えられる。

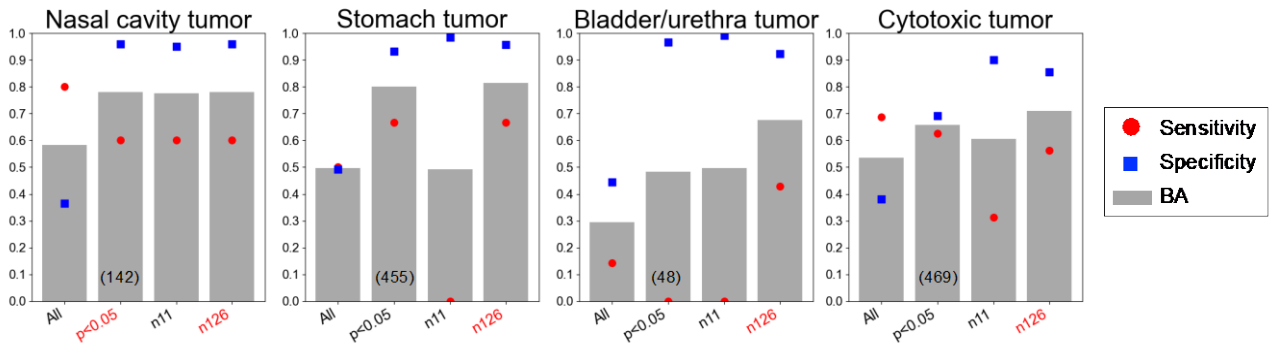


図8 各分子記述子セットを用いたリードアクロス結果

横軸は記述子のセットを示す。内容は本文に記載した。最も高いBAを示したセットを赤字で示した。

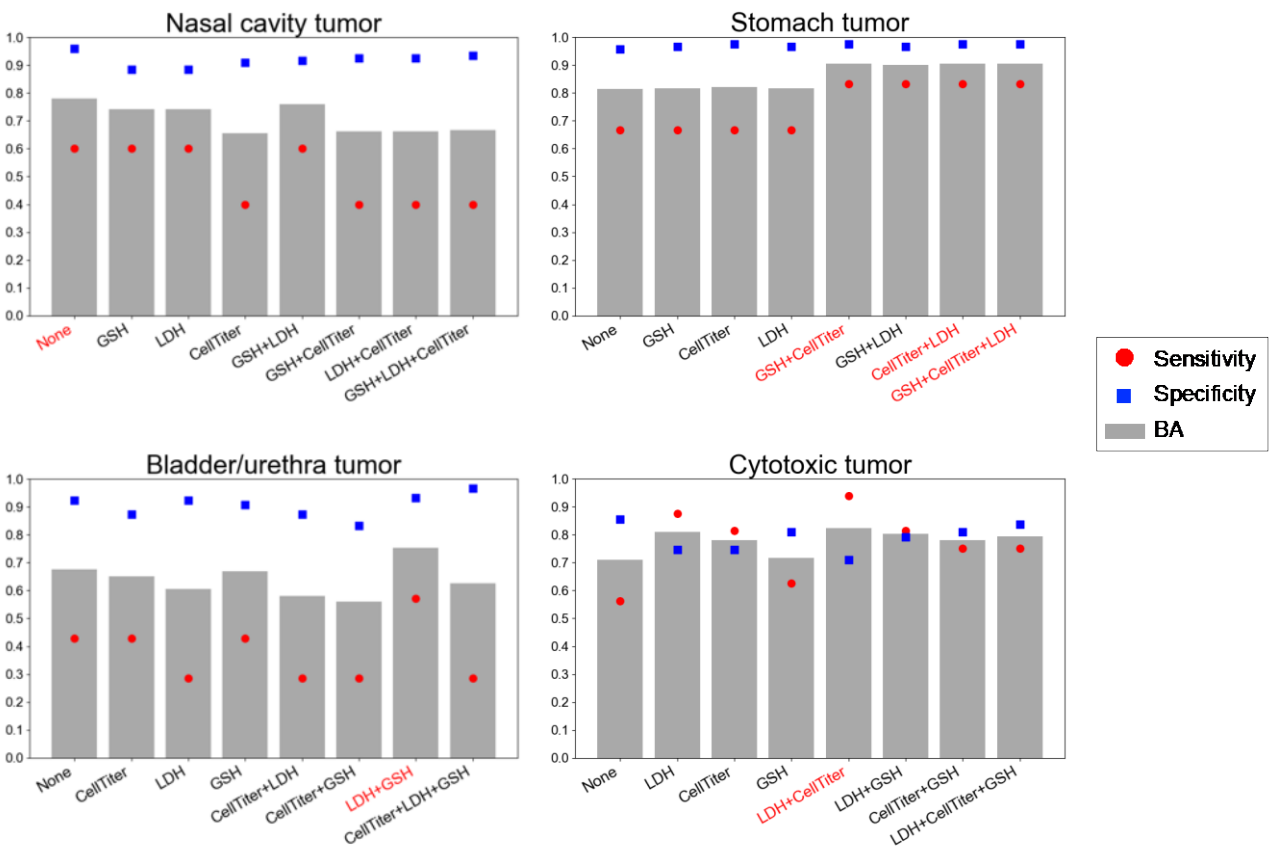


図9 選択した分子記述子セット及びインビトロ試験結果を利用したリードアクロス結果

横軸はインビトロ試験の種類（Noneは分子記述子のみ）を示す。最も高いBAが得られた条件を赤字で示した。

ii) 肝がん

次に肝がんを対象とした解析を行った。肝がん陽性物質数は126物質中32物質（陽性率25.4%）であった。

齧歯動物の肝発がんには、核内受容体CARやPPAR α 、AHRの寄与が知られている。本研究では、PPAR α 及びAHRに対する活性化作用をレポーターアッセイ又はワンハイブリッドアッセイにより評価し、またこれらの代表的な標的遺伝子であるCyp4a1及びCyp1a1の発現に対する被験物質の影響を、

肝細胞の mRNA レベル変化を指標として測定した。また、核内受容体 CAR に関してはレポーターアッセイでの評価が困難であることが知られていることから、その標的遺伝子である *Cyp2b1* の mRNA レベルを測定し、さらに *Cyp2b1* は PXR や PPAR α による制御も受けることからそれらの影響を考慮した指標 (mRNA レベル比) も計算し、説明変数として使用した。表 4 や表 5 で示したように、統計学的解析により、肝がんと *Cyp2b1* mRNA レベルに関する指標との間に有意な差が認められ、今回用いた農薬による肝発がんには CAR の寄与が大きいことが示唆された。

