

Windows			
試験結果			
陽性	15	31	46
陰性	8	1413	1421

感度: $15/46 = 33\%$; 特異性: $1413/1421 = 99\%$

一致率: $1428/1467 = 97\%$

表 5: NIHS データセット中の化合物に対しての骨髄毒性に関する DfW13 NIHS 020211_1 の予測精度

結論

脾臓毒性、骨髄毒性、そして、甲状腺毒性に対してそれぞれ 4 本ずつ Rapid Prototype アラートが DfW version13 に実装された。全ての Rapid Prototype アラート実装後のトレーニングデータセットに対する予測精度はそれぞれ、脾臓毒性予測に対して感度 20%特異性 99%、骨髄毒性予測に対して感度 33%特異性 99%、そして、甲状腺毒性予測に対して感度 24%特異性 99%であった。

このプロジェクトの開始前には、DfW 知識ベースは 14 本の甲状腺毒性アラートを有していたが、その一方で脾臓毒性および骨髄毒性エンドポイントに対してはアラートが開発されていなかった。このプロジェクトは、これまでの知識ベースに対して殆んどもしくは全くカバーされてこなかった標的臓器毒性エンドポイントに対する予測精度を大幅に向上させた。

トレーニングデータセット中の陽性化合物の個数が限られていたために、毒性の潜在的なメカニズムを考慮した Rapid Prototype 開発に向けての新たな手法が採用された。実装された新たな Rapid Prototype アラートは、メカニ

ズム的な理論的根拠をその導出のために利用する full アラートへと、より容易に変換できるだろう。これは、文献情報および例証化合物を追加し、アラートのコメントを更新することによって達成され得る。

このプロジェクトは、ある適切なトレーニングデータセットが与えられると、Rapid Prototype アラート開発手法が、DfW 知識ベース中の既存および新規のエンドポイントに対する予測精度を向上させるために利用できることを示した。毒性発現メカニズムを考慮すると、数多くの陰性化合物を有する私有データセット中の化合物クラスを特定することの助けとなる。これらの Rapid Prototype アラートは、毒性予測の信頼性を評価するための外部データセットに対して妥当性を確認することが必要となるかもしれないが、毒性発現メカニズムを考慮することで Rapid Prototype アラートに対する偽陽性化合物の個数を減らせることが期待できるかも知れない。

参考文献

- Behrend M, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 1998, **7** (9), 1509-1519
- Bus JS and Popp JA, *Food and Chemical Toxicology*, 1987, **25** (8), 619-626
- Doerge DR, Decker CJ and Takazawa RS, *Biochemistry*, 1993, **32** (1), 58-65
- Kitchin JE, Pomeranz MK, Pak G, Washenik K and Shupack JL, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1997, **37** (3), 445-449
- Marinovich M, Guizzetti M, Ghilardi F, Viviani B, Corsini E and Galli CL, *Archives of Toxicology*, 1997, **71**, 508-513
- Suzuki J, Meguro S, Morita O, Hirayama S, Suzuki S; *Biochem. Pharmacol.* 1989, **38** (20), 3511-3519
- Takagi A, Yamada T, Hayashi K, Nakade Y, Kojima T, Takamatsu J, Shibata E, Ichihara G, Takeuchi Y and Murate T, *Industrial Health*, 2002, **40**, 371-374

In Vivo染色体異常予測のための新規Derek for Windows アラートおよび Rapid Prototypeアラート開発

序論

DfW²は、毒性予測のための知識ベースエキスパートシステムである。その知識ベースは、DfWの毒性予測に寄与するアラート、例証化合物、および、reasoning ruleから構成される。NIHSにより支援を受けた以前のプロジェクトは、新しいfullアラートとRapid Prototypeアラートを導出するために私有データセットを利用し、in vitro染色体異常の予測精度を改善した。このプロジェクトの目的は、NIHSより提供されたin vivo小核試験データを用いて、DfWにおけるin vivo染色体異常予測の被覆率を改善することである。

実行可能性調査が、NIHSによって公開済み文献から纏められたin vivo小核試験データと関連のある 256 個³の化合物を含むKirklandデータセット(Kirkland et al)からの化合物の一部を使って行なわれた。そのデータセットに関して、in vitroからin vivo予測の潜在的な相関関係を評価するために、DfW version12 の染色体異常エンドポイントに対して予測処理が行なわれた。33 本のアラートが、このデータセット中の少なくとも一つの陽性化合物にヒットした(付録III)。in vivo小核試験とin vivo染色体異常試験に関する二つの追加データソース(オンライン毒性データベースVitic Nexus⁴ とFDA Genetox Database⁵)に対して同様に予

² Derek, Version 13.0.0 (2010), Lhasa Limited (UK)

³ 結果が不確定な試験データを有する化合物が 14 個あり、それらはこの研究からは除外されている。

⁴ Vitic Nexus, Version 1.3.7 (2010), Lhasa Limited (UK)

⁵ Leadscope Enterprise FDA Genetox Database.

