

平成 30～令和元年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

（※研究全体の期間（初年度及び2年目以降）について記載する。）

研究課題名 (研究項目名)	新規評価支援技術の開発に関する研究～毒性予測に向けたデータベースの活用方法の検討～（課題番号：1801） (3) 新たなリスク評価方法等の確立 (1) <i>in silico</i> 手法を用いた評価方法の確立に関する研究)
主任研究者	研究者名：頭金正博 所属機関：名古屋市立大学

## I 研究期間及び研究目的等

### 1 研究期間

平成 30 年度～令和元年度（2 年間）

### 2 研究目的

人工知能技術の目覚ましい発展に伴って、実験動物を用いる毒性試験の代替法として、既存の毒性試験情報を利用して化学物質の毒性を予測する *in silico* 評価手法が注目されている。*In silico* による動物実験代替法が化学物質のリスク評価において実用化されると、評価対象物質そのものに加えて、評価対象物質に含まれる不純物や、代謝によって生じる微量な化学物質の毒性評価にも応用できる可能性がある。しかし、化学物質のリスク評価において NOAEL 等の設定根拠となることが多い反復投与毒性試験での毒性所見は、メカニズムの複雑さ、化学構造の多様性、毒性試験情報不足等の問題があり、*in silico* 評価は毒性評価法としての実用化には至っていない。そこで、本研究では、反復投与毒性試験での *in silico* 評価に最適な毒性所見や、予測に必要なデータの質と量等を検討し、毒性データベースに追加すべき情報や評価支援ツールの特性を明らかにすることを目的とした。初めに HESS 等の毒性試験データベースを使用して、反復投与毒性試験の情報収集と特徴解析により *in silico* 評価のケーススタディが可能な毒性所見項目の抽出を行った。次に抽出した毒性所見項目について、機械学習を用いた (Q)SAR による毒性予測モデルの構築や統計的手法を利用した新規 *in silico* リードアクロス手法の開発を通してケーススタディを行った。最終的にこれらのケーススタディの結果から、反復投与毒性試験での *in silico* 毒性予測に適した毒性所見項目や予測に必要なデータ数等を検証することで、食品健康影響評価において不可欠な毒性データに関する情報や、評価支援ツールの活用法に資する情報を提供し、*in silico* 評価手法の確立に向けた戦略を提案した。

### 3 研究体制（※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。）

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
<i>In silico</i> 評価に最適化したデータベース	(1) 毒性所見項目の抽出 (2) <i>In silico</i> 評価用データセットの作成	頭金正博（名古屋市立大学） 吉成浩一（静岡県立大学）

スに必要な要件に関する検討		
(Q)SARとカテゴリーアプローチによるケーススタディ	(1) (Q)SAR手法による毒性予測 (2) カテゴリーアプローチによる毒性予測	頭金正博 (名古屋市立大学) 吉成浩一 (静岡県立大学)
<i>In silico</i> 評価に適した毒性データベースと評価支援ツールの検証	(1) 毒性データベースに必要な情報の検討 (2) 評価支援ツール活用方法の検討 (3) <i>In silico</i> 評価用データセットへのフィードバック	頭金正博 (名古屋市立大学)

#### 4 倫理面への配慮について

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実施しておらず、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。また、本研究では既存の公開されている非臨床試験データを用いたが、動物実験自体は実施していないため、実験動物の愛護に関して配慮が必要な研究には該当しない。

## II 研究内容及び成果等

### 1 研究項目名： *In silico* 評価に最適化したデータベースに必要な要件に関する検討

(1) 個別課題名：毒性所見項目の抽出 (頭金正博 (名古屋市立大学)、吉成浩一 (静岡県立大学))

ラットを対象とした化学物質の反復投与毒性試験データについて、独立行政法人製品評価技術基盤機構から公開されている有害性評価支援システム統合プラットフォーム (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform: HESS) ver. 3.7 を使用して毒性データを収集した。HESS には主に日本の化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) に基づき実施された既存化学物質の反復投与毒性試験情報が収録されているが、COSMOS や ToxRef などの由来が異なる試験データごとにサブデータベースとして分かれているため、今回は化審法既存化学物質や化審法新規物質の毒性試験情報が得られる HESS RDT のサブデータベースを使用した。また、HESS に収録されている毒性試験のほとんどが GLP に準拠しているため、試験情報の信頼性は保たれている。本研究では反復投与毒性試験において NOAEL の設定根拠として用いられることが多く、毒性学的に重要な所見と考えられる肝毒性、腎毒性、血液毒性に着目した。

初めに雄性ラットの 28 日間反復投与毒性試験と 42 日間反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験から得られた毒性所見項目について陽性物質数 (LOEL 値が得られたもの) を集計した (表 1)。表 1 では上位 20 項目を示しており、肝臓に関する所見が 7 項目、腎臓に関する所見が 4 項目、血液生化学・血液学に関するものが 4 項目見られた。

表 1 雄性ラットの 28 日間反復投与毒性試験と 42 日間反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験における毒性所見上位 20 項目

	所見名	陽性物質数
1	Organ weights-Liver-Relative organ weight ↑	255
2	General signs-Whole body-Body weight ↓	193
3	Organ weights-Kidney-Relative organ weight ↑	180
4	General signs-Whole body-Salivation	156
5	Histopathological findings-Liver-Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Centrilobular)	151
6	Organ weights-Liver-Absolute organ weight ↑	145
7	Histopathological findings-Kidney-Eosinophilic body/Hyaline droplets	121
8	Blood chemical examination-Blood serum (Lipid)-T. cholesterol ↑	105
9	General signs-Whole body-Food consumption ↓	102
10	Hematological examination-Blood cell (Erythrocyte)-HGB ↓	102
11	Hematological examination-Blood cell (Erythrocyte)-RBC ↓	94
12	Organ weights-Kidney-Absolute organ weight ↑	94
13	Hematological examination-Blood cell (Erythrocyte)-HCT ↓	91
14	Histopathological findings-Kidney-Basophilic change/Regeneration/Degeneration	81
15	Blood chemical examination-Blood serum (Enzyme)-ALT(GPT) ↑	74
16	Histopathological findings-Stomach (Forestomach/Limiting ridge)-Hyperplasia/Thickneing epithelium	72
17	Hematological examination-Blood cell (Erythrocyte)-Reticulocyte ↑	70
18	Blood chemical examination-Blood serum (Bilirubin)-T. bilirubin ↑	65
19	Blood chemical examination-Blood serum (Enzyme)-Alb ↑	63
20	General signs-Whole body-Locomotor activity ↓	61

また、「2-(1)(Q)SAR 手法による毒性予測」の項目において、肝毒性、腎毒性、血液毒性に着目するため、毒性所見項目ごとに LOEL 値を有する物質、NOEL 値を有する物質を抽出した(表 2～表 4)。HESS では各毒性所見において LOEL 値と NOEL 値が記載されているため、これらの値を使用して各物質での毒性について陽性あるいは陰性を判断した。なお種差、性差を考慮して雄性ラットの毒性試験情報について検討することとした。

毒性評価において重要な指標となる臓器重量の変化や病理組織学的所見に加えて毒性マーカーを中心に毒性所見項目を抽出した。ここでは全試験期間を対象とした。毒性マーカーとして、肝機能の評価するための主要なマーカーとして使用されているアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) やアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ

(AST)、腎機能については血清クレアチニン (Cre) や血液尿素窒素 (BUN) 等のデータを抽出した。病理組織学的所見の項目では肝臓、腎臓で観察されたものを全て抽出した。重量増加の項目では絶対重量と相対重量を区別して抽出した(表 2、表 3)。血液毒性に関しては毒性所見項目として赤血球、白血球、血液凝固、骨髄等を抽出した(表 4)。

表 2 HESS から抽出した肝臓に関する LOEL、NOEL データ

LOEL/NOEL	Examination items	Organ Tissue	Effect	化学物質数
LOELデータ (887物質)	Blood Chemical Examination	Blood Serum(Bilirubin)	T.Bilirubin ↑	111
		Blood Serum(Enzyme)	AST(GOT) ↑	78
			ALT(GPT) ↑	174
			γ-GTP ↑	107
			ALP ↑	91
			LDH ↑	17
			Alb ↓	84
	A/G ↓	32		
	Histopathological Findings	All	All	427
		Liver Bile Duct(胆管)	All	39
			Proliferation(胆管増殖)	8
			bile Thrombus(胆汁栓)	1
		Liver Hepatocyte(肝細胞)	hyperplasia(過形成)	26
			All	374
			Fatty Change(脂肪化)/Vacuolization(空胞形成) ↑	69
			Fatty Change(脂肪化)/Vacuolization(空胞形成) ↓	13
			Necrosis Hepatocyte(壊死)	77
			Hypertrophy/Swelling Hepatocyte(肝細胞肥大)	286
		Liver Kupffer Cell(クッパー細胞)	Eosinophilic Hepatocyte(好酸性肝細胞)	10
			Anisonucleosis(核多形成)/Mitosis(有糸分裂)	18
			Pigmentation(色素沈着)	58
	Undefined Tissue		Congestion(鬱血)	4
		Extramedullary Hematopoiesis(髄外造血)	28	
		Cell infiltration/infiltration(細胞浸潤)	3	
		Cell infiltration/inflammation(細胞炎症)	25	
	Necropsy	Liver	Enlarged	28
	Organ Weight	Liver	Absolute Organ Weight ↑	361
			Relative Organ Weight ↑	503
Absolute Organ Weight ↓			17	
Relative Organ Weight ↓			15	
NOELデータ (965物質)	Blood Chemical Examination	Blood Serum(Bilirubin)	T.Bilirubin ↑	593
		Blood Serum(Enzyme)	AST(GOT) ↑	632
			ALT(GPT) ↑	721
			γ-GTP ↑	612
			ALP ↑	672
			LDH ↑	334
			Alb ↓	665
	A/G ↓	609		
	Histopathological Findings	All	All	835
		Liver Bile Duct(胆管)	All	763
			Proliferation(胆管増殖)	759
			bile Thrombus(胆汁栓)	756
		Liver Hepatocyte(肝細胞)	hyperplasia(過形成)	760
			All	827
			Fatty Change(脂肪化)/Vacuolization(空胞形成) ↑	773
			Fatty Change(脂肪化)/Vacuolization(空胞形成) ↓	756
			Necrosis Hepatocyte(壊死)	768
			Hypertrophy/Swelling Hepatocyte(肝細胞肥大)	813
		Liver Kupffer Cell(クッパー細胞)	Eosinophilic Hepatocyte(好酸性肝細胞)	757
			Anisonucleosis(核多形成)/Mitosis(有糸分裂)	757
			Pigmentation(色素沈着)	757
	Undefined Tissue		Congestion(鬱血)	756
		Extramedullary Hematopoiesis(髄外造血)	759	
		Cell infiltration/infiltration(細胞浸潤)	29	
		Cell infiltration/inflammation(細胞炎症)	735	
	Necropsy	Liver	Enlarged	758
	Organ Weight	Liver	Absolute Organ Weight ↑	805
			Relative Organ Weight ↑	801
Absolute Organ Weight ↓			732	
Relative Organ Weight ↓			738	

表 3 HESS から抽出した腎臓に関する LOEL、NOEL データ

LOEL/NOEL	Examination items	Organ Tissue	Effect	化学物質数
LOELデータ (887物質)	Blood Chemical Examination	Blood Serum(Enzyme)	T.Protein ↑	122
			T.Protein ↓	106
			Alb ↑	125
			Alb ↓	84
		Blood Serum (Nitrogen Compound)	BUN ↑	131
			BUN ↓	9
	Creatinine ↑		50	
	Histopathological Findings	Kidney	All	364
			Eosinophilic body/Hyaline droplets	169
			Basophilic change/Regeneration/Degeneration	139
	Necropsy	Kidney	Enlarged	13
	Organ Weight	Kidney	Absolute Organ Weight ↑	224
			Relative Organ Weight ↑	361
			Absolute Organ Weight ↓	6
			Relative Organ Weight ↓	7
	Urinalysis	Urine	Urine Volume ↑	101
			Urine Volume ↓	16
			pH ↑	6
			pH ↓	71
Protein ↑			40	
Protein ↓			11	
NOELデータ (965物質)	Blood Chemical Examination	Blood Serum(Enzyme)	T.Protein ↑	684
			T.Protein ↓	677
			Alb ↑	671
			Alb ↓	665
		Blood Serum (Nitrogen Compound)	BUN ↑	681
			BUN ↓	648
	Creatinine ↑		670	
	Histopathological Findings	Kidney	All	813
			Eosinophilic body/Hyaline droplets	780
			Basophilic change/Regeneration/Degeneration	776
	Necropsy	Kidney	Enlarged	761
	Organ Weight	Kidney	Absolute Organ Weight ↑	752
			Relative Organ Weight ↑	758
			Absolute Organ Weight ↓	708
			Relative Organ Weight ↓	711
	Urinalysis	Urine	Urine Volume ↑	438
			Urine Volume ↓	426
			pH ↑	526
			pH ↓	535
Protein ↑			521	
Protein ↓			517	

表4 HESS から抽出した血液に関する LOEL、NOEL データ

LOEL/NOEL	Examination items	Organ Tissue	Effect	化学物質数		
LOELデータ (887物質)	Hematological Examination	Blood Cell(Coagulation)	PT ↑	61		
			PT ↓	10		
			APTT ↑	61		
			APTT ↓	13		
			Fibrinogen ↑	12		
			Fibrinogen ↓	6		
		Blood Cell(Erythrocyte)	RBC ↑	42		
			RBC ↓	207		
			HGB ↑	29		
			HGB ↓	235		
			MCV ↑	77		
			MCV ↓	32		
			MCH ↑	58		
			MCH ↓	33		
			MCHC ↑	17		
			MCHC ↓	62		
			Reticulocyte ↑	129		
			Reticulocyte ↓	24		
			Methemoglobin ↑	36		
			HCT ↑	31		
		HCT ↓	213			
		Blood Cell(Leukocyte)	WBC ↑	82		
			WBC ↓	39		
			NEUT ↑	40		
			NEUT ↓	12		
			LYMPH ↑	31		
			LYMPH ↓	41		
			MONO ↑	12		
			MONO ↓	4		
			EOSN ↑	2		
			EOSN ↓	11		
			BASO ↑	1		
			BASO ↓	2		
			Blood Cell(Platelet)	PLT ↑	95	
				PLT ↓	46	
		Histopathological Findings	Bone Marrow	Hematopoiesis ↑	52	
				Hematopoiesis ↓	19	
		NOELデータ (965物質)	Hematological Examination	Blood Cell(Coagulation)	PT ↑	553
					PT ↓	544
					APTT ↑	546
					APTT ↓	542
					Fibrinogen ↑	128
					Fibrinogen ↓	126
	Blood Cell(Erythrocyte)			RBC ↑	704	
				RBC ↓	718	
				HGB ↑	698	
				HGB ↓	724	
MCV ↑				691		
MCV ↓				689		
MCH ↑				685		
MCH ↓				683		
MCHC ↑				676		
MCHC ↓				679		
Reticulocyte ↑				626		
Reticulocyte ↓				612		
Methemoglobin ↑				94		
HCT ↑				696		
HCT ↓	717					
Blood Cell(Leukocyte)	WBC ↑			701		
	WBC ↓			694		
	NEUT ↑			671		
	NEUT ↓			670		
	LYMPH ↑			668		
	LYMPH ↓			673		
	MONO ↑			671		
	MONO ↓			669		
	EOSN ↑			666		
	EOSN ↓			667		
	BASO ↑			664		
	BASO ↓			667		
	Blood Cell(Platelet)			PLT ↑	678	
				PLT ↓	670	
Histopathological Findings	Bone Marrow			Hematopoiesis ↑	635	
				Hematopoiesis ↓	634	

表 2～表 4 では CAS 番号、化学物質名、SMILES が全て同じデータを 1 物質として集計した化学物質数を記載した。ここで、LOEL 値が 1000 mg/kg/day 未満の場合は該当する毒性所見が現れていることから陽性物質と定義した。また注目した毒性所見において NOEL 値が 1000 mg/kg/day 以上の場合は陰性物質と定義した。1000 mg/kg/day という値は OECD の反復投与毒性試験のテストガイドライン (TG407, 408) において限度試験を行なうことができる条件として設定されている用量である。

表 2～表 4 の結果から肝毒性、腎毒性、血液毒性の *in silico* 評価モデルのエンドポイントとして有用と考えられる所見項目を選択し、*in silico* 評価用データセットの作成を行うこととした。

また、HESS では各試験情報に試験期間が記載されており最小 14 日間から最大 126 日間の情報が得られ、表 2～表 4 では全試験期間の試験情報を抽出した。試験期間が 14 日間から 55 日間までを 28 日間群、84 日間から 126 日間までを 90 日間群と定義し、腎臓重量増加に着目して試験期間別の化学物質数を集計したところ、ほとんど重複が見られなかった。そこで 28 日間群と 90 日間群の試験情報を区別して試験情報を抽出することとした。

また、下記「2- (2) カテゴリーアプローチによる毒性予測」の項目では、雄性ラット 28 日間反復投与毒性試験と反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験の 2 試験に共通する 432 所見を対象とした。

(2) 個別課題名： *In silico* 評価用データセットの作成 (頭金正博 (名古屋市立大学)、吉成浩一 (静岡県立大学))

*In silico* 評価モデルを作成するにあたり、データセットを構築することが重要な作業となる。HESS は信頼性の高い試験情報から成る質の高いデータベースであるが、*in silico* 評価モデルを作成する目的で使用する際は再度データの形式を確認する必要があり、PubChem を用いて化学物質の名称と CAS 番号、SMILES が一致しているか、SMILES に間違いがないか等の確認を行った。

「2- (1) (Q) SAR 手法による毒性予測」の項目では、上記 1- (1) で抽出された化学物質について分子記述子の計算を行う際に不適切なものとして、金属または金属を含む物質、異性体を有する物質、塩を有する物質、混合物を除外した。次に記述子計算ソフト Dragon7 を用いて化学物質の 2 次元 (2D) 記述子を計算した。また、統合計算科学システム MOE を使用して化学構造の 3 次元化を行い、3 次元 (3D) 記述子も計算した。記述子群の標準偏差 (SD) が 0.01 より小さいもの、ペアワイズ相関係数が 0.95 より大きいものを条件として、一定値をとるものや相関が高い記述子は除外した。また欠損値があるものは全て除外し、約 800 種類の分子記述子をモデル構築に使用した。これらの記述子は加重平均が 0、分散が 1 になるように調整し正規化を行った。これらの記述子情報と上記 1- (1) の陽性、陰性定義の結果をまとめて、*in silico* 評価用のデータセットを作成した。試験期間に関しては 14 日間から 55 日間までを 28 日間群とし、84 日間から 126 日間までを 90 日間群とし、試験期間を区別した。どの所見項目においても 90 日間群の試験物質数は少なかったため、28 日間群のデータセットを用いて (Q) SAR によるケーススタディを行うこととした。陽性物質の定義は 28 日間群の試験情報において LOEL 値が 1000

mg/kg/day 未満に該当する毒性所見が見られたものとし、陰性物質の定義は、28 日間群の試験情報において NOEL 値が 1000 mg/kg/day 以上に該当する毒性所見が全く認められなかった物質とした。