まず、細胞傷害性がんと同様の手法 (図 6) によるリードアクロスを試みた。alvaDesc で計算された 2297 分子記述子を最小値が 0、最大値が 1 になるように正規化し (Min-Max 正規化)、全物質間の相対的なユークリッド距離を算出した。次に、全物質ペア (7857 ペア) の相対距離の第一四分位の値を類似性の閾値として設定し、各物質について閾値内に存在する物質を類似物質 (ソース物質) として選定した。得られたソース物質中の発がん性陽性率が、データセットの肝がん陽性率 (25.4%) を上回った場合、被験物質を発がん性陽性と判定した。この作業を全 126 物質について実施し、予測結果の正誤を基に、感度、特異度、一致率、BA を算出し、予測精度の指標とした。

インビトロ試験の変数については、①Fisher の正確確率検定の *P* 値の上位の変数を用いる方法 (条件「P-value」)、②ブートストラップ法により肝発がんの予測モデルを構築し、予測への寄与度の上位の変数を用いる方法 (条件「Contribution」、の 2 通りで、それぞれ 3 変数を選択した。その結果、①では「*Cyp2b1/Cyp4a1* mRNA ratio (>40)」(変数#1)、「*Cyp2b1* mRNA (>2.5)」(変数#2)、「*Cyp2b1/Cyp3a1* mRNA ratio (>2.5)」(変数#3) の 3 変数、②では「*CYP2b1* mRNA (>2.5)」、「*CYP2b1/CYP4a1* mRNA ratio (>40)」、「ER α (agonist)」(変数#4) の 3 変数が選択され、*Cyp2b1/Cyp4a1* mRNA ratio (>40) 及び *Cyp2b1* mRNA (>2.5) は共通していた。

リードアクロスにインビトロ試験を用いる場合には、分子記述子で選択したソース物質 (一次ソース物質) のうち、① 1 ~ 3 種のインビトロ試験結果 (陽性・陰性) が被験物質と完全に一致する物質のみをソース物質 (最終ソース物質) として用いる場合 (以下、条件「Match」)、② 3 変数のうちの 2 変数の組み合わせのうち、いずれかが陽性であれば陽性、いずれも陰性であれば陰性と判断して最終ソース物質を選択する場合 (以下、条件「Partial Match」)、の 2 通りで予測を行った。結果を図 10 に示した。

Match の条件においては、分子記述子のみを用いた場合に比べて、P-value 条件で選択した 3 つのインビトロ変数はいずれも特異度と BA を改善させ、*Cyp2b1* mRNA (>2.5) と *Cyp2b1/Cyp3a1* mRNA ratio (>2.5) を組み合わせてソース物質を選択した場合に最も高い BA が得られた。Contribution 条件のみで選択された ER α (agonist) では、特異度の向上は認められたが、感度や BA の向上は認められなかった。

Partial Match 条件では、分子記述子のみを用いた場合に比べて、P-value 条件と Contribution 条件で選択された試験結果を利用することで特異度と BA が向上した。*Cyp2b1/Cyp4a1* mRNA ratio (>40) と *Cyp2b1/Cyp3a1* mRNA ratio (>2.5) の組み合わせ、*Cyp2b1* mRNA (>2.5) と ER α (agonist) の組み合わせで 0.6 程度の BA が得られ、特異度は前者の組み合わせで、感度は後者の組み合わせで高かった。

Match 条件と Partial Match 条件の結果を比較すると、前者では特異度の大きな向上が認められたが、多くの場合感度は低下した。一方で、後者では特異度の向上は大きくないものの、感度をほとんど低下させないケースが多かった。

以上、*Cyp2b1* mRNA レベル、すなわち CAR 活性化の指標を利用してソース物質を選択することでリードアクロスによる肝がん予測の精度が向上することが明らかとなり、当初の仮説を実証することができた。

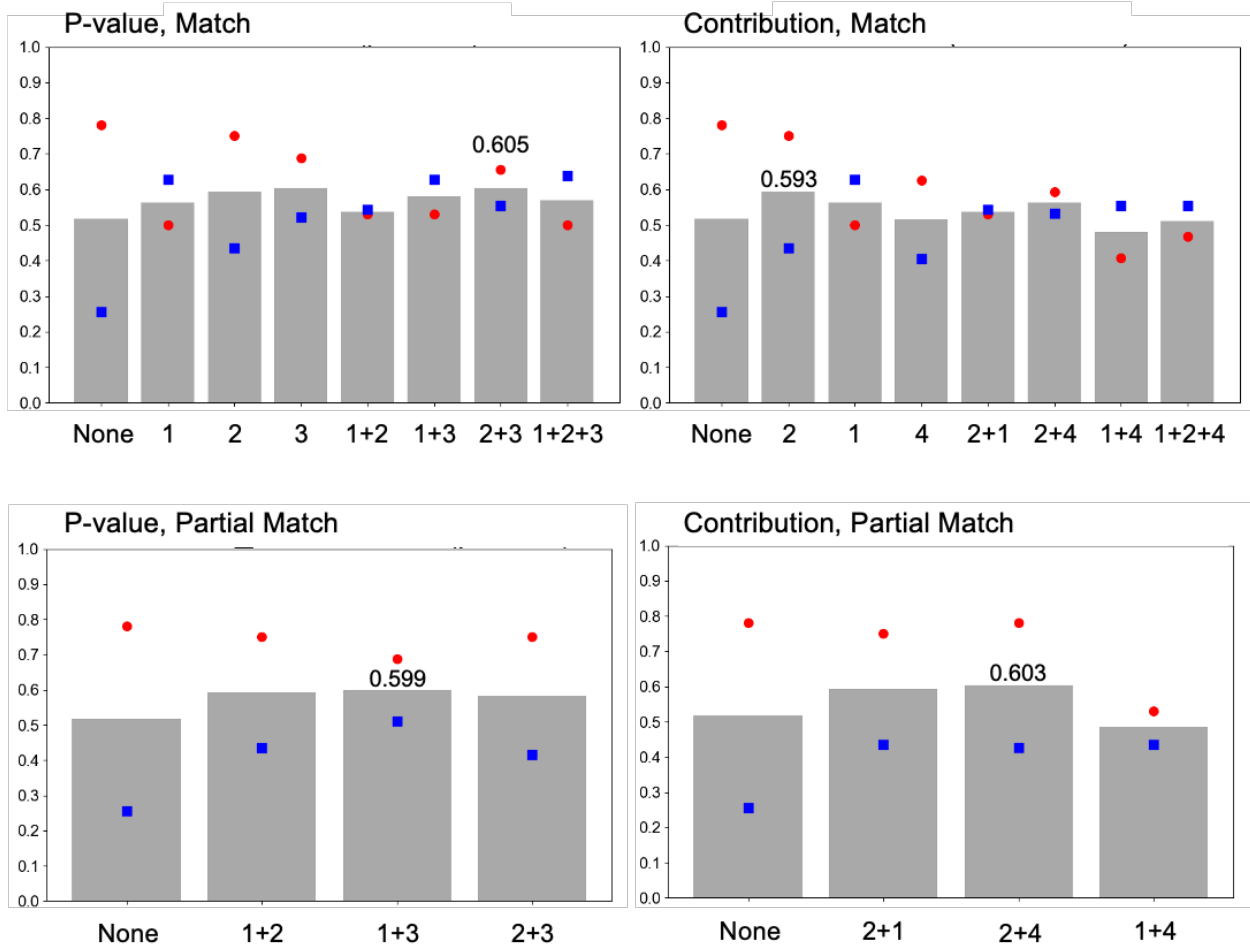
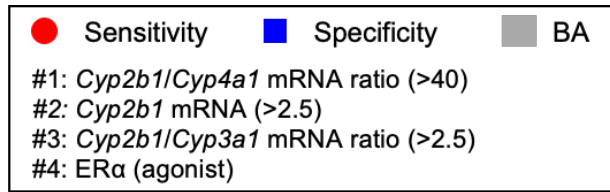