表 5 に肝毒性に関する *in silico* 評価用のデータセットの内訳を記載した。最も多くデータ数が得られたのは肝臓での重量増加であり、陽性 232 物質、陰性 110 物質、計 342 物質であった。重量増加では絶対重量と相対重量の区別無しのデータセットを作成した。

表 5 肝毒性に関する *in silico* 評価用データセットの内訳

データセット			
予測項目	陽性物質数	陰性物質数	合計
肝重量増加	232	110	342
病理組織学的所見	209	131	340
肝重量増加かつ病理組織学的所見	172	98	270
ALT 上昇または AST 上昇	68	149	217

表 6 に腎毒性に関する *in silico* 評価用のデータセットの内訳を記載した。最も多くデータ数が得られたのは腎臓での病理組織学的所見が認められたもので、陽性 167 物質、陰性 132 物質、計 299 物質であった。ここで、病理組織学的所見の陽性物質の定義は 28 日間群の試験情報において LOEL 値が 1000 mg/kg/day 未満でいずれかの病理組織学的所見が 1 つ以上認められたものとし、陰性物質の定義は、28 日間群の試験情報において NOEL 値が 1000 mg/kg/day 以上で病理組織学的所見が全く認められなかった物質とした。陽性物質の定義に関する検討として、「腎重量増加かつ病理組織学的所見」に関しては LOEL 値を 500 mg/kg/day、100 mg/kg/day とした場合の陽性物質も抽出したところ、それぞれ 86 物質、42 物質だった。

表 6 腎毒性に関する *in silico* 評価用データセットの内訳

データセット			
予測項目	陽性物質数	陰性物質数	合計
腎重量増加	158	127	285
病理組織学的所見	167	132	299
腎重量増加かつ病理組織学的所見	105	112	217
Cre 上昇または BUN 上昇	49	160	209

表 7 に血液毒性に関する *in silico* 評価用のデータセットの内訳を記載した。血液毒性では貧血に着目し、赤血球 (RBC)、ヘモグロビン (HGB)、ヘマトクリット (HCT) のうちどれか一つでも減少した場合を貧血と定義したところ、陽性 111 物質、陰性 150 物質、計 261 物質であった。

表7 血液毒性に関する *in silico* 評価用のデータセットの内訳

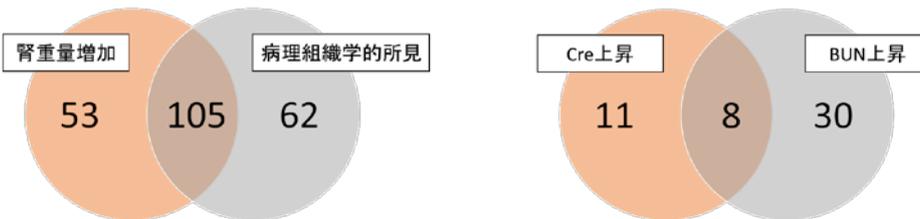
データセット			
予測項目	陽性物質数	陰性物質数	合計
RBC 減少または HGB 減少または HCT 減少	111	150	261

また、作成したデータセットにおける各毒性所見項目について陽性化学物質の重複を確認した(図1)。肝臓に関しては、「肝重量増加」と「病理組織学的所見」の陽性化学物質はどちらの所見においても7割以上が重複していた。また、「AST上昇」の物質の半数は「ALT上昇」も見られた。腎臓に関しては、「腎重量増加」と「病理組織学的所見」の陽性物質はどちらの所見においても6割以上が重複していた。「Cre上昇」の物質の半数は「BUN上昇」も見られた。血液に関してはRBC、HGB、HCTの3つ全てが減少している物質は54物質であった。また、RBC、HGB、HCT単独の減少よりも2つまたは3つとも減少している物質が多かった。

肝臓



腎臓



血液

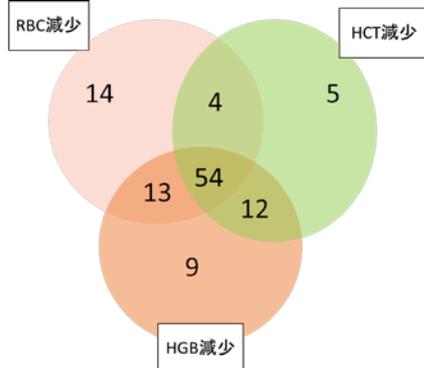


図1 毒性所見項目における陽性物質の重複

「2-(2) カテゴリーアプローチによる毒性予測」の項目で使用するデータセットは次の方法で構築した。

a) 被験物質

被験物質として、ラット28日間反復投与毒性試験データ（233試験）と反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験データ（272試験）を合わせた505試験を対象とした。これら試験物質から、ナトリウム、カリウム、カルシウム以外の金属含有物質、金属、構造不定の物質、混合物を除いた。化学物質の確認は、CAS番号をSciFinderで検索し、「Incompletely Defined Substance」あるいは「substance Image cannot be displayed」と表示された物質を構造不定の物質と判断し、2種以上の物質で構成されていた物質を混合物と判断した。9物質はラット28日間反復投与毒性試験と反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験の2つの試験データがあったため、前者の試験データを使用した。最終的には449物質の情報を本解析に使用した。

b) 毒性所見

ラット28日間反復投与毒性試験と反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験で認められた432所見 (blood chemical examination:48種、functional observation battery:28種、general signs:34種、hematological examination:38種、histopathological findings:155種、necropsy:47種、organ weights:53種、other examinations:1種、urinalysis:28種) を対象とした。各毒性所見は、投与量によらず、LOEL値が報告されている場合を陽性とし、測定されているが所見が認められなかった場合を陰性として、2値として取り扱った。

解析1では、複数の所見（エンドポイント/EP）をまとめたEPグループ（EPG；下表）を作成して解析した。すなわち、432所見から6種の肝関連EPグループ、1種の貧血関連EPグループ、1種の腎臓関連EPグループを作成した。

グループ	所見内容	グループ	所見内容
EPG1	肝細胞障害・炎症	EPG5	肝肥大
EPG2	肝機能低下	EPG6	脂質代謝異常
EPG3	肝機能亢進	EPG7	貧血
EPG4	胆管障害	EPG8	腎毒性

解析2では、反復投与毒性試験で認められる代表的な所見を対象とすることとし、「測定率80%以上」かつ「陽性率10%以上」の26所見を選択し、general signsに分類される5所見を除外して最終21所見（表8）を対象とした。表中の陽性数、陰性数及び未試験数は、それぞれ449物質に占める陽性物質数、陰性物質数及び未測定物質数を示す。また、陽性率及び測定率は次式から算出した。

$$(\text{陽性率}) = (\text{陽性物質数}) \div \{449 - (\text{未試験物質数})\} \times 100 (\%)$$

$$(\text{測定率}) = (\text{測定物質数}) \div 449 \times 100 (\%)$$

選ばれた所見には、血液毒性、肝毒性及び腎毒性が多く含まれていた。

表8 解析2で対象とした21所見

所見			陽性数	陰性数	未測定数	陽性率	測定率	
T#001	Blood chemical examination	Blood serum (bilirubin)	Total bilirubin↑	60	349	40	14.67	91.09
T#013		Blood serum (enzyme)	A/G↑	46	391	12	10.53	97.33
T#017			ALT(GPT)↑	65	383	1	14.51	99.78
T#021			Alb↑	60	384	5	13.51	98.89
T#033			Total protein↑	56	391	2	12.53	99.55
T#035			γ-GTP↑	45	395	9	10.23	98.00
T#039		Blood serum (lipid)	Total cholesterol↑	90	348	11	20.55	97.55
T#043	Blood serum (nitrogen compound)	BUN↑	51	396	2	11.41	99.55	
T#120	Hematological examination	Blood cell (erythrocyte)	HCT↓	84	363	2	18.79	99.55
T#122			HGB↓	94	353	2	21.03	99.55
T#131			RBC↓	84	363	2	18.79	99.55
T#132			Reticulocyte↑	63	331	55	15.99	87.75
T#172	Histopathological findings	Kidney	Basophilic change/ regeneration/degeneration	70	379	0	15.59	100.00
T#178			Eosinophilic body/hyaline droplets	112	337	0	24.94	100.00
T#216		Liver	Hypertrophy/swelling hepatocyte (centrilobular)	135	313	1	30.13	99.78
T#250		Spleen	Extramedullary hematopoiesis	50	395	4	11.24	99.11
T#367	Organ weights	Kidney	Absolute organ weight↑	81	366	2	18.12	99.55
T#369			Relative organ weight↑	162	286	1	36.16	99.78
T#371		Liver	Absolute organ weight↑	126	322	1	28.13	99.78
T#373			Relative organ weight↑	227	221	1	50.67	99.78
T#390		Spleen	Relative organ weight↑	44	344	61	11.34	86.41

血液毒性、肝毒性及び腎毒性関連所見を、それぞれを赤色、青色及び黄色で示した。

c) 分子記述子計算

分子記述子の計算にあたって、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオンを含む物質は各金属イオンを除いて水素イオンで置換し、塩化物イオン、臭化物イオンを含む物質は各ハロゲンイオンを除いてカチオンに変換し、水和物は水を除き、SMILESがSciFinderで表示される構造と異なる場合はSciFinderの構造にSMILESを修正した。

分子記述子はDragon 7ソフトウェアを使用して計算し、以下のグループに分けて解析に使用した。

解析1で使用した記述子

セット	略称	概要	記述子数
A	a112385	全449物質で計算可能で一定の値の記述子を除いた2385記述子	2385
B	5des	独自に選択した基本的5記述子：MW、AMW、MLOGP、TPSA(NO)、TPSA(Tot)	5
C	block21	官能基関連記述子：DragonのBlock 21に含まれる記述子	101
D	FP	Extended-connectivity fingerprints (ECFP)：size=1024、bit数=2、最小直径=0、最大直径=4	1024

MW：分子量、AMW：平均分子量（分子量÷原子数）、MLOGP：calculated logP from Moriguchi logP model、TPSA(NO)：topological polar surface area using N, O polar contributions、TPSA(Tot)：topological polar surface area using N, O, S, P polar contributions.

解析 2 で使用した記述子

セット	略称	概要	記述子数
A	all2385	全449物質で計算可能で一定の値の記述子を除いた2385記述子	2385
B	block21	官能基関連記述子：DragonのBlock 21に含まれる記述子	101
C	3des	独自に選択した基本的記述子：MW、MLOGP、TPSA(Tot)	3
D	5des	独自に選択した基本的記述子：MW、AMW、MLOGP、TPSA(NO)、TPSA(Tot)	5
E	351des	相関係数が0.8以上の記述子を除外したもの	351

d) 物質間距離の計算

上記の分子記述子について、449物質中で最大値が1、最小値が0になるように標準化した後、標準化された分子記述子を用いて449物質間のユークリッド距離を計算した。得られた距離を理論上の最大距離（記述子数の平方根）で除し、相対距離を計算した。解析 2 で使用した記述子セットにおける相対距離を下表に示した。同じ物質群を対象としても、用いる記述子セットにより最大相対距離が0.35～0.99と大きく異なったことから、ケミカルスペース上における各物質間の分布が大きく異なることが確認された。

セット	理論上最大距離	最大距離	最大相対距離	最小距離
A	48.84	34.10	0.70	0
B	10.05	3.56	0.35	0
C	1.73	1.44	0.83	0
D	2.24	1.78	0.79	0
E	18.73	18.50	0.99	0

2 研究項目名：(Q)SAR とカテゴリーアプローチによるケーススタディ

(1) 個別課題名：(Q)SAR 手法による毒性予測（頭金正博（名古屋市立大学））

人工知能技術の1つである機械学習法としてランダムフォレスト（RF）を用いて予測モデルを構築した。変数は上記「1- (2) *In silico*評価用データセットの作成」で計算したDragonによる2D記述子を使用し、各毒性所見について陽性、陰性のバランスを保持した層化5分割交差検証(5-fold cross validation)により内部検証を行った。予測精度、感度、特異度、Matthews correlation coefficient (MCC)、Receiver Operating Characteristic (受信者動作特性：ROC) 曲線の曲線化面積Area Under the Curve (AUC) を算出してモデルの性能を評価した。図2に評価指標の算出方法を示した。今回作成した予測モデルは陽性、陰性を判別する2値分類モデルとなるため、使用するデータの陽性、陰性の比率が異なる均衡データの場合は予測精度で評価するのは適当ではない。そこで、MCC、ROC-AUCを主な評価指標とした。MCCは-1から+1の値をとり、+1に近づくほど良いモデルと言える。AUCは0から1の値をとり、1に近づくほど良いモデルと言える。

		実測	
		陽性	陰性
予測	陽性	TP (true positive)	FP (false positive)
	陰性	FN (false negative)	TN (true negative)

$$\text{Accuracy} = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

$$\text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$\text{Specificity} = \frac{TN}{TN + FP}$$

$$\text{Precision} = \frac{TP}{TP + FP}$$

$$\text{MCC} = \frac{TP \times TN - FP \times FN}{\sqrt{(TP + FP)(TP + FN)(TN + FP)(TN + FN)}}$$

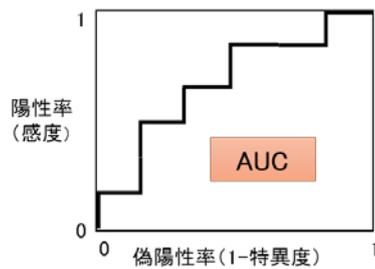


図2 *In silico* 予測モデルの評価指標

表 9 に肝毒性に関する内部検証結果を示した。「肝重量増加かつ病理組織学的所見」を予測対象としたモデルは高い予測性能を示した (MCC 0.56、AUC 0.84)。一方、「ALT 上昇または AST 上昇」を予測対象としたモデルでは感度が 0.29 と低く、陽性物質を予測することが困難であり全体の予測性能が低かった (MCC 0.32、AUC 0.79)。データセットが異なるため厳密な比較は困難であるが、対象とするエンドポイントによって性能の差が見られ、収集可能な物質数や不均衡データが原因の 1 つと考えられた。そこで、不均衡データの対策として Synthetic Minority Oversampling Technique (SMOTE) と呼ばれる手法を用いて「ALT 上昇または AST 上昇」の陽性物質のデータを増やし、データ不均衡を解消し予測モデルを作成した。SMOTE は機械学習によるモデル構築の際に、データ不均衡への対策として使用される手法であり、少ないカテゴリーに属するデータを使用して人工的に新たなデータを生成することで、陽性物質数と陰性物質数の不均衡を解消することが可能となる。SMOTE を用いてデータ不均衡の解消を行ったところ、「ALT 上昇または AST 上昇」の予測モデルの性能は (MCC 0.51、AUC 0.85) となり、予測性能が大幅に向上した。そこで、本研究では、少ないカテゴリーに属するデータ数が、多いカテゴリーのデータ数の 2/3 以下の場合に SMOTE による不均衡データの調整を行った。肝毒性については全ての予測項目において不均衡データの調整を行ったが、どの予測項目でも MCC、AUC は改善傾向が見られた。

表9 肝毒性に関する *in silico* 予測モデルの内部検証結果

データセット				内部検証 (5-fold cross validation)				
予測項目	陽性物質数	陰性物質数	合計	ACC	感度	特異度	MCC	AUC
肝重量増加	232	110	342	0.81	0.89	0.64	0.55	0.82
肝重量増加(SMOTE)	232	220	452	0.80	0.86	0.66	0.53	0.86
病理組織学的所見	209	131	340	0.76	0.86	0.60	0.47	0.82
病理組織学的所見(SMOTE)	209	262	471	0.75	0.79	0.70	0.48	0.82
肝重量増加かつ病理組織学的所見	172	98	270	0.8	0.88	0.65	0.56	0.84
肝重量増加かつ病理組織学的所見(SMOTE)	172	196	368	0.81	0.87	0.71	0.59	0.87
ALT上昇またはAST上昇	68	149	217	0.74	0.29	0.94	0.32	0.79
ALT上昇またはAST上昇(SMOTE)	136	149	285	0.80	0.59	0.89	0.51	0.85

表 10 に腎毒性に関する内部検証の結果を示した。「腎重量増加かつ病理組織学的所見」を予測対象としたモデルは高い予測性能を示した (MCC 0.63、AUC 0.89)。一方、「Cre 上昇または BUN 上昇」を予測対象としたモデルでは感度が 0 に近く、陽性物質を予測することが困難であり全体の予測性能が低かった (MCC 0.16、AUC 0.67)。HESS において、「腎重量増加」や「腎臓の病理組織学的所見」に関しては多くの化学物質で報告されていたが、「Cre 上昇」や「BUN 上昇」に関する報告は少ない。これは、重度の腎障害を誘発する化学物質が HESS の対象化学物質の中では少ないことに起因すると考えられる。そこで、肝毒性と同様に不均衡データの対策として SMOTE を用いてデータ不均衡の解消を行ったところ、予測モデルの性能は SMOTE 前の MCC 0.16、AUC 0.67 から MCC 0.41、AUC 0.82 となり、予測性能が大幅に向上した。

表10 腎毒性に関する *in silico* 予測モデルの内部検証結果

データセット				内部検証 (5-fold cross validation)				
予測項目	陽性物質数	陰性物質数	合計	ACC	感度	特異度	MCC	AUC
腎重量増加	158	127	285	0.75	0.77	0.72	0.49	0.81
病理組織学的所見	167	132	299	0.81	0.82	0.79	0.61	0.87
腎重量増加かつ病理組織学的所見	105	112	217	0.82	0.80	0.83	0.63	0.89
Cre上昇またはBUN上昇	49	160	209	0.76	0.10	0.96	0.16	0.67
Cre上昇またはBUN上昇(SMOTE)	196	160	356	0.80	0.47	0.91	0.41	0.82

表11に血液毒性に関する内部検証の結果を示した。RBC、HGB、HCTのうちどれか一つでも減少した場合を貧血と定義したところ、予測モデルの性能はMCC 0.43、AUC 0.77であった。