図10 分子記述子とインビトロ試験結果を利用した肝がんのリードアクロスによる予測

横軸の数字はインビトロ試験番号を、None は分子記述子のみを用いた結果を示す。各条件で最も高いBA を示した試験結果（の組み合わせ）をバーの上にBA 値を付して示した。各条件（P-value、Contribution、Match、Partial Match）は本文に記載した。

iii) 甲状腺がん

最後に甲状腺がんを対象とした解析を行った。甲状腺がん陽性物質数は 126 物質中 34 物質（陽性率 27.0%）であった。

齧歯動物における化学物質による甲状腺がんは、主に酵素誘導による甲状腺ホルモンの代謝亢進、その代償反応としての甲状腺刺激ホルモンの発現亢進と甲状腺濾胞上皮細胞の増殖に起因すると考えられている。そこで、酵素誘導に関わる転写因子（AHR、PPARα、PXR）の活性化作用、その標的遺伝子（*Cyp1a1*、*Cyp2b1*、*Cyp3a1*、*Cyp4a1*）の mRNA レベル変動をインビトロ試験にて評価した。

Fisher の正確確率検定による関連性解析の結果、予期した通り、甲状腺がんと PXR 活性化、PXR 標的遺伝子 *Cyp3a1* の mRNA レベル上昇、CAR 標的遺伝子 *Cyp2a1* の mRNA レベル上昇、PPARα 標的

遺伝子 *Cyp4a1* の mRNA レベル上昇などとの関連が認められた。今回用いた農薬による甲状腺がんは、これら受容体の活性化によるものが多いことが示唆された。

これらの結果を踏まえて、肝がんと同様の手法によるリードアクロスを試みた。分子記述子による物質間距離の計算、一次ソース物質の選択、精度指標の計算は上述の通りである。インビトロ試験の選択についても、肝がんの場合と同様に、①Fisher の正確確率検定の *P* 値の上位の変数を用いる方法（条件「P-value」）、②ブートストラップ法により肝発がんの予測モデルを構築し、予測への寄与度の上位の変数を用いる方法（条件「Contribution」）、の2通りでそれぞれ3変数を選択した。その結果、①では「*Cyp2b1* mRNA (>10)」(変数#1)、「*Cyp3a1* mRNA (>2.5)」(変数#2)、「PXR activation」(変数#3)の3変数、②では「*Cyp3a1* mRNA (>2.5)」(変数#2)、「PXR activation」(変数#3)、「*Cyp4a1* mRNA (>2.5)」(変数#4)の3変数が選択された。共通して選択された *Cyp3a1* mRNA (>2.5)と PXR activation は分子機序としては類似した指標であるが、*Cyp2b1* mRNA (>10)や *Cyp4a1* mRNA (>2.5)はこれらとは異なる標的分子に対応するものであり、複数の機序による酵素誘導を加味した評価が期待された。これらの試験結果を用いる場合には、上述の「Match」及び「Partial Match」の条件で最終ソース物質の選択を行った。結果を図 11 に示した。

Match 条件においては、分子記述子のみを用いた場合に比べて、P-value 条件で選択した3つのインビトロ試験結果の追加はいずれも特異度と BA を改善させ、*Cyp2b1* mRNA (>10)を用いて選択した場合には、感度、特異度、BA のいずれも上昇した。さらに *Cyp2b1* mRNA (>10)に PXR activation の結果を加えた場合に最も高い BA が得られ、0.716 であった。Contribution 条件で選択された *Cyp4a1* mRNA (>2.5)を用いた場合にも感度、特異度、BA のいずれも上昇し、特に感度は *Cyp2b1* mRNA (>10)を用いた場合と同じく 0.8 を超えた。

Partial Match 条件においては、分子記述子のみを用いた場合に比べて、P-value 条件と Contribution 条件で選択された試験結果を利用したいずれの組み合わせにおいても、特異度と BA が向上し、P-value 条件で選択された試験の組み合わせでは感度の向上も認められ、0.8 を超えた。最も高い BA が得られたのは、*Cyp2b1* mRNA (>10)と *Cyp3a1* mRNA (>2.5)を組み合わせ用いた場合であり、BA は 0.694 であった。この値は Match 条件で得られた値に比べると若干劣っていた。

Match 条件と Partial Match 条件の結果を比較すると、肝がんに比べて両者の間に差はほとんどなく、インビトロ試験結果を利用した多くの場合で、感度と特異度が共に上昇していた。

以上、薬物代謝酵素誘導と関連するインビトロ試験結果を利用してソース物質を選択することでリードアクロスによる甲状腺がん予測の精度が向上することが明らかとなり、当初の仮説を実証することができた。

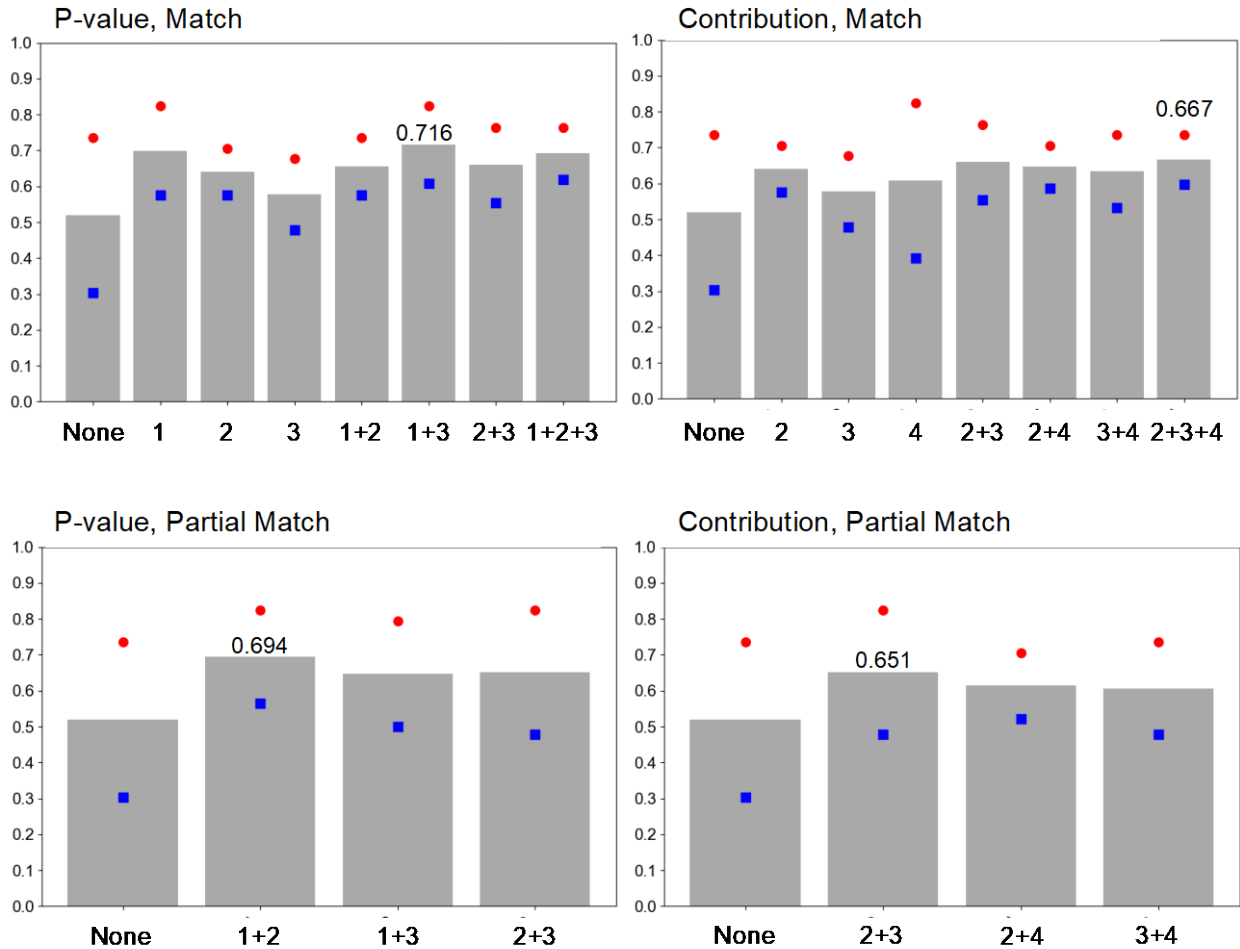
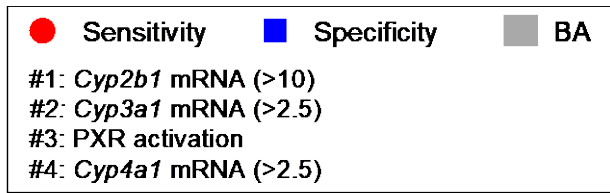


図11 分子記述子とインビトロ試験結果を利用した甲状腺がんのリードアクロスによる予測
 横軸の数字はインビトロ試験番号を、None は分子記述子のみを用いた結果を示す。各条件で最も高いBA を示した試験結果の組み合わせをバーの上にBA 値を付して示した。各条件 (P-value、Contribution、Match、Partial Match) は本文に記載した。

3 研究項目：発がん性リスク評価及び機序推定に有用な試験の提案

(1) 個別課題：発がん性リスク評価及び機序推定に有用な試験の提案（吉成浩一（静岡県立大学）、竹下潤一（産業技術総合研究所））

本研究では、非遺伝毒性発がん性をリードアクロス手法で予測する手法を確立するため、農薬のラット発がん性試験結果を活用して被験物質と解析対象のがんを決定し、それらがんの発症機序に関連するインビトロ試験を実施した。そして、統計学的手法による発がん性とインビトロ試験結果の関連性解析により、細胞傷害性関連がん（鼻腔がん、胃がん、膀胱・尿道がん）と細胞傷害関連試験結果、肝がんと核内受容体 CAR 活性化に関連する試験結果（*Cyp2b1* mRNA レベル）、甲状腺がんと酵素誘導に関連する試験、などの間に有意な関連性が認められた（表 12）。これらの結果は、発がん機序を踏まえると妥当なものであり、おおよそ期待された結果であった。そこで、これらの統計学的に関連性が認められたインビトロ試験をソース物質の選択に活用した。具体的には、分子記述子に基づく化学構造の類似性を指標として一次ソース物質を選択し、次いで単独又は複数のインビトロ試験結果の一致・部分一致に基づいて最終ソース物質を選択し、リードアクロスを実施した。そして、インビトロ試験結果を活用したソース物質の選択がリードアクロスによる発がん性予測の精度を向上させるか否かを解析した。得られた結果を表 12 にまとめた。本研究結果より、今回解析を実施した 5 種類のがんについては、いずれにおいても発がん機序と関連するインビトロ試験を利用してソース物質を選択することでリードアクロスの精度が向上することが明らかになった。したがって、表 12 に示す各種インビトロ試験を利用することで、これら臓器の非遺伝毒性発がん性予測の精度向上が期待される。