表11 血液毒性に関する *in silico* 予測モデルの内部検証結果

データセット				内部検証 (5-fold cross validation)				
予測項目	陽性物質数	陰性物質数	合計	ACC	感度	特異度	MCC	AUC
RBC減少または HGB減少または HCT減少	111	150	261	0.72	0.56	0.83	0.43	0.77

次に、予測モデルの構築に使用した HESS の RDT サブデータベースとは別の TGP (Toxicogenomics Project) サブデータベースを用いて、予測モデルの汎用性を確認するために外部検証を行った。内部検証で最も予測性能が高かった腎毒性における「腎重量増加かつ病理組織学的所見」の予測モデルを対象とし、TGP データベースから抽出した外部検証用のデータセットを作成した。外部検証では、予測モデルが信頼性の高い予測を行うことが可能な化学構造や物理化学的性質の範囲である適用領域 (Applicability Domain, AD) を設定した。設定方法としては以下の式から、化学物質間のデータ距離 (ユークリッド距離を使用) を用いて学習データから閾値 ( $D_T$ ) を設定し、外部検証用データと学習データの距離が閾値以内の物質は適用領域内、閾値より大きい物質は適用領域外とした。

$$\text{閾値 } (D_T) \quad D_T = \bar{y} + Z\sigma$$

$\bar{y}$  : Training set の全物質間距離の平均、 $\sigma$  :  $\bar{y}$  の標準偏差

$Z$  : 0.5 (適用領域の広さを決める任意の値、0-1)

表 12 の外部検証の結果から、適用領域内では MCC は 0.48、AUC は 0.75 となり外部データを用いた場合でも予測可能である汎用性のあるモデルが構築できたと考えられた。また適用領域外の予測結果では感度が 0 となり陽性物質は予測不可能であった。外部検証の結果から、適用領域の設定は *in silico* 予測において重要であることが示唆された。

表 12 腎毒性に関する *in silico* 予測モデルの外部検証結果

予測項目	データセット				陽性閾値 (LOEL 値)	外部検証				
	試験期間	陽性物質数	陰性物質数	合計		ACC	感度	特異度	MCC	AUC
腎重量増加かつ 病理組織学的所見 (適用領域内)	28日間群	5	4	9	1000 mg/kg/day	0.67	0.40	1.00	0.48	0.75
腎重量増加かつ 病理組織学的所見 (適用領域外)	28日間群	5	7	12	1000 mg/kg/day	0.58	0	1.00	NA	0.63

「腎重量増加かつ病理組織学的所見」に関しては LOEL 値を 500 mg/kg/day、100 mg/kg/day とした場合の陽性物質も抽出したところ、それぞれ 86 物質、42 物質だった。そこで、陽性物質の定義を変更した場合の予測モデルも構築した (表 13)。LOEL 値が 500 mg/kg/day、1000 mg/kg/day のモデルを比較すると予測性能は大きく変わらなかった。100 mg/kg/day のモデルでは陽性物質数が少なくなり感度が低かった。LOEL 値を低く設定することで毒性の強い陽性物質が得られたと考えられるが、同時に不均衡データの対策や陰性物質の定義も検討することが必要だと思われる。

表 13 腎毒性に関する *in silico* 予測モデルの陽性閾値の比較

予測項目	データセット			陽性閾値 (LOEL値)	内部検証 (5-fold cross validation)				
	陽性物質数	陰性物質数	合計		ACC	感度	特異度	MCC	AUC
腎重量増加かつ 病理組織学的所見	105	112	217	1000 mg/kg/day	0.82	0.80	0.83	0.63	0.89
	86	112	198	500 mg/kg/day	0.82	0.76	0.88	0.64	0.87
	42	112	154	100 mg/kg/day	0.84	0.57	0.94	0.57	0.86

また、これまで 2D 記述子のみを使用していたが記述子から得られる化学構造情報量を増やすために、統合計算科学システム MOE を使用して化学構造の 3 次元化を行い、3D 記述子を計算し予測モデルの構築に使用した。内部検証で最も予測性能が高かった腎毒性に関する「腎重量増加かつ病理組織学的所見」の予測モデルを対象とし、RF にてモデルを構築したところ MCC は 0.65、AUC は 0.89 となり、2D 記述子のみを使用した結果と比較して予測性能が向上した (表 14)。

表 14 腎毒性に関する 3D 記述子を使用した *in silico* 予測モデルの結果

予測項目	データセット			内部検証 (5-fold cross validation)				
	陽性物質数	陰性物質数	合計	ACC	感度	特異度	MCC	AUC
腎重量増加かつ 病理組織学的所見 (2D記述子のみ)	105	112	217	0.81	0.82	0.79	0.61	0.87
腎重量増加かつ 病理組織学的所見 (2D+3D記述子)	105	112	217	0.83	0.81	0.84	0.65	0.89

(2) 個別課題名：カテゴリーアプローチによる毒性予測 (吉成浩一 (静岡県立大学))  
上記 1-(2) で作成したデータセットを用いて以下の解析を行った。

#### 解析 1. 分子記述子を用いた物質類似性の検討

##### a) 検証物質及び近傍物質

検証物質として 20 物質を 449 物質からランダム関数により無作為に抽出した。各検証物質の化学構造と毒性試験結果 (LOEL 値) は図 3 及び表 15 に示した通りである。

各検証物質について、各記述子セットで求めたユークリッド距離の近い 5 又は 10 物質を「近傍物質」としてそれぞれの記述子セットで抽出した。

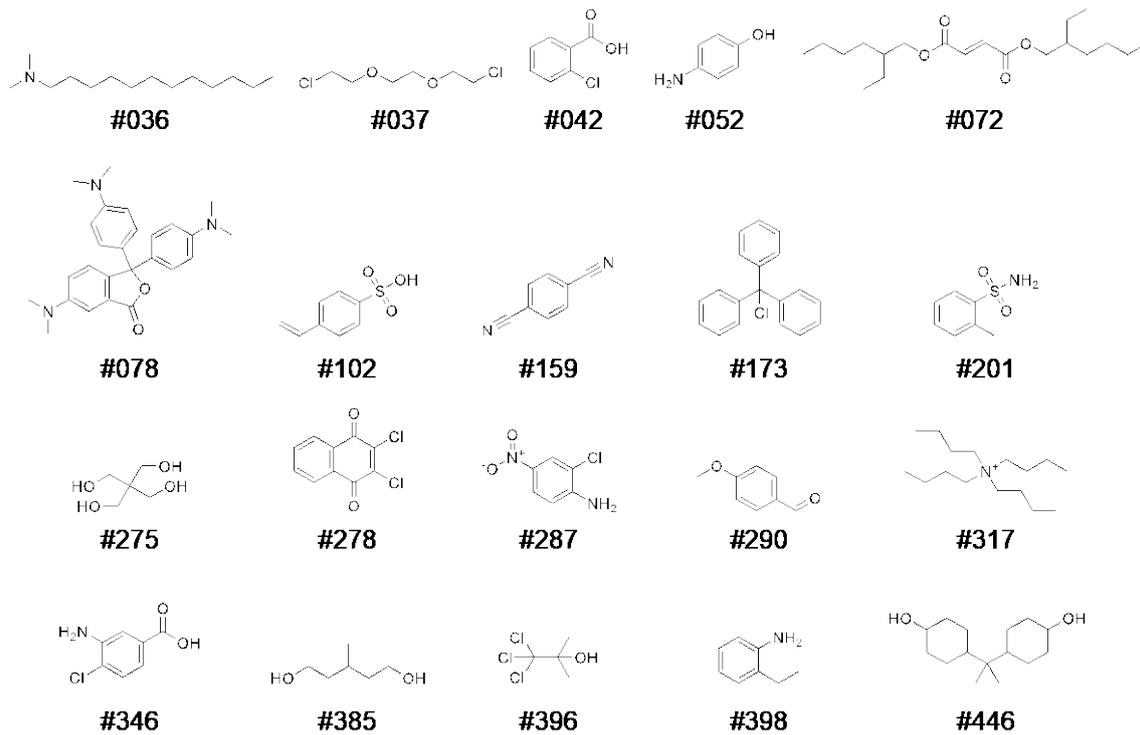


図3 選択した検証物質

表15 選択した検証物質

Chem #	EPG1	EPG2	EPG3	EPG4	EPG5	EPG6	EPG7	EPG8
#036	NOEL							
#037	200	NOEL						
#042	NOEL							
#052	NOEL	NOEL	500	NOEL	NOEL	NOEL	500	100
#072	NOEL	NOEL	NOEL	NOEL	1000	NOEL	NOEL	NOEL
#078	NOEL	NOEL	500	NOEL	500	NOEL	NOEL	NOEL
#102	NOEL	1000						
#159	80	NOEL	80	80	80	20	NOEL	20
#173	300	300	60	300	60	300	NOEL	NOEL
#201	NOEL	NOEL	NOEL	NOEL	NOEL	NOEL	100	100
#275	NOEL							
#278	NOEL	50						
#287	NOEL							
#290	NOEL	NOEL	500	NOEL	500	NOEL	NOEL	NOEL
#317	NOEL	NOEL	NOEL	NOEL	600	NOEL	NOEL	NOEL
#346	NOEL							
#385	NOEL							
#396	NOEL	NOEL	100	NOEL	100	100	100	10

#398	50	NOEL	12.5	50	NOEL	NOEL	12.5	NOEL
#446	500	100	100	500	100	100	NOEL	NOEL

表中の数値はLOEL値 (g/kg body weight/day)を表す。

#### b) 近傍物質との化学構造類似性

各検証物質について、近傍の5又は10物質の平均相対距離を算出した(図4)。その結果、上位5又は10個の近傍物質との距離は、検証物質の種類又は用いる記述子セットの種類により大きく異なった。例えば、#078、#173、#278、#317では、FPやall2385、block21のいずれの記述セットでも相対距離は他の検証物質と比較して大きく、これらと化学構造的に類似した物質が用いたデータセットにはあまり存在しないと考えられた。他方、#052、#201、#287、#398では、いずれに記述子セットでも、近傍物質との距離が近く、データセットに化学構造的に類似した物質が多く存在したと考えられた。一方で、#396では、FPで求めた相対距離は比較的小さかったのに対して、all2385やblock21で計算した距離は比較的大きく、用いる記述子が異なると近傍物質の種類が変わることが示唆された。

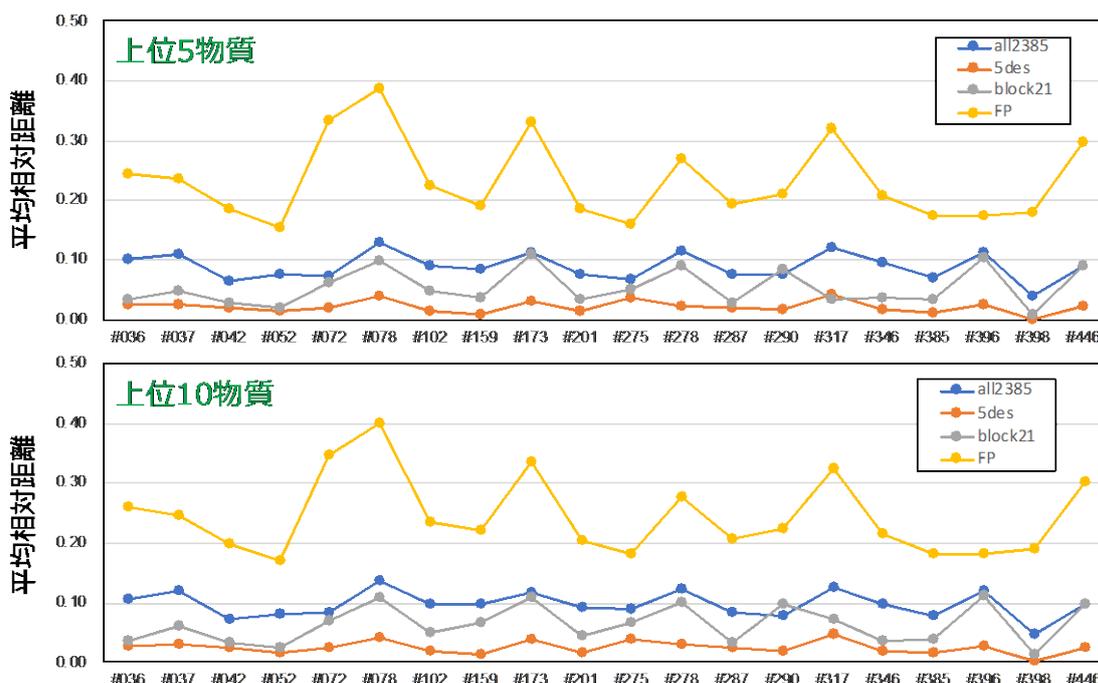


図4 各検証物質と近傍物質の相対距離

具体例として、図5に#078及び#398の近傍物質を示した。上述の通り、#078では、いずれの記述子セットを利用した場合にも、#060を除き、全体的な化学構造上の類似性を見出すことができなかった。また、#286や#504は、#078の一部を成す構造であり、局所的な類似性は高いが、構造全体としての類似性が高いとは言えなかった。また、化合物の全体構造を反映すると考えられる多数の記述子 (all2385) を用いた場合には、近傍上位5物質に#286や#504は含まれなかった。

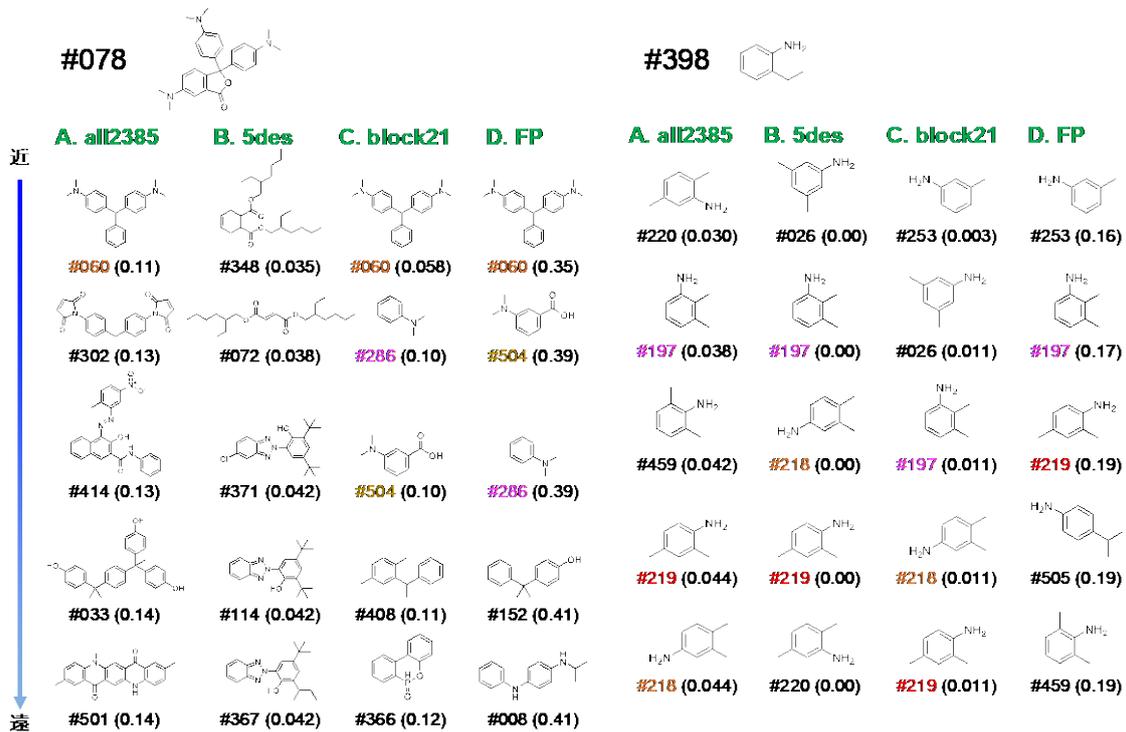


図5 近傍物質の具体例

カッコ内の値は検証物質との相対距離を示す。複数回抽出された物質の番号に色をつけた。

以上の結果から、用いたデータセットでは、被検物質の化学構造における多様性は高いにも関わらず、全物質数が少なく、又それらの分布は一様でないことから、データセットのケミカルスペースと物質の分布が記述子を利用した近傍物質選択に大きく影響すると考えられた。

### c) 近傍物質との毒性学的類似性の評価

次にリードアクロスの可能性を検討するために、選択した20種の検証物質について、上記で選出した近傍10物質との各EPグループの一致率を評価した。ここでは、NOEL値に関わらず、各EPが認められた場合に「陽性」、認められなかった場合に「陰性」の2値として比較した。表16に各被験物質の平均値を記述子セット、EPグループごとに示した。一致率はEPグループごとに大きな差が認められ、EPG2（肝機能低下）やEPG4（胆管障害）、EPG6（脂質代謝異常）では、いずれの記述子セットを利用した場合にも比較的高かった。一方で、EPG3（肝機能亢進）やEPG8（腎毒性）ではいずれの記述子セットを用いた場合にも60%以下の低値であった。

一致率が高かったEPグループでは、検証物質の陽性割合が低い傾向が認められたことから、各EPグループの陽性・陰性にに基づき検証物質を分類して比較を行った（表17、表18）。その結果、EPG2では陽性物質の一致率は低く、陰性物質の一致率が高かったことから、全体の一致率の高さは、陽性物質の少なさ、陰性物質の一致率の高さに起因していると考えられた。EPG4やEPG6でも同様の傾向が認められた。一方、EPG8（腎毒性）では、陽性物質と陰性物質の間に明確な差は認められなかった。

表16 検証物質と近傍10物質のEPグループ一致率

記述子 セット	EPグループ	EPG1	EPG2	EPG3	EPG4	EPG5	EPG6	EPG7	EPG8
	陽性物質数	5	2	8	4	8	4	4	6
	総数	200	200	200	200	200	200	200	200
A	一致数	135	156	111	160	115	129	132	106
	一致率(%)	67.5	78.0	55.5	80.0	57.5	64.5	66.0	53.0
B	一致数	124	140	111	139	120	128	111	97
	一致率(%)	62.0	70.0	55.5	69.5	60.0	64.0	55.5	48.5
C	一致数	107	149	119	129	102	128	130	106
	一致率(%)	53.5	74.5	59.5	64.5	51.0	64.0	65.0	53.0
D	一致数	115	148	115	143	135	128	124	95
	一致率(%)	57.5	74.0	57.5	71.5	67.5	64.0	62.0	47.5

表17 検証物質と近傍10物質のEPグループ一致率：陽性物質のみ

記述子 セット	EPグループ	EPG1	EPG2	EPG3	EPG4	EPG5	EPG6	EPG7	EPG8
	陽性物質数	5	2	8	4	8	4	4	6
	総数	50	20	80	40	80	40	40	60
A	一致数	32	10	32	28	34	16	18	27
	一致率(%)	64.0	50.0	40.0	70.0	42.5	40.0	45.0	45.0
B	一致数	20	4	47	15	40	13	22	36
	一致率(%)	40.0	20.0	58.8	37.5	50.0	32.5	55.0	60.0
C	一致数	26	7	39	16	40	18	10	31
	一致率(%)	52.0	35.0	48.8	40.0	50.0	45.0	25.0	51.7
D	一致数	24	4	43	20	49	19	19	32
	一致率(%)	48.0	20.0	53.8	50.0	61.3	47.5	47.5	53.3

表18 検証物質と近傍10物質のEPグループ一致率：陰性物質のみ

記述子 セット	EPグループ	EPG1	EPG2	EPG3	EPG4	EPG5	EPG6	EPG7	EPG8
	陰性物質数	15	18	12	16	12	16	16	14
	総数	150	180	120	160	120	160	160	140
A	一致数	103	146	79	132	81	113	114	79
	一致率(%)	68.7	81.1	65.8	82.5	67.5	70.6	71.3	56.4
B	一致数	87	145	72	114	62	115	108	70
	一致率(%)	58.0	80.6	60.0	71.3	51.7	71.9	67.5	50.0
C	一致数	98	133	72	123	80	110	101	66
	一致率(%)	65.3	73.9	60.0	76.9	66.7	68.8	63.1	47.1
D	一致数	91	144	72	123	86	109	105	63
	一致率(%)	60.7	80.0	60.0	76.9	71.7	68.1	65.6	45.0

記述子セット間の比較をすると、陽性・陰性物質の両者を含む全体の一致率に4つのセット間で明確な差は認められなかった（表16）。陽性物質のみの評価では、大きな差は認められなかったが、記述子セットAを利用した場合に比較的高い一致率が認められ、他のセットを用いた場合にはEPグループによっては20%台の非常に低い一致率となった（表17）。陰性物質の比較では、記述子セットによる明確な違いは認められなかった（表18）。

全てのEPグループの一致率の平均値を求め、記述子セットと検証物質の種類による一致率の差を比較した（図6）。その結果、記述子セットA（a112385）を用いた場合には、いずれの検証物質の場合でも比較的高い一致率が得られた。他方、記述子セットD（FP）では、

多くの場合高い一致率が得られたが、#078や#275、#317の場合など、検証物質の種類によっては他のセットより著しく低い一致率となる場合も認められた。一方、非常に単純な5記述子のみを用いた記述子セットBでは、#275や#287など、特定の検証物質では非常に高い一致率を示した一方で、#036や#072、#378では著しく低い一致率となった。

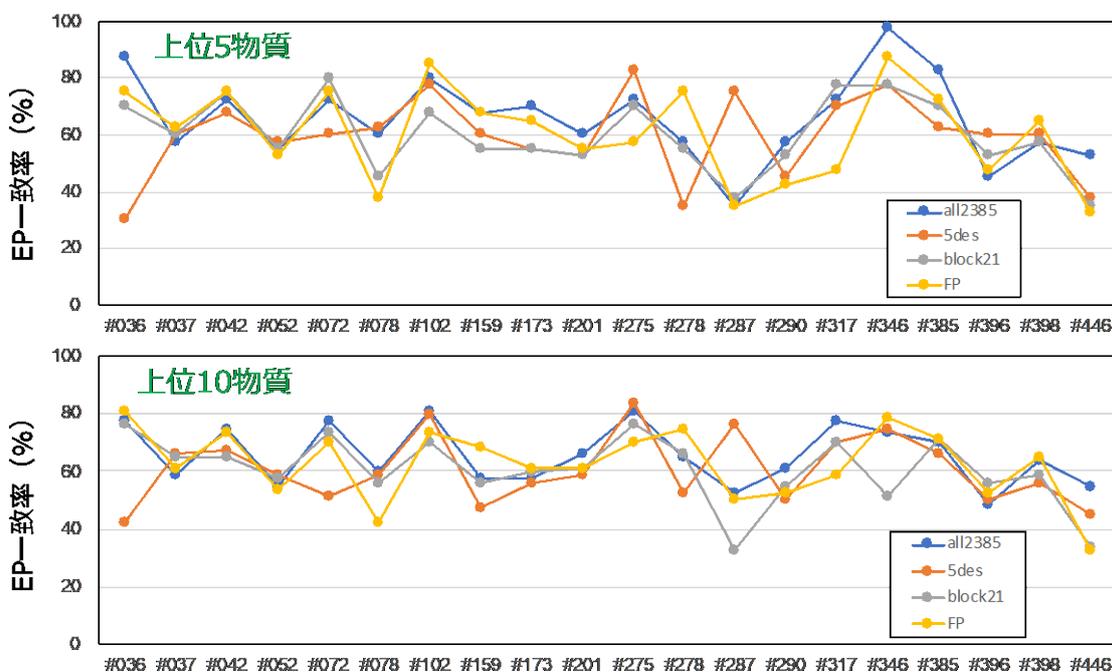


図6 各検証物質と近傍物質の毒性学的類似性

## 解析 2. 物質類似性評価における閾値設定の検討

上記解析 1 において、分子記述子による類似性判断によりデータセットから一定数 (5又は10物質) の近傍物質を選択したところ、2次元化学構造では必ずしも類似物質とは言えない物質も近傍物質に含まれてしまうことが明らかになった。したがって、限られた物質数のデータセットでは、物質間距離を考慮せずに一定数の近傍物質を選択することは適切ではないと考えられた。そこで、物質間距離に閾値を設定し、ある一定距離以内の物質のみを近傍物質として毒性比較を行うこととした。

### a) 物質と毒性所見の選択

被験物質は解析 1 と同様の449物質を解析対象とした。

EPグループの設定が、データ解析の不確実性を生む原因となっている可能性があることから、本解析では432の個別所見を対象とし、そのうち測定率及び陽性率を参考にして代表的な21所見を選択して解析対象とした。分子記述子については、(1) 解析 1 で使用したセットに2つのセットを新たに追加し、一方で部分化学構造に基づくフィンガープリントは化学構造全体の類似性判断には良くないことが解析 1 により示唆されたことから使用しなかった。

b) 物質間距離の計算

全449物質の物質間距離を全ての組み合わせで計算した。各物質間距離（2物質のペア：全100576ペア）を、距離が小さい（近い）順にソートした。例として、記述子セットAの相対距離分布を図7に示した。この分布に基づき、相対距離の小さい方から上位0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.5%、0.75%、1.0%（それぞれ100ペア、150ペア、201ペア、251ペア、502ペア、754ペア、1005ペア）で閾値を設定した。閾値が大きくなるほど距離が長くなることから、類似性が低い物質ペアも含まれることになる。それぞれの閾値で含まれた物質ペアの全物質を対象に、ペアとなる物質数を数え、5物質以上存在した場合、その物質を「被験物質」として定義した。また、そのペアの物質を「近傍物質」として定義し、以下の解析に使用した。

例として、記述子セットAを使用して距離計算を行った場合に選択された被験物質の数を表19に示した。また、記述子セットAを使用した際に、閾値0.25%に含まれる全ペアの全物質について近傍物質数をカウントした結果を図8に示した。0.25%の閾値を設定した際には、36物質が被験物質として定義され、これらは近傍物質を5つ以上含んでおり（図8の近傍物質数が5以上のカラムの度数を合計すると36となる）、最大では13の近傍物質を含む物質も認められた。また、275物質についてはまったく近傍物質が存在せず、4物質未満の物質も多かった。被験物質の種類により近傍物質数は大きく異なることが分かる。449物質のうち解析対象は8%（36物質）だけであった。36被験物質を表20に、その近傍物質を表21及び図9に示した。

解析1では、物質距離に関わらず物質数（5又は10物質）で近傍物質を選択したのに対し、解析2では、物質間距離で近傍物質を定義し、その数には「5以上」以外の制限を設けていないことが両解析の大きな違いである。

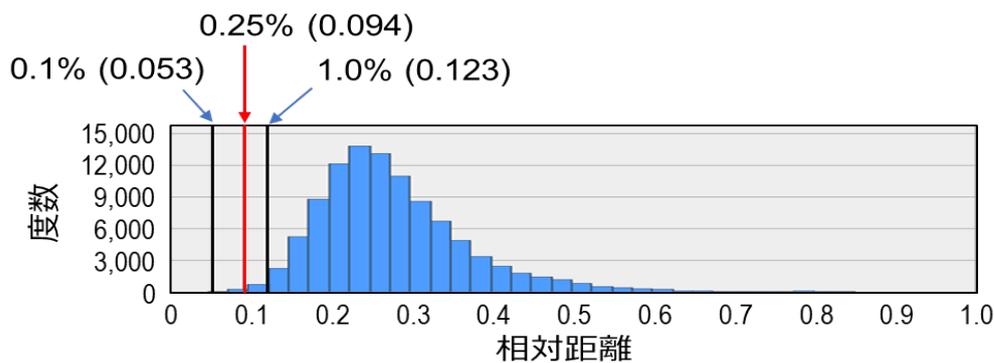


図7 記述子セットAの相対距離の度数分布

上位0.1%、0.25%及び1.0%の位置を示し、括弧内にはそれぞれの相対距離を示した。

表19 記述子セットAの各閾値の被験物質数

閾値 (%)	0.1	0.15	0.2	0.25	0.5	0.75	1.0
被験物質数	9	16	26	36	63	98	125

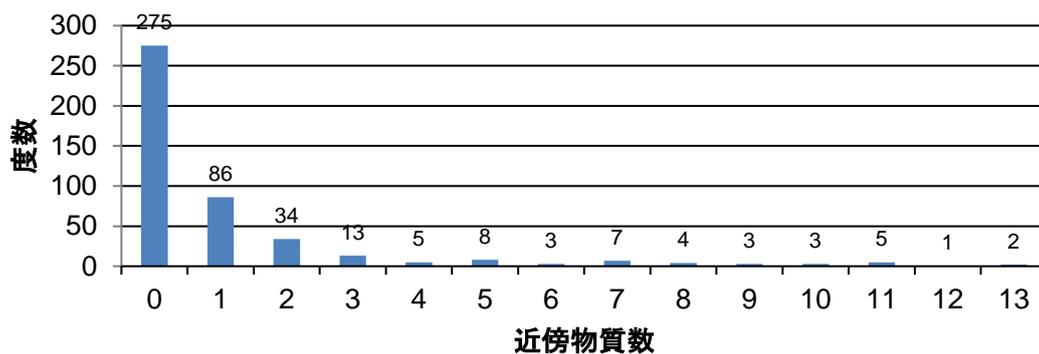
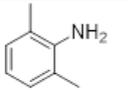
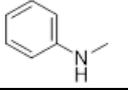
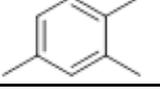
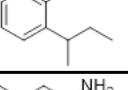
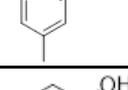
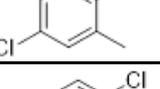
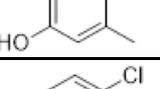
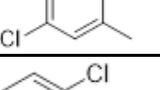
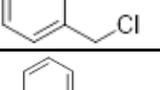
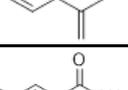
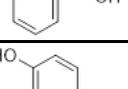
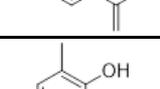
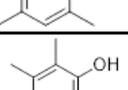
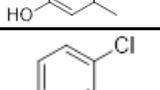
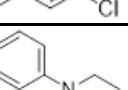
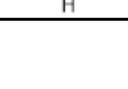


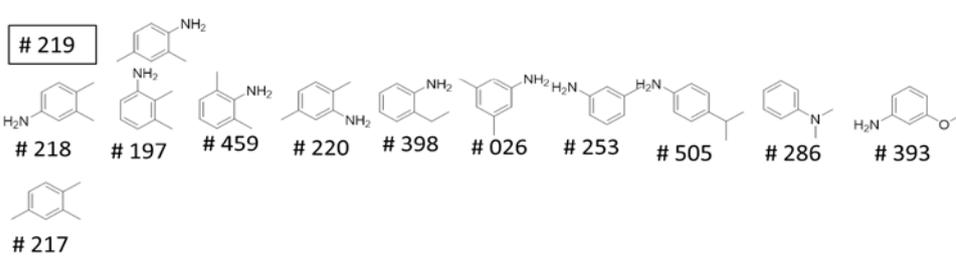
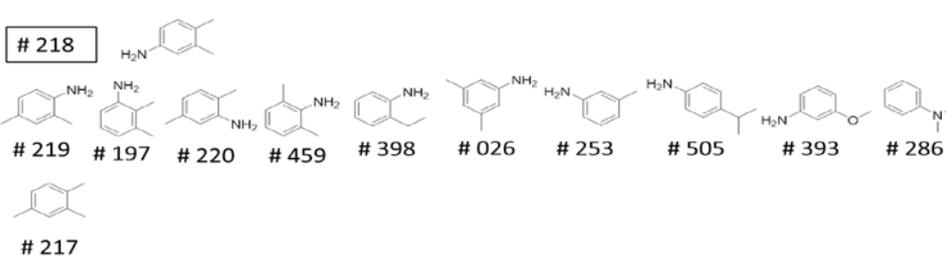
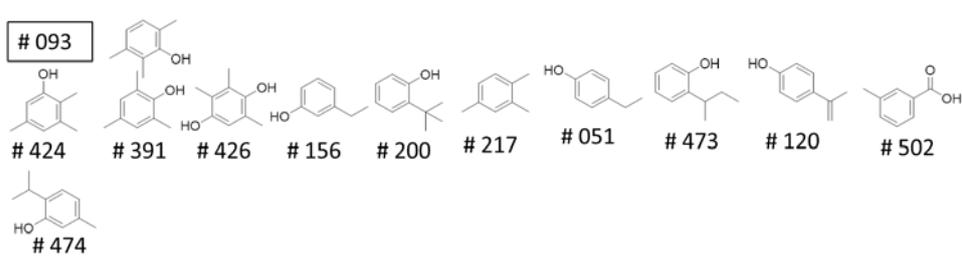
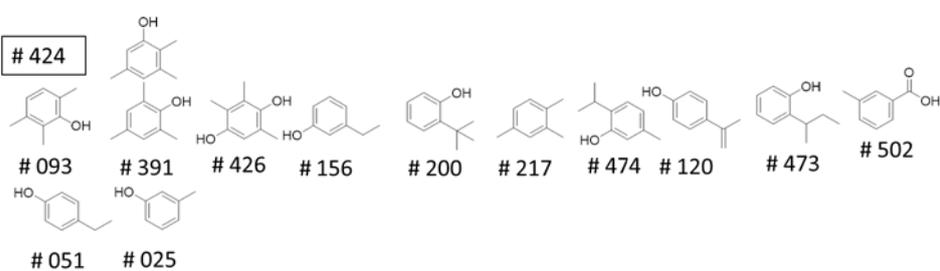
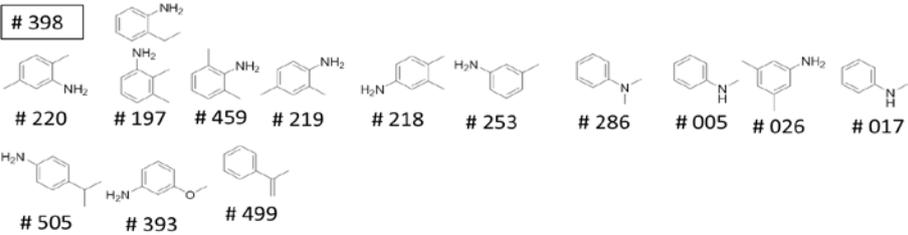
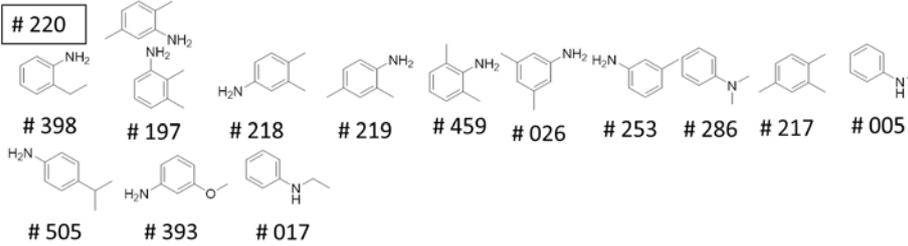
図8 記述子セット A の閾値0.25%において選択された近傍物質数の分布

表20 記述子セット A の閾値0.25%における被験物質

番号	物質番号	名称	化学構造	近傍物質数
1	#220	2,5-dimethylaniline		13
2	#398	2-ethylaniline		13
3	#424	2,3,5-trimethylphenol		12
4	#093	2,3,6-trimethylphenol		11
5	#218	3,4-dimethylaniline		11
6	#219	2,4-dimethylaniline		11
7	#286	N,N-dimethylaniline		11
8	#156	m-ethylphenol		10
9	#200	2-tert-butylphenol		10
10	#474	thymol		10
11	#197	2,3-dimethylaniline		9
12	#253	3-methylaniline		9

13	#459	2,6-dimethylaniline		9
14	#005	<i>N</i> -methylaniline		8
15	#217	1,2,4-trimethylbenzene		8
16	#279	2,6-dichlorotoluene		8
17	#362	2,3-dichlorotoluene		8
18	#473	<i>o</i> - <i>sec</i> -butylphenol		8
19	#026	3,5-xylidine		7
20	#080	4-chloro- <i>o</i> -cresol		7
21	#149	4-chloro-3-methylphenol		7
22	#326	2,5-dichlorotoluene		7
23	#406	1-chloro-2-(chloromethyl)benzene		7
24	#499	1-methylethenylbenzene		7
25	#502	3-methylbenzoic acid		7
26	#120	4-(1-methylethenyl)phenol		6
27	#391	2,4,6-trimethylphenol		6
28	#426	2,3,5-trimethylhydroquinone		6
29	#491	3,4-dichlorotoluene		6
30	#017	<i>N</i> -ethylaniline		5



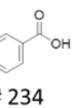
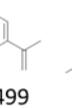
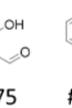
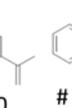
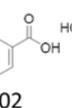
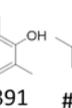
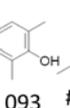
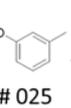
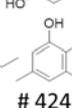
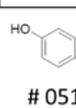