図 7、図 9～図 11 の結果から、化学構造情報（分子記述子）のみを用いた場合にもある程度の感度が得られる場合があったが、一般に特異度は低かった。これは非発がん性物質の構造は様々であることから当然の結果と考えられる。本研究により、発がん機序と関連するインビトロ試験結果を利用してソース物質を選択することで、多くの場合特異度が大きく向上することも明らかになった。その精度はまだ十分とは言えないものの、発がん機序関連試験を用いたリードアクロスは、陰性物質の判定にも有用と考えられる。

さらに、細胞傷害性関連がんに関する解析により、分子記述子を利用してソース物質を選択する際には、発がん性と関連する分子記述子を統計学的手法で選択して物質間距離を計算することで、リードアクロスの精度が向上することも明らかになった（図 8）。リードアクロスにおける毒性予測においては、既存の分子記述子セットやフィンガープリントについて、毒性との関連を考慮して事前に変数を選択することが精度向上に有用と考えられる。

表 12 発がん性予測のためのリードアクロスにおけるインビトロ試験の有用性に関するまとめ

がん	統計学的関連性が認められた試験*	最も高いBAを示した試験**	最も高い感度を示した試験**
鼻腔がん	<ul style="list-style-type: none"> LDH assay (W) GSH assay (W) <u>ERα (antagonist) (F/W)</u> <u>ERβ (antagonist) (F)</u> 	<ul style="list-style-type: none"> LDH assay + GSH assay 	<ul style="list-style-type: none"> None LDH assay GSH assay LDH assay + GSH assay
胃がん	<ul style="list-style-type: none"> LDH assay (W) GSH assay (F/W) <u>ERα (antagonist) (F/W)</u> 	<ul style="list-style-type: none"> LDH assay + CellTiter assay + GSH assay 	<ul style="list-style-type: none"> LDH assay CellTiter assay GSH assay LDH assay + CellTiter assay CellTiter assay + GSH assay LDH assay + GSH assay LDH assay + CellTiter assay + GSH assay
膀胱・尿道がん	<ul style="list-style-type: none"> <u>AHR activation (F)</u> <u>ERα (agonist) (W)</u> <u>CYP2D1 inhibition (W)</u> 	<ul style="list-style-type: none"> LDH assay + CellTiter assay + GSH assay 	<ul style="list-style-type: none"> CellTiter assay
細胞傷害性がん	<ul style="list-style-type: none"> LDH assay (F) CellTiter assay (F) <u>ERα (antagonist) (F/W)</u> <u>ERβ (antagonist) (W)</u> 	<ul style="list-style-type: none"> LDH assay + CellTiter assay + GSH assay 	<ul style="list-style-type: none"> LDH assay LDH assay + CellTiter assay LDH assay + GSH assay CellTiter assay + GSH assay LDH assay + CellTiter assay + GSH assay
肝がん	<ul style="list-style-type: none"> <u>RXRα activation (W)</u> <i>Cyp2b1</i> mRNA (F/W) <i>Cyp2b1/Cyp3a1</i> mRNA ratio (F/W) <i>Cyp2b1/Cyp4a1</i> mRNA ratio (>40) (F) 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Cyp2b1</i> mRNA (>2.5) + <i>Cyp2b1/Cyp3a1</i> mRNA ratio (>2.5) 	<ul style="list-style-type: none"> None <i>Cyp2b1</i> mRNA (>2.5) + ERα (agonist)
甲状腺がん	<ul style="list-style-type: none"> PXR activation (F/W) <u>PR (antagonist) (F)</u> <i>Cyp2b1</i> mRNA (F/W) <i>Cyp2b1/Cyp4a1</i> mRNA ratio (F/W) <i>Cyp2b1/Cyp3a1/Cyp4a1</i> mRNA ratio (F) <i>Cyp3a1</i> mRNA (F/W) <i>Cyp4a1</i> mRNA (F/W) <u>CYP1A1 inhibition (F)</u> <u>CYP2C6 inhibition (F)</u> 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Cyp2b1</i> mRNA + PXR activation 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Cyp2b1</i> mRNA <i>Cyp2b1</i> mRNA + PXR activation <i>Cyp2b1</i> mRNA + <i>Cyp4a1</i> mRNA <i>Cyp2b1</i> mRNA + <i>Cyp3a1</i> mRNA <i>Cyp4a1</i> mRNA + PXR activation

*F : Fisher の正確確率検定、W : Wilcoxon の順位和検定。下線は予期しなかった試験結果。

**鼻腔がん、胃がん、膀胱・尿道がん、細胞傷害性がんに関しては、図7の結果に基づいて記載した。

4 研究全体の成果、考察及び結論

本研究では、農薬による非遺伝毒性発がん機序に基づくがんのうち、ラット発がん性試験で高頻度で認められる肝がん及び甲状腺がん（表1）を含む9種のがんについて、発がん機序関連インビトロ試験結果を利用したリードアクロスによる予測を試みた。

被験物質は、農薬評価書においていずれかの臓器でがんを生じた80物質と発がん性を示さなかった46物質の合計126物質とした（表2）。これらに関して発がん機序と関連するインビトロ試験を実施して、表3に示す28の指標を得た。その後、試験結果と発がん性の関連性を統計学的に解析し、鼻腔がんや胃がん、肝がん、甲状腺がんにおいて予想された組み合わせを複数得ることができ（表4、表5、表12）、設定した試験の妥当性が示された。一方で、膀胱・尿道がんや生殖器関連がんでは期待された結果は得られなかった。これは発がん性陽性物質数が少なかったことが一因と考えられる。ただし、膀胱・尿道がんについては、その発がん機序と関連すると考えられる細胞傷害性試験が有用であることが示された。

これらの基本的な実験及び解析結果を踏まえて、5種のがん（鼻腔がん、胃がん、膀胱・尿道がん、肝がん、甲状腺がん）並びに細胞傷害性と関連すると考えられる鼻腔がん、胃がん及び膀胱・尿道がんをまとめた「細胞傷害性がん」を対象としてリードアクロスを実施した。細胞傷害性関連がんでは、細胞傷害性関連試験（LDH アッセイ、CellTiter アッセイ及び GSH アッセイ）を使用し、肝がん及び甲状腺がんでは、機序が複雑で必ずしも解明されていないことから、統計学的手法によりインビトロ試験を選択して解析した。