# 286

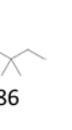
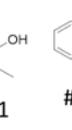
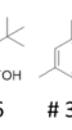
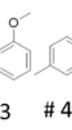
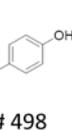
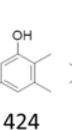
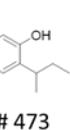
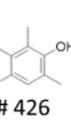
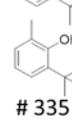
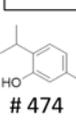


# 218

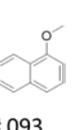
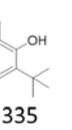
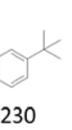
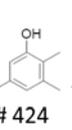
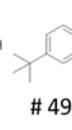
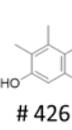
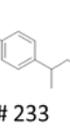
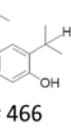
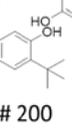
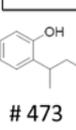
# 156



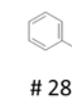
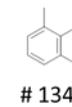
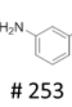
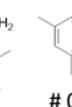
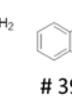
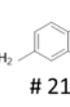
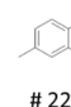
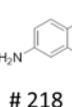
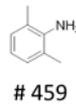
# 200



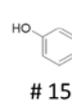
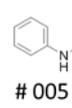
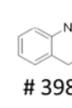
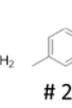
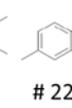
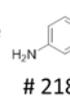
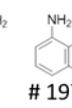
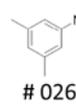
# 474



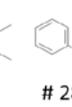
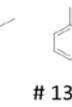
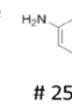
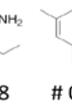
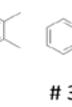
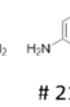
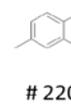
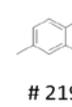
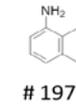
# 197



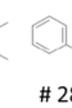
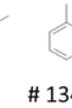
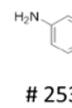
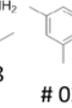
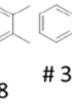
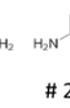
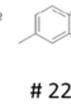
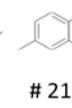
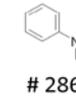
# 253



# 459

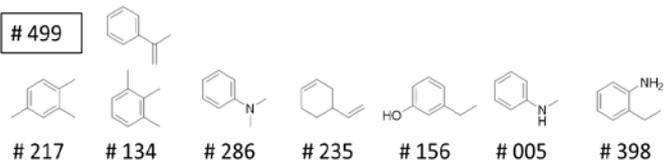
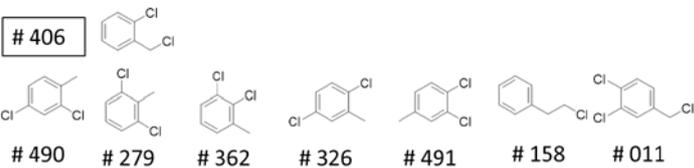
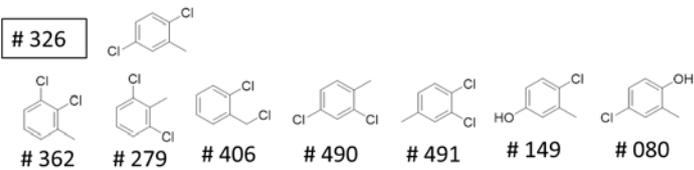
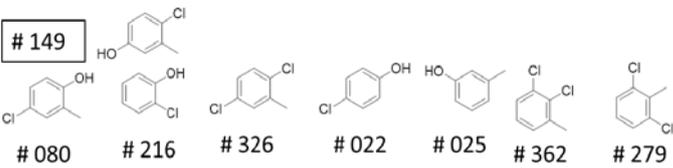
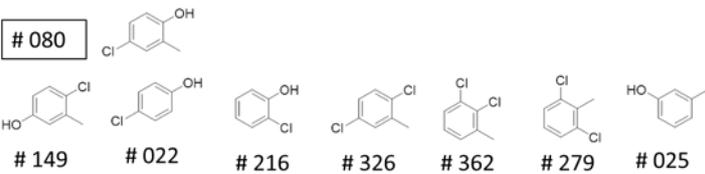
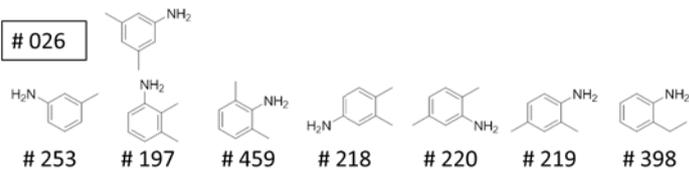
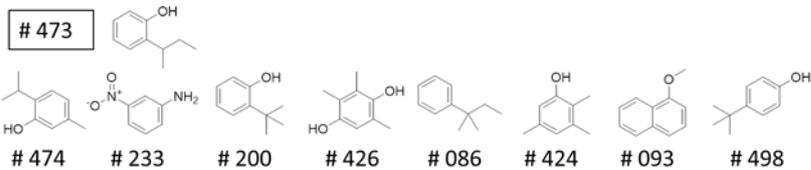
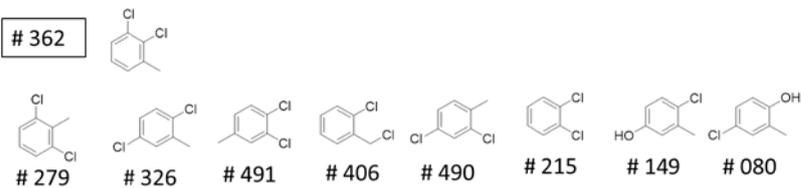
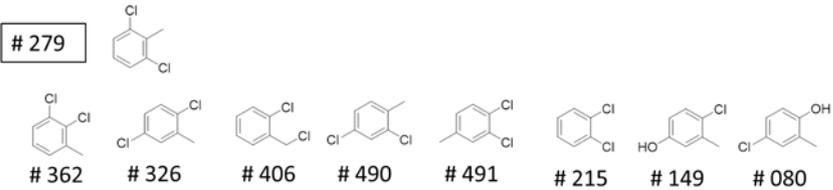


# 005



# 217





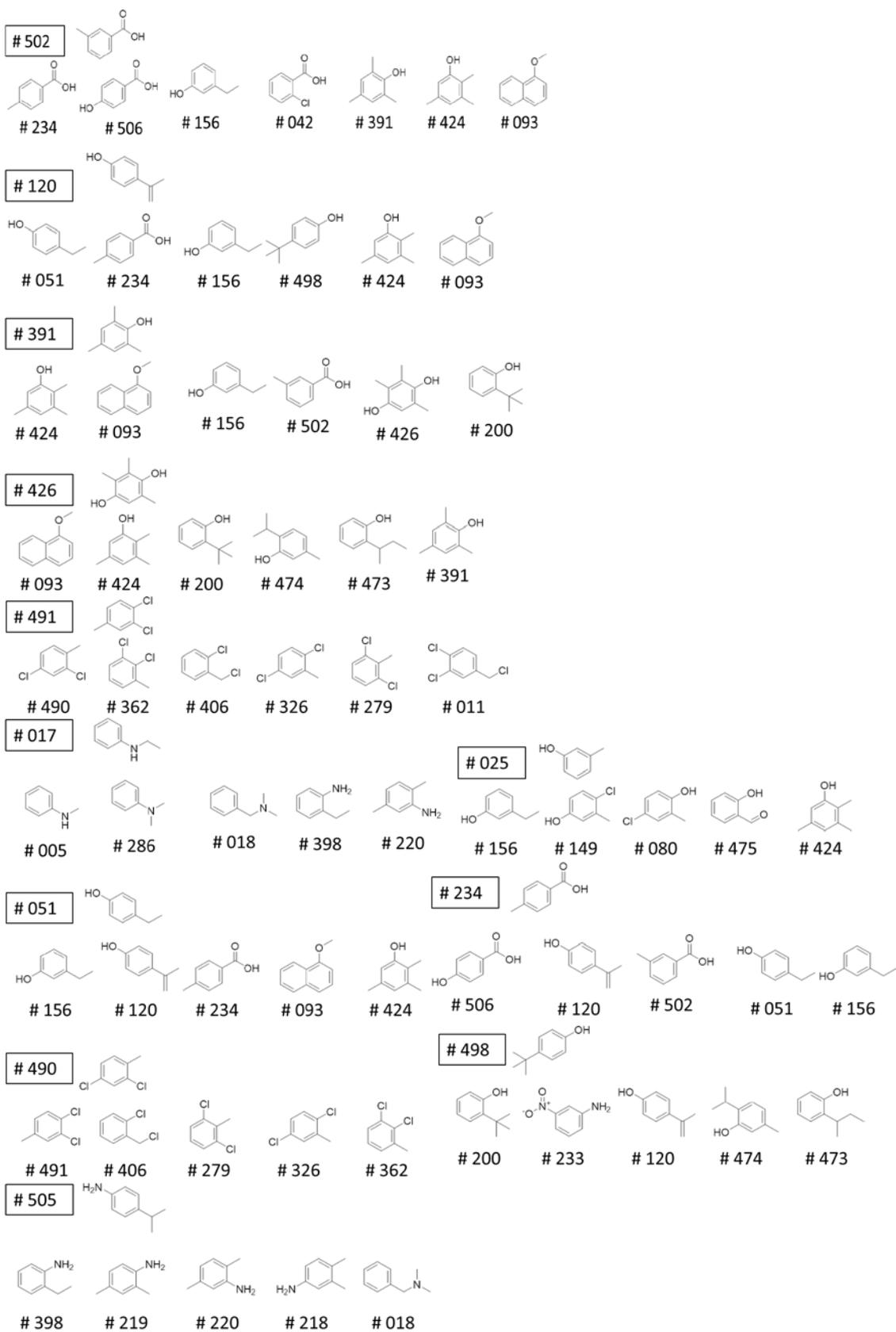


図9 記述子セットA距離の上位0.25%被験物質と近傍物質の化学構造

c) 毒性所見一致率の算出

次に、被験物質と近傍物質の毒性所見一致率（EP一致率）を評価した。例として、表22に、記述子セットA距離で閾値を0.25%としたときの被験物質の1つである#220とその近傍物質についてのEP一致率の算出方法を示した。

例えば、ある毒性所見について、被験物質が陽性（1）であるときには近傍物質の陽性（1）の割合をEP一致率として算出した。一方で、被験物質陰性（0）であるときは近傍物質の陰性（0）の割合をEP一致率として算出した。近傍物質がNT（未測定）であった場合には、その物質は除外してEP一致率を算出した。

この算出方法に基づいて#220以外の被験物質についてもEP一致率を算出した。各所見について各被験物質（記述子セットA距離の上位0.25%の場合は36物質）のEP一致率が得られたのち、その平均値を算出し、それらの値を平均一致率として表23に示した。表23には、各毒性所見について、全被験物質中の陽性物質の割合を陽性率として示した。これらの値を比較すると、平均一致率が高い値を示した毒性所見の陽性率は0%から38.9%までばらつきが見られた。例えば、T#033（血中総タンパク質レベル上昇）の陽性率は0%であり、全ての被験物質が陰性であったことが分かる。

表22 毒性所見一致率の算出例

毒性 所見	被験 物質	近傍物質													EP 一致率
	#220	#398	#197	#218	#219	#459	#026	#253	#286	#217	#005	#505	#393	#017	
T#001	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	76.92
T#013	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	NT	0	66.67
T#017	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	92.31
T#021	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	69.23
T#033	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100.00
T#035	0	0	1	0	0	0	0	0	NT	0	0	0	0	0	91.67
T#039	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	NT	0	83.33
T#043	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.69
T#120	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	69.23
T#122	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	92.31
T#131	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	84.62
T#132	1	1	1	1	0	1	1	NT	NT	0	1	1	1	1	81.82
T#172	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	76.92
T#178	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	53.85
T#216	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	30.77
T#250	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	15.38
T#367	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92.31
T#369	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	46.15
T#371	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84.62
T#373	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	69.23
T#390	0	1	1	1	0	1	1	NT	1	0	1	1	1	1	16.67

1：陽性、0：陰性、NT：未測定

表23 記述子セット A 距離の上位0.25%における各毒性所見の平均一致率と陽性率

	所見	平均一致率	陽性率
T#001	Total bilirubin ↑	79.1%	31.4%
T#013	A/G ↑	79.9%	11.1%
T#017	ALT(GPT) ↑	65.5%	19.4%
T#021	Alb ↑	80.8%	11.1%
T#033	Total protein ↑	99.4%	0%
T#035	γ-GTP ↑	87.2%	5.7%
T#039	Total cholesterol ↑	67.5%	16.7%
T#043	BUN ↑	75.1%	13.9%
T#120	HCT ↓	73.1%	30.6%
T#122	HGB ↓	84.8%	38.9%
T#131	RBC ↓	83.3%	33.3%
T#132	Reticulocyte ↑	72.5%	36.7%
T#172	Basophilic change/regeneration/degeneration	77.8%	19.4%
T#178	Eosinophilic body/hyaline droplets	59.7%	41.7%
T#216	Hypertrophy/swelling hepatocyte(centrilobular)	55.1%	33.3%
T#250	Extramedullary hematopoiesis	82.5%	27.8%
T#367	Absolute organ weight ↑	70.4%	16.7%
T#369	Relative organ weight ↑	55.5%	44.4%
T#371	Absolute organ weight ↑	66.6%	16.7%
T#373	Relative organ weight ↑	55.0%	63.9%
T#390	Relative organ weight ↑	70.4%	35.5%

80%を超えた平均一致率を赤字で示した。

反復投与毒性試験で認められる所見の陽性率は高くない（表1、表8）。そのため、近傍物質のある毒性所見が陰性であった場合、ランダムに近傍物質を選択した場合でも、陰性物質が選択される確率が高くなり、一致率は高くなる。よって、毒性所見の陽性率を考慮した一致率評価が必要と考えられた。そこで次に、期待値を考慮した一致率評価に使用される  $\kappa$  係数を本解析に応用することとした。

#### d) $\kappa$ 係数の計算

クロス表で得られたデータの一致率を評価するための指標である  $\kappa$  係数を用いることで、偶然の一致を考慮した一致率を求めることを試みた。 $\kappa$  係数は次の式で算出される。

$$\kappa \text{ 係数} = \frac{(\text{実測の一致率}) - (\text{偶然の一致率})}{1 - (\text{偶然の一致率})} \quad (-1 \leq \kappa \leq 1)$$

ここで、(実測の一致率)は、先に求めた EP 一致率を代入し、(偶然の一致率)は、近傍物質の毒性所見陽性率または陰性率に基づく期待値を代入した。

例えば、被験物質が陽性であれば、近傍物質に占める陽性物質数の割合の期待値は全449物質の陽性物質数の割合であると考え、1 (2) b) で使用した式を参考にして求めた値を(偶然の一致率)とした。同様に、被験物質が陰性であれば、近傍物質に占める陰性物質数の割合の期待値は全449物質の陰性物質数の割合であると考え、1 (2) b) の式を参考にして求めた値を(偶然の一致率)とした。また、計算の過程で、(実測の一致率)が極端に小さい場合には  $\kappa$  係数が-1を下回るということが分かったため、次のように場合分けして計算した。

I. (実測の一致率) > (偶然の一致率) のとき

$$(\kappa \text{ 係数}) = \frac{(\text{実測の一致率}) - (\text{偶然の一致率})}{1 - (\text{偶然の一致率})}$$

II. (実測の一致率) < (偶然の一致率) のとき

$$(\kappa \text{ 係数}) = \frac{(\text{実測の一致率}) - (\text{偶然の一致率})}{(\text{偶然の一致率})}$$

以上から、記述子セット A 距離の閾値0.25%の  $\kappa$  係数を算出した (表24)。

表24 記述子セット A 上位0.25%  $\kappa$  係数

	T#001	T#013	T#017	T#021	T#033	T#035	T#039	T#043	T#120	T#122	T#131	T#132	T#172	T#178	T#216	T#250	T#367	T#369	T#371	T#373	T#390
#220	0.73	-0.26	0.46	-0.20	1.00	0.17	0.18	-0.33	0.62	0.90	0.81	0.78	-0.09	0.38	0.01	-0.83	0.57	0.16	0.45	0.37	-0.81
#398	0.73	0.07	-0.01	0.02	1.00	0.17	0.18	-0.13	-0.72	0.90	0.81	0.78	-0.18	-0.49	-0.12	0.74	0.14	-0.28	0.17	-0.53	0.79
#424	1.00	0.19	0.02	0.37	1.00	0.17	-0.19	0.26	0.10	0.20	0.55	-0.43	1.00	0.00	-0.45	1.00	-1.00	-0.08	-1.00	0.32	-0.20
#093	NT	0.12	-0.15	0.32	1.00	0.09	0.11	1.00	0.02	0.13	0.51	-0.05	1.00	-0.03	-0.40	1.00	0.49	-0.15	0.67	-0.45	-0.10
#218	-0.79	-0.33	0.37	-0.27	1.00	0.00	-0.51	-0.08	0.55	0.88	0.78	0.74	-0.14	0.39	-0.22	0.69	0.49	-0.43	-0.68	0.63	0.66
#219	0.68	-0.33	0.37	-0.27	1.00	0.00	-0.51	-0.08	-0.66	0.88	-0.89	-0.87	-0.14	0.39	0.09	-0.80	0.49	-0.43	-0.68	0.63	-0.78
#286	0.47	-0.09	0.37	-0.06	1.00	NT	0.11	-0.18	0.33	0.65	0.55	NT	-0.14	-0.64	-0.09	0.49	0.00	0.14	0.02	0.26	0.55
#156	1.00	0.03	0.18	0.25	1.00	0.00	0.02	-0.10	1.00	1.00	1.00	0.30	0.35	-0.20	0.33	1.00	-0.03	0.06	0.28	-0.02	0.00
#200	1.00	1.00	-0.07	0.25	0.19	-0.11	-0.12	1.00	-0.02	0.04	0.46	-0.32	1.00	0.60	-0.29	0.09	-0.15	0.44	0.28	-0.02	-0.13
#474	0.14	0.03	-0.18	1.00	1.00	-0.11	-0.12	0.11	-0.02	0.04	0.46	-0.32	1.00	1.00	-0.29	0.09	-0.03	0.72	-0.03	-0.19	NT
#197	0.61	-0.13	0.22	-0.10	1.00	-1.00	-0.16	-0.03	0.45	0.86	0.73	0.66	-0.29	0.56	0.20	0.62	-0.39	0.48	-0.07	0.55	0.58
#253	0.74	0.01	-0.09	-0.18	1.00	-0.01	-0.16	-0.12	0.45	0.86	0.73	NT	-0.08	-0.85	-0.37	0.62	0.38	0.30	0.21	-0.55	NT
#459	-0.74	-0.13	0.22	-0.10	1.00	-0.03	-0.16	-0.12	-0.59	0.86	0.73	0.66	-0.29	0.56	0.20	0.62	-0.05	0.48	-0.07	0.55	0.58
#005	0.56	-0.16	0.13	-0.13	1.00	1.00	1.00	-0.16	0.38	0.52	0.54	0.40	0.19	0.00	0.58	0.44	0.30	-0.22	0.55	0.26	0.44
#217	-0.33	-1.00	-0.12	-1.00	1.00	1.00	-0.37	-0.16	-0.23	-0.37	-0.23	-0.32	0.19	0.50	-0.29	-0.16	-0.24	0.41	-0.48	0.75	-0.36
#279	0.14	1.00	-0.12	1.00	1.00	1.00	-0.06	-0.16	1.00	1.00	1.00	NT	-0.41	0.33	0.28	1.00	-0.24	0.22	-0.13	0.24	NT
#362	0.14	1.00	-0.12	1.00	1.00	1.00	-0.39	-0.16	1.00	1.00	1.00	1.00	0.26	0.33	0.28	1.00	0.08	0.22	-0.11	0.24	1.00
#473	1.00	1.00	-0.12	0.06	0.00	-0.17	-0.39	1.00	-0.34	-0.41	0.33	NT	1.00	0.50	-0.17	1.00	-0.09	0.31	0.55	-0.02	-0.25
#026	0.67	-0.20	-1.00	-0.18	1.00	-0.05	-0.10	-0.20	0.47	1.00	0.82	0.80	-0.16	0.62	0.39	0.68	0.20	0.33	-0.01	0.42	0.62
#080	-1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	-0.10	-0.03	1.00	1.00	1.00	1.00	0.07	-0.05	-0.39	1.00	-0.13	-0.11	0.49	-0.13	1.00
#149	0.01	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	-0.10	-0.03	1.00	1.00	1.00	1.00	0.07	-0.05	0.18	1.00	-0.13	-0.11	0.49	-0.16	1.00
#326	0.01	1.00	-0.17	1.00	1.00	1.00	0.30	-0.03	1.00	1.00	1.00	1.00	-0.49	-0.43	-0.39	1.00	0.13	0.10	-0.01	-0.42	1.00
#406	1.00	1.00	0.00	1.00	1.00	1.00	0.30	-0.03	1.00	1.00	1.00	1.00	0.66	0.62	-0.18	1.00	-0.48	-0.78	-0.21	-0.42	1.00
#499	-0.33	-0.20	-0.02	-0.18	1.00	1.00	0.30	-1.00	-0.12	-0.28	-0.30	-0.21	-1.00	0.62	1.00	-0.36	-0.21	0.33	-0.49	0.13	NT
#502	1.00	-0.04	-0.33	1.00	1.00	1.00	0.30	1.00	1.00	1.00	1.00	-0.05	1.00	0.42	0.05	1.00	0.20	0.21	0.49	0.43	-0.06
#120	1.00	1.00	-0.42	1.00	1.00	-1.00	0.18	1.00	1.00	1.00	1.00	-0.11	1.00	-0.33	-0.05	1.00	0.07	0.22	0.40	-0.02	-0.06
#391	1.00	1.00	-0.22	1.00	1.00	1.00	0.18	1.00	0.10	0.20	0.10	-0.21	1.00	0.33	-0.05	1.00	0.07	0.07	0.40	-0.33	-0.25
#426	1.00	1.00	-0.03	1.00	1.00	1.00	-0.16	1.00	-0.12	-0.21	-1.00	0.05	1.00	1.00	-0.29	1.00	0.07	0.54	0.40	-0.02	0.10
#491	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	0.18	-1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.60	-0.78	-0.29	1.00	-0.59	-0.74	-0.31	0.32	1.00
#017	0.77	-0.11	1.00	-0.08	1.00	1.00	1.00	-0.10	0.51	0.75	0.75	0.70	1.00	-0.20	0.33	0.55	1.00	-0.06	1.00	0.21	0.55
#025	-0.06	-0.11	-0.53	-0.08	1.00	1.00	-0.03	-1.00	1.00	1.00	1.00	-0.05	1.00	0.19	-0.14	1.00	-0.03	-0.06	0.28	0.19	-0.10
#051	1.00	1.00	0.30	1.00	1.00	-0.11	0.02	1.00	1.00	1.00	1.00	-0.11	1.00	-0.20	-0.14	1.00	-0.03	0.37	0.28	0.19	-0.10
#234	1.00	-0.11	-0.53	1.00	1.00	-0.11	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	NT	1.00	-0.20	1.00	1.00	1.00	-0.37	1.00	-0.19	1.00
#490	1.00	1.00	-0.07	1.00	1.00	1.00	0.02	-0.10	1.00	1.00	1.00	1.00	0.53	0.47	0.14	1.00	0.27	0.37	-0.29	0.19	NT
#498	1.00	1.00	-0.07	1.00	1.00	-0.33	0.02	1.00	-0.02	0.04	1.00	NT	1.00	0.19	0.33	1.00	1.00	0.44	1.00	-0.19	1.00
#505	0.53	0.11	1.00	0.07	1.00	1.00	-0.25	-0.10	0.26	0.75	0.51	0.52	1.00	-0.47	-0.14	0.32	1.00	0.44	-0.17	0.19	0.32

NT：未測定

e)  $\kappa$  係数を利用した毒性所見の比較：記述子セット A 距離

閾値を 0.1%、0.15%、0.2%、0.25%としたときの被験物質とその数及び近傍物質数、並びに各毒性所見について被験物質の結果（陽性、陰性又は未測定）を示した（表 25）。また、図 10 には、閾値を変化させたときの  $\kappa$  係数の変化並びに  $\kappa$  係数と陽性率の関係について座標平面上にプロットした。解析 1 と同様に、T. protein  $\uparrow$  (T#033) で高い一致が認められたが、被験物質は全て陰性であった。また、HGB  $\downarrow$  (T#122) 及び RBC  $\downarrow$  (T#131) で高い一致が認められた。ただし、閾値を広げるとこれらの  $\kappa$  係数の値は低下した。一方、閾値を広げることで  $\kappa$  係数が上昇する所見も認められた (T#250-extramedullary hem-atopoiesis、T#001-total bilirubin  $\uparrow$ 、T#017-ALT(GPT)  $\uparrow$ 、T#035- $\gamma$ -GTP  $\uparrow$  等)。

以上の結果より、同じ記述子セットを利用して近傍物質を選択した場合でも、毒性所見によって一致度 ( $\kappa$  係数) の値は大きく異なることが示された。

表 25 記述子セット A 距離における各被験物質の近傍物質数と毒性所見

被験物質	閾値	0.1%						0.15%						0.2%						0.25%																		
		#220	#253	#459	#218	#219	#197	#398	#026	#406	#156	#200	#286	#424	#093	#362	#326	#474	#279	#149	#217	#426	#491	#473	#502	#391	#490	#005	#080	#499	#120	#017	#025	#051	#234	#498	#505	
近傍物質数	0.10%	7	7	7	7	7	7	6	5																													
	0.15%	9	8	8	7	7	7	10	7	5	8	7	6	5	5	5	5																					
	0.20%	11	9	9	8	8	8	12	7	6	8	8	8	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6	5	5	5	5											
	0.25%	13	9	9	11	11	9	13	7	7	10	10	11	12	11	8	7	10	8	7	8	6	6	8	7	6	5	8	7	7	6	5	5	5	5	5	5	5
毒性所見	T#001	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	NT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1		
	T#013	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	T#017	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
	T#021	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	T#033	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	T#035	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	T#039	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	T#043	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
	T#120	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
	T#122	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
	T#131	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
	T#132	1	NT	1	1	0	1	1	1	0	0	0	NT	1	0	0	0	0	NT	0	0	1	0	NT	0	0	1	0	0	0	1	0	0	NT	NT	1	1	
	T#172	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
	T#178	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
	T#216	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T#250	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	T#367	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	T#369	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
	T#371	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
T#373	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1		
T#390	0	NT	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	NT	NT	0	0	1	0	0	0	0	NT	1	0	NT	0	1	0	0	0	0	1		
陽性数		10	8	10	10	7	15	8	12	2	4	1	8	9	1	8	2	0	4	2	5	6	4	5	0	0	7	8	2	8	4	7	3	3	0	10		
陰性数		11	11	11	11	14	6	13	9	19	17	20	11	12	19	13	19	20	15	19	16	15	17	15	21	21	13	13	19	12	17	14	18	18	20	20	11	
未測定数		0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	

1, 陽性; 0, 陰性; NT, 未試験

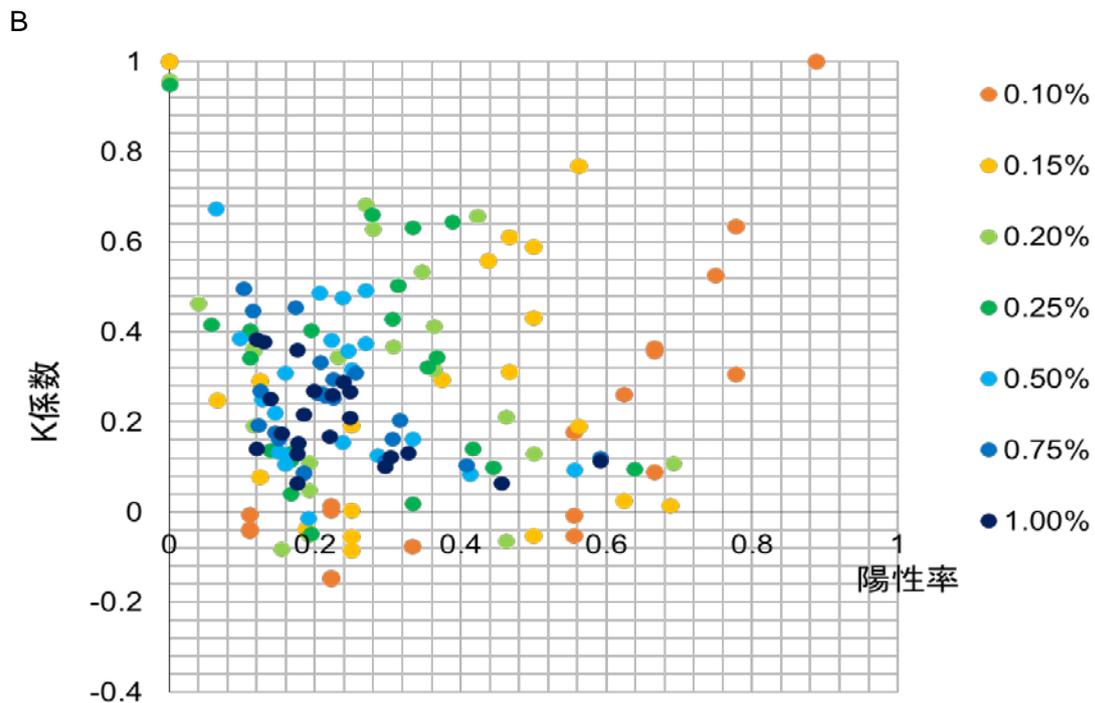
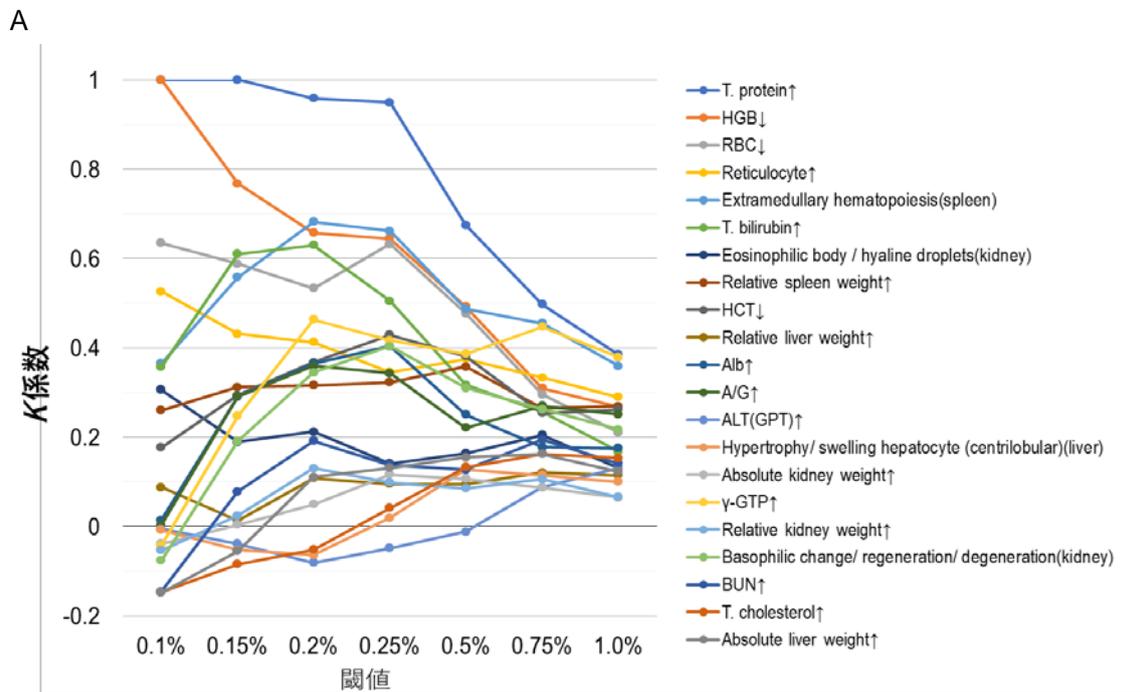


図10 記述子セット A 距離を用いた場合の  $\kappa$  係数の変化と陽性率との関係

f)  $\kappa$  係数を利用した毒性所見の比較：記述子セット B 距離

記述子セット A と同様の解析を行った。結果を表26及び図11に示した。高い  $\kappa$  係数を示した所見は記述子セット A 距離を用いた場合と若干異なり、貧血に関連する HGB↓ (T#122)、RBC↓ (T#131)、Reticulocyte↑ (T#123) で高い一致が認められ、これらは閾値を0.2%程

度まで広げても高い値を示したが、それより広げると  $\kappa$  係数は減少した。記述子セット A 距離を用いた場合と同様に、毒性所見によって一致度 ( $\kappa$  係数) は大きく異なった。

表26 記述子セット A の近傍物質数と毒性所見

閾値		0.10%										0.15%					0.20%					0.25%																						
被験物質		#253	#026	#197	#218	#219	#220	#459	#021	#215	#279	#326	#362	#490	#491	#398	#080	#149	#022	#150	#216	#025	#335	#466	#051	#156	#155	#202	#093	#323	#391	#424	#200	#498	#071	#225	#244	#285	#476					
近傍物質数	0.1%	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6																													
	0.15%	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	7	5	5	5	5	5	5																						
	0.2%	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	7	8	8	8	8	8	8	7	8	8	7	7	6	5															
	0.25%	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	7	11	11	8	8	8	8	12	10	10	12	12	6	5	10	10	10	10	8	8	7	6	6	6	6	6		
	毒性所見	T#001	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	0	0	0	0	0	0	NT	0	1	0	0		
	T#013	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
	T#017	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
	T#021	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
	T#033	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	T#035	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	T#039	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	NT	0	1	0	0	0	0	0	0	0	NT	0	0	
	T#043	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
	T#120	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	T#122	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	T#131	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	T#132	NT	1	1	1	0	1	1	0	0	NT	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	NT	0	0	0	0	0	1	0	1	0	NT	0	0	0	0	0	0	NT	0	0
	T#172	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1		
	T#178	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	T#216	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
	T#250	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	T#367	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	T#369	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	
	T#371	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	NT	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1		
	T#373	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	NT	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1		
	T#390	NT	1	1	1	0	0	1	NT	0	NT	0	0	NT	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	0	1	0	0	NT	0	NT	0	NT	0	0		
	陽性数	8	12	15	10	7	10	10	11	7	4	2	8	7	4	8	2	2	0	1	1	3	8	2	3	4	4	0	1	13	0	9	1	0	2	4	10	6	2					
	陰性数	11	9	6	11	14	11	11	9	14	15	19	13	13	17	13	19	19	21	20	20	18	13	18	18	17	17	19	19	6	21	12	20	20	17	17	8	15	19					
	未測定数	2	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	2	0	0	0	1	2	0	3	0	0				