その結果、いずれのがんにおいても、程度には差があるものの、化学構造情報のみに基づいて選択したソース物質を用いた場合に比べて、インビトロ試験結果を踏まえてソース物質の絞り込みを行った場合に、リードアクロスによる発がん性（感度）及び非発がん性（特異度）の予測精度が向上することが示された（図7、図10、図11）。以上の結果から、リードアクロスによる非遺伝毒性発がん性の予測においては、発がん機序関連インビトロ試験の活用が有用であるという本研究の作業仮説が実証された。

本研究では、データセットとして選択した126物質全てについて、残りの125物質をソース物質の候補とする網羅的な解析を実施した（図6）。データセットには多くの非発がん性物質が含まれることから、本研究の解析では、発がん性物質だけでなく、非発がん性物質の予測も行っている。本研究結果から、インビトロ試験結果に基づくリードアクロスでは、多くのケースで特異度が大幅に向上することが明らかになった。これは、非発がん性物質には構造的特徴はなく、化学構造情報からリードアクロスにより非発がん性を予測することは困難であるため、化学構造情報のみを用いた場合の特異度が必然的に著しく低かったことも一因と考えられる。発がん機序関連試験は、発がんに関連する発がん性物質の特徴を捉える試験であり、これらの試験を実施することで発がん性の特徴を有する物質と有しない物質のグルーピングが可能になると考えられる。すなわち、試験陽性物質を除くことで結果的に構造的に特徴のない非発がん性物質をソース物質として集めることができたために、発がん機序関連試験結果を用いることで特異度が向上したと考えられる。

細胞傷害性がんにおいては、LDH アッセイ、CellTiter アッセイ及び GSH アッセイの3つの試験を利用したが、これらを単独で用いるよりも組み合わせて用いた場合に高い精度が得られる場合が多かった（図7、図9）。用いた3つの試験はいずれも細胞傷害性と関連するものであるが、それぞれ細胞膜傷害性、細胞内 ATP レベル、高分子反応性という異なる原理に基づくものである。実際、これら試験の陽性物質は類似しているものの、完全には一致していない。よって、評価のための時間やコスト

トは増すが、ある1つの現象（ここでは細胞障害・細胞傷害）について複数の指標で評価することが重要であると考えられる。

細胞傷害性がんにおいては、発がん物質の化学構造が類似していたことから、分子記述子を選択することで分子記述子のみのリードアクロスの精度も向上するのではないかと考え、検討を行った。その結果、予期した通りに、Wilcoxonの順位和検定においてP値が小さかった記述子を選択することで、リードアクロスの精度は向上し、n126セットの記述子を利用した場合には4種のがんのBAは0.71~0.85となった（図8）。この結果は、リードアクロスにおけるソース物質の選択においては、発がん機序関連試験結果による選択が有用であることと同様に、発がん性と関連する化学構造情報の選択も有用であることを示唆している。分子記述子やフィンガープリントが化学構造の類似性評価に活用されるが、既存のセットを漠然と使用するのではなく、発がん性や他の臓器毒性と関連する指標を予め選択することで、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の精度が向上することが期待される。本研究では、発がん性と関連する分子記述子で選択したソース物質からさらに細胞傷害性関連試験でソース物質を絞り込んだところ、鼻腔がんでは精度の向上は認められなかったが、他の3つのがんでは精度の向上が認められた（図9）。

遺伝毒性においては、関連する部分化学構造などが多く同定され、それらの情報を利用したインシリコ予測手法の開発が進んでいるが、非遺伝毒性発がんではそのような知見は少ない。本研究の主目的とは異なるため、これ以上の解析を実施しなかったが、今回作成したデータセットを用いた解析により、各がんと関連する物理化学的特徴（物性や部分化学構造）を明らかにできる可能性もあると考えている。

最後に本研究の課題を考察する。1つ目の課題は、本研究では外部検証を実施していないことである。研究開始時に使用したデータセットは、2019年時点での農薬評価書を利用して吉成らが収集したラット発がん性試験結果に基づいて作成した。そのためそれ以降に公開された農薬評価書を利用して外部検証を実施することを計画していたが、新規に試験結果が報告された農薬数は40程度であり、農薬評価書の試験結果を確認したところ、発がん性を示す物質はほとんどなかった。そのため、本研究では外部検証を実施できなかった。今後、他のデータベース等を参照して、本研究で得られた結果の検証を行いたいと考えている。

2つ目の課題は予測精度である。肝がん及び甲状腺がんにおいては、インビトロ試験結果の活用によりリードアクロスの精度は向上したが、その精度は必ずしも十分でなく、得られた最も高いBAは、肝がんでは0.605、甲状腺がんでは0.716であった（図10、図11）。

化学物質による肝がんは多様な機序により起こることが知られているが、農薬においては核内受容体のCARの寄与が大きいことがこれまでの農薬評価書における発がん機序研究より推察された。CARは活性化作用をレポーターアッセイ等で評価することは困難であることから、本研究では、ラット肝細胞におけるCAR標的遺伝子のmRNAレベルを代替の指標として測定した。統計学的な解析では、肝がんとCyp2b1 mRNAレベル関連の指標の間に有意な関連性が認められたことから（表12）、この評価は妥当であると考えられたが、本指標を用いたソース物質の選択では、特異度の大幅な上昇とそれに伴うBAの増加は認められたが、感度の上昇は認められなかった（図10）。この原因の一つに、化学構造情報だけを用いたリードアクロスにおいても感度が0.8程度あったことが挙げられる。これは、本データセット内の肝発がん性物質の多くがCAR活性化物質であり、構造が類似していたためにデータセット内での予測精度が高くなったためではないかと考えている。今回の研究では、統計学的に発がん性と関連するインビトロ試験結果を選択したが、今後はAOPなどの情報を参考として、肝発がんと関連すると考えられる全てのインビトロ試験結果を用いたリードアクロスの検討も行いたい。

ただし、複数の試験結果を利用する場合には、変数の重み付けも含めて、被験物質との一致度の判断方法についても種々の条件を検討する必要がある。本研究において試験結果を3つ程度としたが、これは、より多い試験結果を用いた場合の一致度判定が非常に複雑となると考えられたためである。