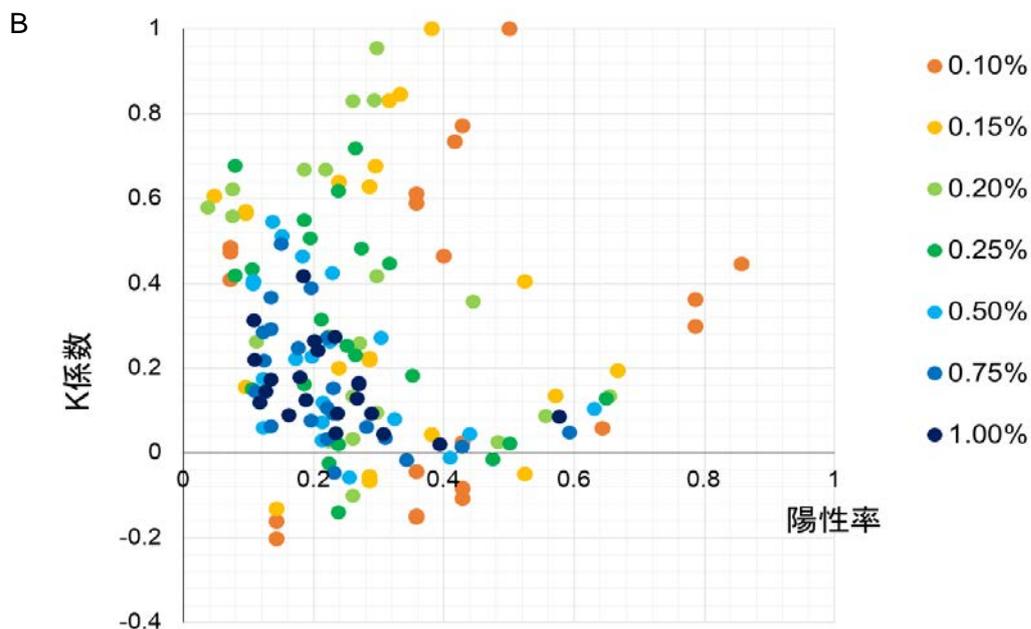
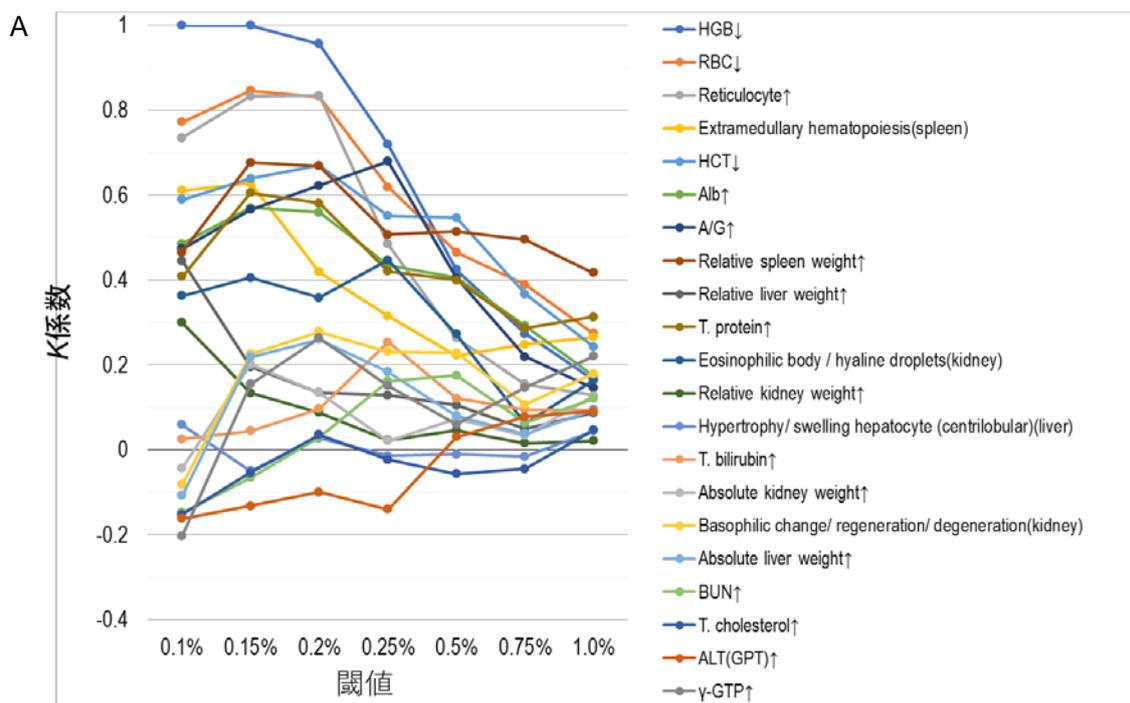


図11 記述子セットBの  $\kappa$  係数の変化と陽性率との関係

g) 各記述子セットを用いた場合の毒性所見一致度の比較

各記述子セットを用いた物質間距離により被験物質及び近傍物質を選択し、毒性所見の一致度を  $\kappa$  係数として計算して記述子セット間で比較した (図12)。それぞれの記述子セットで対象とした被験物質の数を表27に示した。

記述子セット C、D 及び E では、記述子セット A 及び B を用いた場合に比べて一般に一致度は低かった。記述子セット E に関しては、記述子セット A の記述子から相関性の高い記述子を除いたセットであり、代表的な記述子を選択したと考えられるが、記述子セット A 距離で比較的高い一致度を示した貧血関連所見においても、記述子セット E 距離を用いた場合では低い一致度しか示さなかった。なお、T. protein↑ (T#033) は記述子セット E 距離でも比較的高い  $\kappa$  係数を示したが、前述の通りこの所見はほぼ全ての被験物質で陰性であった。

以上の結果から、毒性所見によって一致度 ( $\kappa$  係数) は大きく異なるが、そのパターンは用いる記述子セットにより異なり、適切な記述子セットを使用しないと、高い一致度が得られないことが示された。

表27 各記述子セット距離の閾値0.25における被験物質数

記述子セット	A	B	C	D	E
被験物質数	36	38	30	35	33

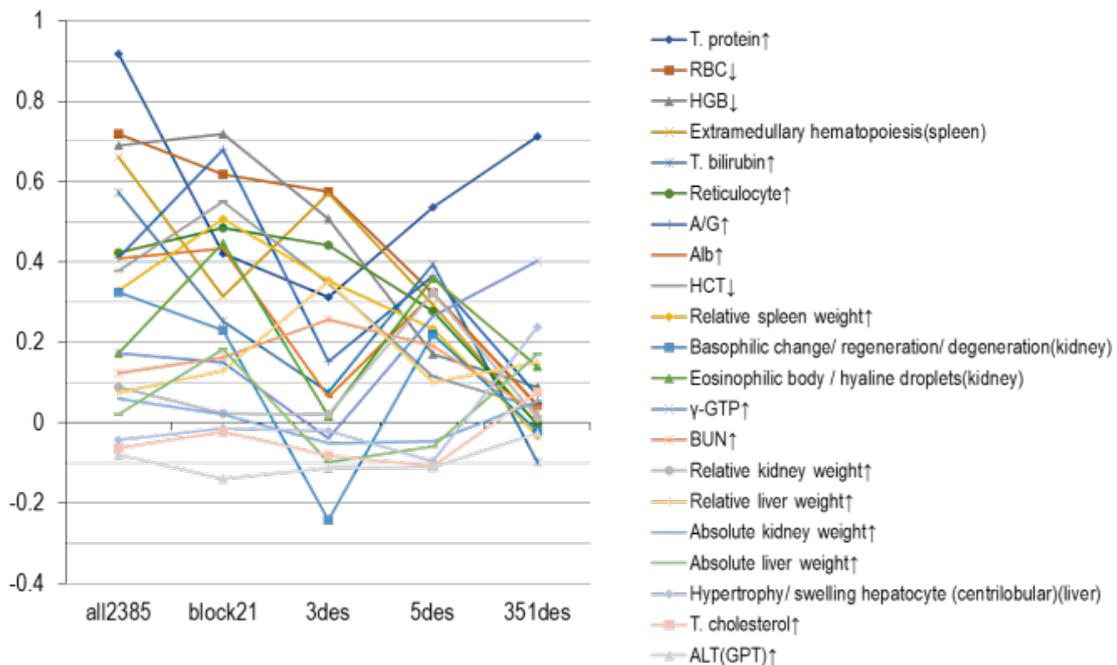


図12 各記述子セット距離の閾値0.25における  $\kappa$  係数

### 3 研究項目名 : *In silico* 評価に適した毒性データベースと評価支援ツールの検証

(1) 個別課題名 : 毒性データベースに必要な情報の検討 (頭金正博 (名古屋市立大学))

機械学習を用いた (Q) SAR アプローチの結果から、予測対象とするエンドポイントによって収集可能なデータ数が異なり、モデル構築においてデータ数不足や不均衡データ等

の問題が生じることが明らかになった。肝臓や腎臓に関して、臓器の重量増加や何らかの病理組織学所見を示す物質は多かったが、ALT 上昇や AST 上昇、Cre 上昇、BUN 上昇が見られた物質は少なかった（表 5、表 6）。これは、今回使用した HESS の反復投与毒性試験データベースは化審法既存化学物質等の一般化学物質のデータであるため、対象化学物質には毒性学的に影響の少ない物質が多いことが理由と考えられる。一般的に、機械学習による分類予測モデルでは使用可能なデータ数が多いこと、陽性、陰性（正例、負例）の偏りが少ない均衡データであることは、高い予測性能を得るために重要だと考えられる。つまり、*in silico* 評価で使用する毒性データベースでは、データ数が多いことが望ましく、特に毒性学的な影響が見られる物質（陽性物質）のデータが入手できることが重要だと考えられる。

また、予測モデルを構築する際に、毒性データベースから得られる情報を用いて陽性物質・陰性物質を定義する必要がある。ここで、毒性学的根拠を基に客観性の高い条件を設定することが重要であり、HESS データベースでは LOEL 値、NOEL 値の情報から定義することができた。以上より、毒性データベースには化学物質の毒性の有無または強さを判定する情報が必須である。また、LOEL 値等を使用する場合、閾値設定を対象物質やエンドポイントに応じて検討することも必要だと考えられる（表 13）。

さらに、今回は HESS のサブデータベースである TGP データを用いて、予測モデルの汎用性を確認するために外部検証を行ったが、使用可能な外部検証用物質が少なかった（表 12）。また、外部検証に用いた医薬品中心の TGP データとモデル構築に用いた化審法既存化学物質等の一般化学物質では、反復投与毒性試験のデザインが異なる可能性が高く、試験期間や測定した毒性所見項目が共通しているかなど、データ背景の類似性の確認が重要であることがわかった。予測モデルの構築では、モデル構築用のデータとは別に汎用性を確認するために独立したデータが準備できることが望ましく、毒性データベースにはデータ背景が共通する物質、例えば用途が同じ物質等のデータが多く存在することが必要である。しかし、現実的には様々なデータ背景の毒性試験情報を収集することが多いため、今後の課題として毒性データベースにおいて必要な毒性所見項目や試験情報を明示し、均一なデータを収集する検討が必要だと思われる。

カテゴリーアプローチの検討結果から、分子記述子を利用した計算科学に基づいた新たなリードアクロス手法の開発においては、使用するデータベース内に一定数の類似物質が含まれている必要があり、今回利用した HESS に含まれる 450 物質程度のデータセットでは、限られた化学物質においてのみリードアクロスの検討が可能な類似物質（本研究で定義した「近傍物質」）が存在した。したがって、客観性の高いリードアクロスを実施するには、できる限り多くの物質が含まれるデータベース、あるいは特定の部分構造を有する物質群を多く含む構造限定的なデータベースを用意する必要があると考えられた。

さらに、リードアクロスの評価の検討結果より、毒性所見の陽性率が評価結果に影響を及ぼす可能性が示された。今回用いた HESS データベースに含まれる化学物質は、化審法既存点検物質を中心とする一般化学物質であり、生体での作用発現を目的とした物質ではない。そのため、多くは毒性学的に影響の少ない物質であり、ラット反復投与毒性試験においても毒性影響を示さない物質が多い。多くの所見における陽性物質数の割合は、最も高い相対肝重量増加で 51%であったが、続く順位の陽性率は 36%、30%、28%と必ずしも

高くないことからそのことが分かる。これらの毒性学的なインバランスの問題を解決するために本研究では新たな評価指標 ( $\kappa$  係数) を活用したが、その妥当性は今後の検証が必要である。この毒性学的インバランスは、リードアクロスだけでなく QSAR アプローチによる毒性予測においても問題であることから、現実的には整備は困難であるが、このインバランスを解決したデータベース、すなわち毒性学的影響が大きい化学物質を多く含むデータセットが本研究のようなインシリコ解析には望ましいと考えられる。

農薬や医薬品等の製剤ではしばしばラセミ体等の混合物であることも多いため、毒性試験データベースに含まれる試験結果は、これら混合物を用いた結果であることもある。しかしながら、分子記述子は、単一の化学物質に対してのみ計算可能であることから、毒性試験データに含まれる化学物質の性状や純度に関する情報が適切に整備されている必要がある。また、現在汎用されている記述子計算ソフトウェアでは、金属を含む化合物についても、分子記述子を計算することができない。したがって、分子記述子を利用した機械学習による (Q) SAR 予測やリードアクロスに応用可能なデータベースは混合物や金属含有化合物のデータをできるだけ含まないものが望ましいと考えられる。

公開されている動物実験データは限られており、また動物実験の削減が望まれている社会情勢を考えると、これから新たな毒性試験データが大量に得られるとは考えにくい。したがって、既存の動物実験データを収集し、本検討に活用可能な形で整理することが望まれる。食品安全委員会が公開している農薬評価書には反復投与毒性試験を含む多くの動物実験データが含まれ、農薬の特性上構造的に類似した物質群の動物実験データを収集することが可能である。また、農薬は植物や微生物等で何らかの生理機能を発現することを意図して創製された化学物質であることから、HESS データベースに含まれる化学物質に比較すると実験動物に対する毒性学的影響も大きいと予想される。今後これらデータを利用した検討が必要と考える。

## (2) 個別課題名：評価支援ツール活用方法の検討 (頭金正博 (名古屋市立大学))

機械学習を用いた (Q) SAR によるケーススタディにおいて、本研究で対象とした肝毒性、腎毒性、血液毒性において一定の性能を示す予測モデルが構築できた。肝毒性、腎毒性では、内部検証において「重量増加かつ病理組織学的所見」を予測対象としたモデルの性能が高かったことから、毒性所見を適切に組み合わせた場合、高性能なモデルの構築が可能であることが示唆された (表 9、表 10)。また、データ不均衡の解消方法として SMOTE を用いた場合に、予測モデルの性能が大きく向上するエンドポイントが確認された。*in silico* 評価では不均衡データを扱うことが多いため、評価指標についてもよく吟味し、モデルを使用する目的やデータの中身を考慮して評価を行う必要があると考えられる。本研究では毒性所見を適切に組み合わせることや、SMOTE によるデータ不均衡の解消により、予測モデルの性能が大きく向上するエンドポイントが確認されたことから、*in silico* 評価の支援ツールを使用する際はデータベースから得られるデータを適切に処理するための工夫が重要だと考えられる。また、適用領域の設定により外部データについても予測可能な汎化能力の高いモデルが構築できることが示唆された (表 12)。

HESS に含まれるラット反復投与毒性試験データを利用したカテゴリーアプローチ/リードアクロスの検討の結果、ある記述子セットを利用した場合に貧血関連の毒性所見に

関するリードアクロスの精度が比較的高くなることが示された。他の毒性所見に比べて貧血関連所見の精度が高かった理由は現時点で明確ではないが、アニリンやフェノールなどの比較的単純な構造を有する物質が貧血を誘発することが知られており、本研究で用いたデータセットの中にアニリンやフェノール骨格を有する化合物が多く含まれていたことが一因となっているのではないかと考えている。実際、本研究で設定した基準で選択した被験物質や近傍物質には多くのアニリン及びフェノール類似物質が含まれていた(図9)。また、用いた記述子セットでは、官能基関連記述子である記述子セットBで貧血関連所見の高い一致度が認められた。以上のことから、外部物質を用いた検証を今後実施する必要はあるが、本研究で用いた HESS データベースと分子記述子セット、特に記述子セット B は、貧血に関連した血液毒性のリードアクロスに有用である可能性が示された。

また、毒性評価において1種類だけのアプローチで判断するのは困難であり、複数のアプローチの結果を総合して結論を出すことが望ましいため、確立された(Q)SAR やカテゴリールアプローチ手法を組み合わせた評価を今後検討することが重要な課題である。

(3) 個別課題名： *In silico* 評価用データセットへのフィードバック (頭金正博 (名古屋市立大学))

機械学習を用いた(Q)SARによる毒性予測の結果を踏まえて肝毒性、腎毒性、血液毒性の *in silico* 評価用データセットをそれぞれ Microsoft Excel のワークシート上で整理した。ワークシートには、CAS 番号、物質名、SMILES、各毒性所見の陽性・陰性判定、モデルに使用した記述子の値が記載されている。次に、リレーショナルデータベースソフトとして FileMaker を使用して肝毒性、腎毒性、血液毒性の *in silico* 評価用データセットのデータベース化を行った。FileMaker は必要なデータを指定し、取り出すことが得意であり、構築したデータベースではモデル構築に使用した計 680 物質について対象としたエンドポイントの陽性・陰性定義が表記され、各ワークシートにリンクしている(図13)。このデータベースは、肝毒性、腎毒性、血液毒性の共通点等の検討や、新たな評価支援ツールの検討において非常に有用だと考えられる。また今後、物質数やエンドポイントを増やすことで、*in silico* 評価に適したデータベースの基盤となることが期待される。

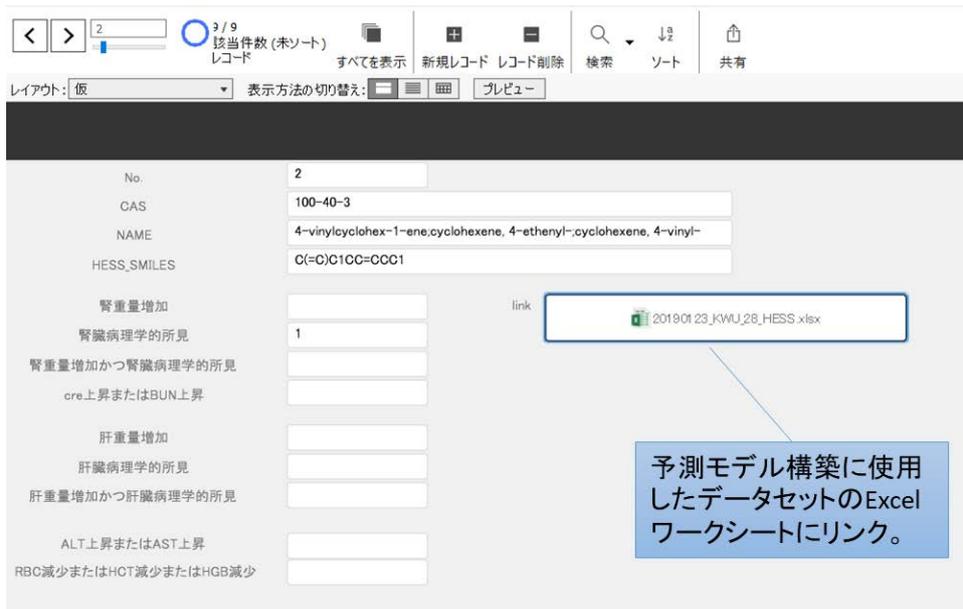


図 13 FileMaker を用いた *in silico* 評価用データセットのデータベースの仕様

## (2) 研究全体の成果、考察及び結論

本研究では、HESSの反復投与毒性試験データベースを用いて、*in silico*評価のケーススタディが可能な毒性所見項目を抽出し、機械学習を用いた(Q)SARによる毒性予測モデルの構築と統計的手法を利用した新規*in silico*リードアクロス手法の開発を行った。これらのケーススタディの結果から、*in silico*評価に最適な毒性所見やデータの質と量等を検討し、データベースに追加すべき情報や評価支援ツールの特性を明らかにすることを目指した。

HESS の反復投与毒性データベースを利用し、ラットの肝毒性、腎毒性、血液毒性に関する毒性所見項目を抽出した。*in silico* 評価のケーススタディに最適な毒性所見項目を選択し、LOEL 値等を使用して毒性有り、無しに該当する化学物質を判別した。各毒性所見項目について、毒性の有無と該当する化学物質の構造情報を取り入れた、*in silico* 評価用のデータセットを作成した。このデータセットは FileMaker を用いて整理しており、*in silico* 評価のためのデータベースの基盤として有用になるとと思われる。