齧歯動物における甲状腺がんは、甲状腺ホルモン代謝酵素（主にUDP-グルクロン酸転移酵素）の発現亢進とそれに伴う甲状腺刺激ホルモンの産生亢進、甲状腺濾胞上皮細胞の過剰な増殖に基づくと考えられている。そこで、酵素誘導に関わる核内受容体やその標的遺伝子の発現変動が有用な指標になると考え、評価したところ、甲状腺がんに関連する指標として、PXR活性化とその標的遺伝子 *Cyp3a1* の mRNA レベル、CAR 標的遺伝子 *Cyp2b1* の mRNA レベル、PPAR α 標的遺伝子 *Cyp4a1* の mRNA レベルが選択された（表 12）。興味深いことに、これらはいずれも酵素誘導に関わるが、異なる機序に基づく指標である。そして、リードアクロスの結果から、これらの指標を単独で用いるよりも、組み合わせ使用したほうが高い精度が得られることが明らかになった。複数の発がん機序が考えられる場合には、できる限りその機序を網羅することで予測精度は向上すると考えられるが、本研究結果はこの考え方に合致する。しかしながら、2つ又は3つの試験を組み合わせただけの場合においても、感度は 0.82、BA は 0.72 が最高であり、必ずしも機序を網羅できていない可能性がある。PR アンタゴニスト活性や CYP1A1 阻害など、予期しなかった関連性が認められたインビトロ試験結果があったことから（表 12）、今後これらの指標を活用したリードアクロスについても検討したい。ただし、多数の変数を利用する場合には上述の通りその利用方法の検討も必要となる。

以上、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おいて、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、さらにその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。一方で、発がん機序が必ずしも明確になっていない肝がんなどにおいては、機序を網羅した試験を設定することが困難であることから、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。

Ⅲ 本研究を基にした論文等

1 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト

なし

2 本研究を基にした学会発表の実績

- 1) 吉成浩一：全身毒性評価のための客観的リードアクロス手法の開発、第50回日本毒性学会学術年会、2023年6月19日～21日、横浜市（招待講演）
- 2) Kosuke Mizuno, Yu Harakawa, Takuomi Hosaka, Ryota Shizu, Jun-ichi Takeshita, Kouichi Yoshinari: Read-across-based Prediction for the Non-genotoxic Carcinogenicity of Chemicals Using Molecular Descriptors and in vitro Assays, 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 2023年8月27日～31日, Niagara Falls, Ontario, Canada（ポスター発表）
- 3) 水野航介、原川ゆう、竹下潤一、保坂卓臣、志津怜太、吉成浩一：リードアクロスによる化学物質の非遺伝毒性発がん性予測におけるインビトロ試験データの有用性、第50回日本毒性学会学術年会、2023年6月19日～21日、横浜市（ポスター発表）
- 4) 吉成浩一：反復投与毒性・発がん性予測のための客観的なリードアクロス手法の開発に向けて、日本動物実験代替法学会第36回大会、2023年11月27日～29日、千葉市（招待講演）

3 特許権等の出願・申請等の状況

なし

4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物

なし

5 その他（各種受賞、プレスリリース等）

なし

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 発がん性・非発がん性農薬を発がん機序関連インビトロ試験に付す。そして、得られた結果とインビボ発がん性情報の統計学的解析を行い、各臓器・組織がんと機序関連インビトロ試験との関連性を明らかにする。	5	計画していたデータベースの構築並びにインビトロ試験を実施することができた。鼻腔がん、胃がん、肝がん、甲状腺がん、さらには本研究で設定した細胞傷害性がんにおいて、発がん性とインビトロ試験結果との間に予期した関連性が認められ、リードアクロスを実施するために十分なデータが得られた。
(2) (1) のインビトロ試験結果及び化学構造情報を用いて、数学的・統計学的アプローチによる物質間距離の設定を行い、発がん性評価のためのリードアクロス手法を確立する。	5	鼻腔がん、胃がん、膀胱・尿道がん、細胞傷害性がん、肝がん、甲状腺がんについて、化学構造情報に基づく物質間距離によりソース物質を選択し、次いでインビトロ試験結果の一致に基づいてソース物質の絞り込みを行う、2段階のリードアクロスを実施した。解析したいずれのがんにおいても、インビトロ試験結果を利用したソース物質の絞り込みがリードアクロスの精度を向上させることを示すことができた。
(3) (1) 及び(2) で得られた研究成果を基に、各臓器・組織がんのリスク評価や機序推定に有用な試験セット及び物性情報を提案する。	5	(1) で示した統計解析、並びに(2) で示したリードアクロスの結果より、各がんの予測において有用なインビトロ試験を明らかにすることができた。また、物質間の類似性評価に使用する物理化学的指標についても発がん性との関連により選択することが有用であることを明らかにした。細胞傷害性関連がんに関しては現在論文投稿中であり、肝がん及び甲状腺がんの結果についても今年度内の論文公表を目指して準備中である。今後、学会発表や論文発表を通して、提案した手法の公開を目指す。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	非遺伝毒性発がん性のリードアクロスを利用した予測において、発がん機序と関連するインビトロ試験結果に基づくソース物質の選択が有用であることを示すことができた。リードアクロス結果の精度は必ずしも高くない

		<p>こと、生殖器関連がんでは有用な指標がなかったことなどの課題は残ったが、今後のさらなる研究につながるデータセットを得ることができたことから、研究目標は概ね達成できたと考えている。</p>
(2) 研究成果の有用性	5	<p>世界的に動物実験に依らない化学物質の安全性評価手法、いわゆる New Approach Methodologies (NAMs) の開発が求められており、近い将来そのような手法に基づく健康影響評価が我が国においても必要になると考えられる。そのような背景において、既存の毒性試験情報を活用するリードアクロスは、農薬等の食品中化学物質の安全性評価において非常に注目されている。しかし、どのような毒性エンドポイントや物質群に利用可能であるのかは明確でなく、また、ソース物質の選択方法、物質間の類似度の指標の種類と判定方法など、検討すべき項目が多く残されている。そのため、国内外で多くのケーススタディが実施されている。我が国ではリードアクロス研究の実績が少ないことから、本研究成果を関係者間で共有して議論することは、我が国におけるNAMsを用いた化学物質の安全性評価において、化学物質開発とその規制の両観点から有用であると考えている。また、本研究の解析結果は、発がん性機序解明においても重要な知見を提供すると考えている。</p>
<p>総合コメント</p> <p>本研究では、非遺伝毒性発がんのリードアクロスによる予測においてインビトロ試験結果を活用したソース物質の選択が有用であることを実証できた。限られた被験物質、がん種を対象とした解析であるが、インシリコ及びインビトロ情報を活用したリードアクロス研究として貴重な研究成果を提供できたと考えている。また、本研究の実施により、このようなアプローチの課題も見えてきたことから、今後の類似研究、さらにはリードアクロスの規制応用において、議論のきっかけを提供できたと思われる。今後は得られた成果を学会や論文として公表し、その過程で議論を行うことで、本手法をさらに発展させることができると考えている。</p> <p>以上のように、研究がほぼ計画通りに進捗し、期待された成果が得られたことから、上記の自己評価とした。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。
本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。

りません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。

(別添1)

研究成果の概要 (和文)

ラット2年間がん原性試験で非遺伝毒性発がん性を示した80農薬と示さなかった46農薬を被験物質とした。これらを細胞毒性、生体異物及びホルモン応答性核内受容体の活性化、肝酵素誘導等の発がん機序と関連する各種インビトロ試験に付した。統計学的手法によりインビトロ試験と発がん性の関連性を解析した。これらの結果を踏まえ、本研究では5種のがん(鼻腔、胃、膀胱・尿道、肝、甲状腺)を解析対象として選定した。また、鼻腔、胃、膀胱/尿道のがんをまとめた「細胞傷害性がん」を定義し、解析対象とした。

リードアクロスは以下の通り実施した。2297種の分子記述子を計算し、これを利用して全物質間の距離を計算した。そして、各被験物質と距離が近い物質を一次ソース物質として選択した。次に、一次ソース物質のうち、選択したインビトロ試験の結果が標的物質と一致したものを最終ソース物質として選択した。一次ソース物質又は最終ソース物質を用いてリードアクロスを行い、予測結果を比較した。その結果、解析した全てのがんについて、一次ソース物質を用いた場合に比べて、最終ソース物質を用いることで、発がん物質の予測精度(感度)と非発がん物質の予測精度(特異度)の両者が向上した。

以上、本研究により、発がん機序関連インビトロ試験の結果に基づいてソース物質を選択することは、リードアクロスによる非遺伝毒性発がん性予測の精度向上に有用であることが示唆された。

(別添2)

研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Development of novel prediction methods for non-genotoxic carcinogenicity of chemical substances
Research project number	JPCAFSC20222206
Research period	FY 2022 – 2023
Name of principal research investigator (PI)	Kouichi Yoshinari

Abstract/Summary

This study aimed to develop a read-across-based prediction system for the carcinogenicity of chemical substances. Here, “tumor” includes both benign and malignant tumors for ease of analysis and expression.

A total of 126 pesticides were selected, including 80 that caused tumors by anon-genotoxic mechanisms in rat 2-year carcinogenicity studies and 46 that did not, from the pesticide evaluation reports published by Food Safety Commission of Japan. These substances were subjected to various in vitro tests associated with mechanisms of carcinogenesis, including cytotoxicity, activation of xenobiotic- and hormone-responsive nuclear receptors, and hepatic enzyme induction, and a total of 28 parameters were obtained. We then statistically analyzed the relationship between carcinogenicity and the test results and confirmed that multiple tests are associated with tumors in the nasal cavity, stomach, liver, and thyroid gland as expected. Based on these experimental and analytical results, we selected five types of tumors (nasal cavity, stomach, bladder/urethral, liver, and thyroid tumors) as the targets of this study. We also defined “cytotoxicity-related tumors” as a sum of the nasal cavity, stomach, and bladder/urethral tumors.

We conducted a read-across for carcinogenicity prediction as follows: First, 2297 molecular descriptors were calculated, and relative distances were calculated between all the combinations of the test substances. Then, “primary source substances” were selected based on these distances for the 126 substances. Next, from the primary source substances, those that matched the target substance for the results of the statistically selected in vitro tests were further designated as the “final source substances.” With the primary source substances and the final source substances, the carcinogenicity of the target substance was predicted based on a read-across-based approach, and the prediction results were compared.

The results indicated that for all the tumors tested, although to different degrees, selecting source substances based on in vitro test results is more effective than using source substances selected based only on chemical structure information. The in vitro test-based selection improved the prediction accuracy of both carcinogenicity (sensitivity) and non-carcinogenicity (specificity) by read-across. These results have verified the working hypothesis of this study that selecting source substances based on the results of in vitro tests related to carcinogenesis mechanisms is useful in predicting carcinogenicity by read-across.

This report provides outcome of the captioned research programme funded by Food Safety Commission Japan (FSCJ). This is not a formal publication of FSCJ and is neither for sale nor for use in conjunction with commercial purpose. All rights are reserved by FSCJ. The view expressed in this report does not imply any opinion on the part of FSCJ.

1 . List of papers published on the basis of this research

None

2 . List of presentations based on this research

- 1) Kouichi Yoshinari: Development of an objective read-across method for the evaluation of systemic toxicity of chemical substances. The 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicology, June 19th - 21st, 2023, Yokohama, Japan.
- 2) Kosuke Mizuno, Yu Harakawa, Jun-ichi Takeshita, Takuomi Hosaka, Ryota Shizu, Kouichi Yoshinari: Utility of in vitro assay data in predicting non-genotoxic carcinogenicity of chemicals by read-across. The 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicology, June 19th - 21st, 2023, Yokohama, Japan.
- 3) Kosuke Mizuno, Yu Harakawa, Takuomi Hosaka, Ryota Shizu, Jun-ichi Takeshita, Kouichi Yoshinari: Read-across-based prediction for the non-genotoxic carcinogenicity of chemicals using molecular descriptors and in vitro assays. 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, August 27th - 31st, 2023, Niagara Falls, Ontario, Canada
- 4) Kouichi Yoshinari: Development of an objective read-across methodology for evaluating repeated-dose toxicity and carcinogenicity. The 36th annual meeting of the Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments, November 27th - 29th, 2023, Chiba, Japan.

3 . The number and summary of patents and patent applications

None

4 . Others (awards, press releases, software and database construction)

None