次に、機械学習による(Q)SAR モデルを用いて肝毒性、腎毒性、血液毒性予測のケーススタディを行った。肝毒性では「肝重量増加かつ病理組織学的所見」について RF による予測モデルを構築したところ、MCC 0.56、AUC 0.84 と高い予測性能が得られた。また、「ALT 上昇または AST 上昇」のモデルでは SMOTE により大幅な予測性能の向上が見られた。腎毒性では「腎重量増加かつ病理組織学的所見」のモデルでは MCC 0.63、AUC 0.89 と高い予測性能が得られた。「Cre 上昇または BUN 上昇」のモデルでは SMOTE により大幅な予測性能の向上が見られた。以上、肝毒性、腎毒性の「重量増加かつ病理組織学的所見」を予測対象としたモデルの性能が高かったことから、毒性所見を適切に組み合わせた場合、高性能なモデルの構築が可能であることが示唆された。また、陽性物質数と陰性物質数が不均衡な場合に SMOTE による不均衡解消により、予測性能の向上が見られた。さ

さらに、外部検証の結果から、適用領域を設定した場合外部データにおいても予測性能を維持できる汎化能力の高いモデルが構築できた。

さらに、HESSに搭載されているラット反復投与毒性試験データを使用して、分子記述子に基づく物質間距離を利用したリードアクロスの可能性を検討した。ランダムに抽出した検証物質とその近傍物質の比較解析の結果、同じ検証物質でも記述子セットにより近傍物質の種類が異なったことから、各記述子セットが異なる化学物質の構造的特徴を捉えていると考えられた。さらに、毒性EPの比較の結果、EP一致率は陰性物質で高いこと、検証物質及び記述子セットにより大きく異なることが明らかになった。したがって、分子記述子を基盤としたグルーピングやリードアクロスを実施する際には、EPに応じて適切な分子記述子を選択する必要があることが示唆された。また、対象とする物質の種類によって、真に近傍物質と考えられる物質の数に大きな違いが認められた。これは、単に近傍物質としてケミカルスペース上で近傍の物質を選択したとしても、対象とする物質や近傍を定義するために用いる記述子が異なると、構造的に全く異なるものが近傍物質として選択される可能性があることを意味している。したがって、閾値などを設定して、近傍物質を適切に定義し、選択する必要があると考えられた。

そこで次に、物質間距離を元に近傍物質を選択してリードアクロスを実施した。具体的には、全ての物質についてデータセットの残りの物質との距離を計算し、次に物質間距離に閾値を段階的に設定し、その閾値内に含まれる物質を全て近傍物質とした。これにより、化学的に一定の類似度を有する物質のみを近傍物質とすることができたが、使用したデータセットに含まれる物質数が限られていたため、必ずしも十分な数の近傍物質数を得られず、リードアクロスの評価を行うことができない物質も多くなった。本研究では十分なリードアクロスを行うために5物質以上の近傍物質が必要と判断して被験物質を選択したが、閾値0.25%の場合には評価を実施できたのは30物質程度だった。

毒性所見の一致率の評価においては、多くの物質で測定されかつある程度の物質で陽性が認められた代表的な21所見を対象とした。所見によって陽性率に大きな差が認められ、この差が毒性所見の一致率に影響している可能性があったことから、期待値を加味した一致率評価に用いられている $\kappa$ 係数を導入して評価を行った。その結果、同じ記述子セットを用いた場合にも毒性所見によってリードアクロスの精度( $\kappa$ 係数による一致度)は大きく異なること、また同じ毒性所見でも距離計算に利用する記述子セットによりリードアクロスの精度が異なることが示された。したがって、本手法のように分子記述子を利用して統計的なリードアクロスを行う際には、所見ごとに適切な記述子セットを選択する必要があると考えられた。また、近傍物質を選択する際に閾値を上げすぎると精度が低下したことから、用いる毒性所見やデータセットに応じて適切な閾値を選択する必要があると考えられた。

今回解析対象とした毒性所見の中では、貧血関連の所見で比較的高い一致度が得られた。これは用いたデータベースの中に、貧血を起こすことが知られているアニリンやフェノールに類似した物質が多く含まれ、リードアクロスを行う上で十分量の適切な近傍物質を選択することができたことが理由と考えられた。

最後に、上記のケーススタディの結果から *in silico* 評価に適した毒性データベースと評価支援ツールの検証を行った。*In silico* 評価で使用する毒性データベースについて、

データ数が多いことが望ましく、特に毒性学的な影響が見られる物質（陽性物質）のデータが入手できることが重要だと考えられる。また、客観性の高いリードアクロスを実施するには、できる限り多くの物質が含まれるデータベース、あるいは特定の部分構造を有する物質群を多く含む構造限定的なデータベースを用意する必要があると考えられた。さらに、*in silico* 評価において外部検証用データの確保等、データを増やすことは重要であり、今後の課題として毒性データベースにおいて必要な毒性所見項目や試験情報を明示し、既存の動物実験データを収集し、本検討に活用可能な形で整理することが望まれる。一方、評価支援ツールについて、機械学習として RF を用いた (Q)SAR による予測モデルでは、データを適切に処理するための工夫を行うことで高性能の予測が可能となった。また、統計的手法を利用した新規 *in silico* リードアクロス手法において、HESS データベースと使用した分子記述子セットは貧血に関連した血液毒性のリードアクロスに有用である可能性が示された。

以上より、本研究では HESS の反復投与毒性試験データベースを用いて、ラットの肝臓、腎臓、血液に関する毒性所見項目を抽出し、機械学習を用いた (Q)SAR 手法ならびに統計的手法を利用した新規 *in silico* リードアクロスによる毒性予測モデルを構築し、ケーススタディを行った。さらに、ケーススタディの結果から、*in silico* 評価に適した毒性所見やデータの質と量等を検討し、データベースに追加すべき情報や評価支援ツールの特性を明らかにした。これらの成果は、食品健康影響評価において不可欠な毒性データに関する情報や、評価支援ツールの活用法に資する情報であり、*in silico* 評価手法の確立に向けて非常に重要だと考えられる。

### III 本研究を基に発表した論文等

- 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（※別添として別刷（投稿中のものは、受理証明書の写し）を提出すること。また、査読付きの場合は、雑誌名の冒頭に◎を付すこと。）
  - 1) Ambe K, Sakakibara Y, Sakabe A, Makino H, Ochibe T, Tohkin M. Comparison of the developmental/reproductive toxicity and hepatotoxicity of phthalate esters in rats using an open toxicity data source.  
◎ *J. Toxicol. Sci.* **44**, 245-255 (2019).
- 2 本研究を基にした学会発表の実績
  - 1) Tatsuya Ochibe, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: Machine learning models for predicting hepatotoxicity and renal toxicity based on HESS toxicological test database. NCU アジア拠点校シンポジウム 2019 (2019. 12) (名古屋)
  - 2) 柄久保善博、橘内陽子、竹下潤一、渡邊美智子、佐々木崇光、保坂卓臣、吉成浩一：分子記述子を用いたリードアクロスによる反復投与毒性予測評価の検討 日本動物実験代替法学会 第 32 回大会 (2019. 11) (つくば)
  - 3) Tatsuya Ochibe, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: *In silico* models for predicting hepatotoxicity and renal toxicity based on HESS database. CBI 学会 2019 年会 (2019. 10) (船堀)

- 4) Yoko Kitsunai, Jun-ichi Takeshita, Michiko Watanabe, Takuomi Hosaka, Ryota Shizu, Takamitsu Sasaki, Kouichi Yoshinari: Read-across approach using molecular descriptors for the prediction of rat repeated-dose toxicity. EuroTox 2019, Helsinki, Finland, September, 2019.
- 5) Tatsuya Ochibe, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: *In silico* models for predicting of the repeated dose toxicity based on HESS database. 第15回国際毒性学会 ICT XV 2019, Honolulu, Hawaii, July 15-18, 2019.
- 6) 落部達也、安部賀央里、頭金正博 機械学習法を利用した化学物質誘発性腎毒性の予測 第1回医薬品毒性機序研究会 (2019.1) (名古屋)
- 7) 橋内陽子、竹下潤一、渡邊美智子、佐々木崇光、保坂卓臣、吉成浩一 計算科学に基づくリードアクロスによる反復投与毒性予測評価手法の開発 日本動物実験代替法学会 第31回大会 (2018.10) (熊本)

3 特許及び特許出願の数と概要  
該当なし

4 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

- 1) NCU アジア拠点校シンポジウム 2019 Best poster award 受賞(2019.12) (名古屋) : Tatsuya Ochibe, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: Machine learning models for predicting hepatotoxicity and renal toxicity based on HESS toxicological test database.
- 2) 日本動物実験代替法学会 第32回大会 学生優秀演題賞受賞 (2019.11、つくば) : 栃久保善博、橋内陽子、竹下潤一、渡邊美智子、佐々木崇光、保坂卓臣、吉成浩一、分子記述子を用いたリードアクロスによる反復投与毒性予測評価の検討

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) 研究項目1 : <i>In silico</i> 評価に最適化したデータベースに必要な要件に関する検討 ・ HESS 等の毒性データベースを使用して反復投与毒性試験の情報を収集し、代表的な毒性 (肝毒性など) について毒性所見項目の特徴解析を行い、 <i>in silico</i> 評価のケーススタディに最適な毒性所	5	ケーススタディに必要な毒性所見項目について抽出し、 <i>in silico</i> 評価用データセットを作成しており、研究目標を十分に達成している。

見項目を抽出する。		
<p>(2) 研究項目 2 : (Q)SAR とカテゴリーアプローチによるケーススタディ</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>研究項目 1 で抽出した毒性所見項目ごとに (Q)SAR やカテゴリーアプローチ、また複数の評価支援ツールの組合せによる毒性予測を行い、各評価支援ツールの特性を明らかにする。</li> <li>HESS を活用し、分子記述子等を利用して化合物の類似性を客観的に評価可能な統計手法を検討し、新規リードアクロス手法を開発する。</li> </ul>	4	機械学習を用いた (Q)SAR 手法や統計的手法に基づいたカテゴリーアプローチによる毒性予測を行った。肝毒性、腎毒性、血液毒性のケーススタディにより毒性データベースの活用方法を検討しており、研究目標を概ね達成している。
<p>(3) 研究項目 3 : <i>In silico</i> 評価に適した毒性データベースと評価支援ツールの検証</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>研究項目 2 の結果に基づいて、高精度な予測が可能な毒性所見項目、必要なデータ数、またカテゴリーについて検証する。</li> <li>評価支援ツールについて、複数の方法の組合せ等、具体的な活用法を検討する。</li> <li>毒性データベースと評価支援ツールを活用した迅速かつ信頼性の高い <i>in silico</i> 評価手法の確立に向けた戦略を提示する。</li> </ul>	5	ケーススタディの結果から毒性データベースに必要な情報の検討や、評価支援ツール活用法の検討を行った。FileMaker を利用した <i>in silico</i> 評価用データセットの整理も行い、研究目標を達成している。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

## 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	毒性所見項目の抽出や (Q)SAR やカテゴリーアプローチによるケーススタディは目標を

		達成した。また、ケーススタディの結果から、データベースと評価支援ツールの検証を行い、目標を達成している。
(2) 研究成果の有用性	5	本研究では、反復投与毒性試験のデータベースである HESS を用いた(Q)SAR やカテゴリーアプローチによるケーススタディから、実用的な <i>in silico</i> 評価に必要なデータベースの情報や評価支援ツールの特性を明らかにした。これらの知見は <i>in silico</i> 手法を適用させるために有用であり、食品健康影響評価の迅速化や信頼性の向上に貢献できる。

総合コメント

本研究ではHESSの反復投与毒性試験データベースを用いて、肝臓、腎臓、血液に関する毒性所見項目を抽出し、機械学習を用いた(Q)SARや統計的手法を利用した新規*in silico*リードアクロス手法による毒性予測モデルを構築した。これらのケーススタディの結果から、*in silico*評価に適した毒性所見やデータの質と量等を検討し、データベースに追加すべき情報や評価支援ツールの特性を明らかにした。本研究で得られた知見は、食品健康影響評価において不可欠な毒性データに関する情報や、評価支援ツールの活用法に資する情報であり、*in silico*評価手法の確立に向けて非常に重要だと考えられる。

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

※次のただし書を枠で囲って記載すること。

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。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。

(別紙) 研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Study on the development of new evaluation support technology: Examination of database utilization method for toxicity prediction
Research project number	(1801)
Research period	FY 2018 – 2020
Name of principal research investigator (PI)	Masahiro Tohkin

### Abstract/Summary

It is desired to establish the *in silico* prediction methods that predict the toxicity of chemical substances using open database of the toxicity test information. However, the prediction of the repeated-dose toxicity (RDT) has difficulties because of the complexity of mechanism, the diversity of chemical structure, and the lack of information on toxicity test. Therefore, the practical application of *in silico* prediction has not been achieved. The aims of this study were to examine the optimal toxicity findings and necessary data for *in silico* prediction in the RDT studies, and to clarify the necessary information to be added to the toxicity database and the characteristics of the prediction tools. First, we extracted toxicological findings from the toxicity database for the *in silico* prediction model construction. Next, we conducted a case study of the (Q) SAR prediction model and the category approach prediction model using the extracted toxicological findings from the toxicity database. Finally, we verified the toxicity database and evaluation support tools suitable for *in silico* evaluation.

We extracted toxicological findings from rat hepatotoxicity, nephrotoxicity, and hematologic toxicity using the RDT study database of HESS. For each toxicological finding, we created a data set for *in silico* evaluation, which included the presence or absence of toxicity and the structural information of chemical substances. This dataset has been organized using FileMaker and will be useful as a database basis for *in silico* evaluation.

Next, we conducted a case study of the prediction of hepatotoxicity, nephrotoxicity, and hematologic toxicity from molecular descriptors using (Q) SAR model based on machine learning. For the hepatotoxicity, we constructed the prediction model by random forest (RF) for "increased liver weight and histopathological findings", and obtained the high prediction performance with MCC 0.56 and AUC 0.84. In the case of nephrotoxicity, the model of "increased kidney weight and histopathological findings" showed high predictive performance of MCC 0.63 and AUC 0.89. It was suggested that a high-performance model could be constructed by properly combining toxicological findings. In addition, the prediction performance was significantly improved in the models of "ALT rise or AST rise" and "Cre rise or BUN rise" due to the elimination of data imbalance by SMOTE. Furthermore, by

setting the applicability domain, we have constructed a model with high generalization ability that can maintain prediction performance even with external data.

Using the HESS RDT study database, we evaluated a novel statistical read-across method, in which the similarity among chemicals were calculated using various sets of molecular descriptors. In this evaluation, we selected major RDT endpoints related to liver and kidney toxicity and anemia. The number of the compounds evaluated were limited because of the introduction of thresholds for the similarity judgement. The results indicate that the dataset and descriptors used might be applicable to the evaluation of anemia-related endpoints. This is partly because the dataset contains a number of compounds related to known anemia-inducing anilines and phenols. The results also indicate that even for a given endpoint the accuracy of toxicity evaluation depended on the set of molecular descriptors and that even when the same descriptor set was used, the evaluation accuracy varied depending on the target endpoint. Taken together, we have demonstrated that it is important to select appropriate descriptors and to set an appropriate threshold for similarity judgement depending on datasets and target endpoints in our statistical read-across approaches.

Finally, we verified the toxicity database and evaluation support tools suitable for *in silico* evaluation from the results of the case study. Regarding the toxicity database for *in silico* evaluation, it is important to obtain the data on substances that have toxic effects (positive substances). In addition, it is necessary to prepare a database that contains as many substances as possible, and structure-limited database that contains many substance groups with specific partial structures in order to carry out highly objective read-across. With regard to the evaluation support tools, the prediction model by (Q) SAR using RF as machine learning enabled high-performance prediction by devising to properly process the data. In addition, it was shown that the HESS database and specific molecular descriptors may be useful for the read-across of hematologic toxicity associated with anemia in the novel *in silico* read-across method using statistical methods.

The results of this research provides the criteria for the indispensable toxicity dataset and the evaluation support tools in the food safety risk assessment, and these information are very important information for *in silico* evaluation method.

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

- 1) Ambe K, Sakakibara Y, Sakabe A, Makino H, Ochibe T, Tohkin M. Comparison of the developmental/reproductive toxicity and hepatotoxicity of phthalate esters in rats using an open toxicity data source. © *J. Toxicol. Sci.* **44**, 245-255 (2019).

## 2. List of presentations based on this research

- 1) Tatsuya Ochibe, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: Machine learning models for predicting hepatotoxicity and renal toxicity based on HESS toxicological test database. NCU Contact Points in Asia Symposium 2019 (2019.12) (Nagoya)
- 2) 栃久保善博、橘内陽子、竹下潤一、渡邊美智子、佐々木崇光、保坂卓臣、吉成浩一 分子記述子を用いたリードアクロスによる反復投与毒性予測評価の検討 日本動物実験代替法学会 第32回大会 (2019.11) (つくば)
- 3) Tatsuya Ochibe, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: In silico models for predicting hepatotoxicity and renal toxicity based on HESS database. CBI 2019 (2019.10) (Funabori)
- 4) Yoko Kitsunai, Jun-ichi Takeshita, Michiko Watanabe, Takuomi Hosaka, Ryota Shizu, Takamitsu Sasaki, Kouichi Yoshinari: Read-across approach using molecular descriptors for the prediction of rat repeated-dose toxicity. EuroTox 2019, Helsinki, Finland, September, 2019.
- 5) Tatsuya Ochibe, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: In silico models for predicting of the repeated dose toxicity based on HESS database. ICT XV 2019, Honolulu, Hawaii, July, 2019.
- 6) Tatsuya Ochibe, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin 機械学習法を利用した化学物質誘発性腎毒性の予測 第1回医薬品毒性機序研究会 (2019.1) (Nagoya)
- 7) 橘内陽子、竹下潤一、渡邊美智子、佐々木崇光、保坂卓臣、吉成浩一 計算科学に基づくリードアクロスによる反復投与毒性予測評価手法の開発 日本動物実験代替法学会 第31回大会 (2018.10) (熊本)

## 3. The number and summary of patents and patent applications

It's not applicable.

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

- 1) NCU Contact Points in Asia Symposium 2019 Best poster award (2019.12)(Nagoya)  
a) : Tatsuya Ochibe, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: Machine learning models for predicting hepatotoxicity and renal toxicity based on HESS toxicological test database.
- 2) 日本動物実験代替法学会 第32回大会 学生優秀演題賞受賞 (2019.11、つくば) : 栃久保善博、橘内陽子、竹下潤一、渡邊美智子、佐々木崇光、保坂卓臣、吉成浩一、分子記述子を用いたリードアクロスによる反復投与毒性予測評価の検討