測が行なわれ、解析結果が結合された(付録 IV)。重複した化合物は解析から除外され、陽性予測率⁶が各々のアラートに対して計算された。個々のアラートに対する陽性予測率の解析により、

もしも in vitro と in vivo 毒性の双方に至るメカニズムが同じであると判断されれば(それらが、in vivo データセットに対して高い陽性予測率を示したので)in vivo へと拡張される可能性のある7本の in vitro 染色体異常アラートの候補を特定した。

Derek における in vitro 染色体異常アラートの被覆率は NIHS と他の組織との共同研究により大規模に開発されてきた。現在のバージョンの DfW は 87 本の染色体異常アラートを有している。しかしながら、それらのうちの大部分(84本)は in vitro の毒性を記述しており、一方でたったの 10 本のアラートのみが in vivo 染色体異常を記述している。in vivo 小核試験データは、DfW 知識ベース中のこの相対的に未探索な毒性エンドポイントの被覆率を改善させるために活用できる。

方法

全部で 17 本のアラートが、NIHS により提供された in vivo 小核試験データともう二つのデータソースの解析にのって特定された(付録 IV で取り上げられている)。それらに付随する各々の化合物に対する in vivo 細胞遺伝学的試験データが、最終的な試験結果を決定するために文献からの原本の引用をレビューすることにより解析された。可能であれば、同じ化合物に対する矛盾した結果を、テストプロトコ

ル(例えば、投与量、標本採取時間、組織、投与経路など)の差異に基づき正当化させた。それらの化合物に対して、陽性・陰性、もしくは、不確定のいずれかの試験結果を割り当てた。修正された陽性予測率が各々のアラートに対して算出され、これらの値は以下の基準に従って、アラート修正評価のために用いられた。

- **陽性予測率 ≥ 50%:** 拡張に対する候補
- **陽性予測率 < 50%:** アラートは拡張できない

in vitro から in vivo 染色体異常アラートへの拡張は、in vivo 染色体異常アラートに対する新たな reasoning rule の追加、アラートコメントの更新、および、文献情報や例証化合物を適宜追加することにより行なわれた。その一方で、基準を満たさないアラートはその化合物クラスの in vivo 染色体異常の関連性を記述するように修正され、それはアラートコメントを更新することにより行なわれた。

⁶ 陽性予測率 = 陽性化合物の個数 / (陽性化合物の個数 + 陰性化合物の個数)

エントリー	アラート	陽性 ^a	陰性 ^b	曖昧	陽性予測率	決定
1	028	3	2	0	60	拡張
2	051	6	0	0	100	拡張
3	069	6	1	0	86	拡張
4	470	2	0	1	100	拡張
5	627	1	1	0	50	拡張
6	517	2	3	0	40	拡張なし
7	329	2	2	0	50	独立したアラートを追加

(a): in vivo 細胞遺伝学的試験において総合的に陽性であった化合物の個数

(b): in vivo 細胞遺伝学的試験において総合的に陰性であった化合物の個数

表 6: NIHS データセットと他のデータソースから取られた in vivo データに対する in vitro アラートの陽性予測率

結果

全部で 7 本の in vitro アラート候補が調査され、それは in vivo 活性をカバーするための 5 本の in vitro 染色体異常アラートの拡張、一本の新規 in vivo 染色体異常アラートの開発、および、その化合物クラスに対する in vivo と in vitro の結果の関連性を記述するための既存の in vitro 染色体異常アラートの更新をもたらした。表 6 は、各々のアラートに対して算出された陽性予測率および上記の基準に照らし合わせて採用された最終決定を要約したものである。新規および修正されたアラートが DfW version13 知識ベース(この文書では、DfW13 NIHS 020211_1 と命名した)に実装され、個々のアラートに対する Derek rtf レポートが付録 V に記載されている。

in vivo 染色体異常アラートをカバーするために拡張されたアラートに対して(エントリー 1 から 5)、in vivo 染色体異常アラートに対する新たな reasoning rule が、その毒性を説明するアラートコメント内の新たな段落と共に追加された。新規もしくは更新された例証化合物もまた適宜追加された。

アラート 470(表 6 中のエントリー 4)については陽性予測率が 100%だったので、in vivo 染色体異常をカバーするように拡張された。NIHS データセットからの一つの化合物(パラセタモール)が in vivo 小核試験において陰性として当初分類されたが、後に文献レビューにより、「不確定」とされた(Bergman et al)。

アラート 517(表 6 中のエントリー 6)については陽性予測率が 40%未満であり、基準に従って

拡張できなかった。NIHS により提供されたデータセットの事前解析において、このアラートにヒットする陽性化合物(メトトレキサート)が一個あった。他のデータソースに対する解析により、別の陽性化合物(ピリメタミン)と陰性化合物(ラモトリジン)が特定された。しかしながら、それに続く文献検索(FDA 医薬品表示情報を含む)が、二つの陰性化合物(ジアベリジン

(11) (Ono et al) とトリメトレキサート(12) (FDA 2005))を見出し、それらが低い陽性予測率をもたらした(図 4)。そのデータはこのアラートを拡張するものでは無かったが、この化合物クラスの in vitro 活性と in vivo の関連性に関する記述を盛り込むようにコメントが更新された(付録 V)。

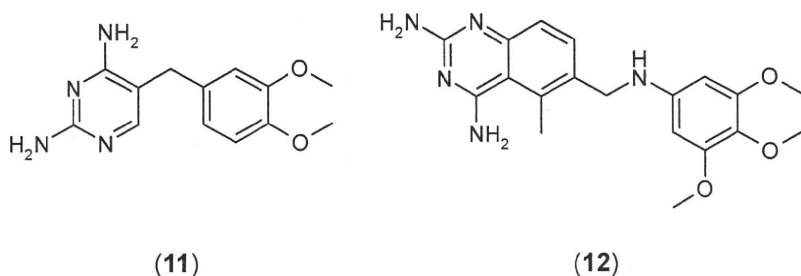


図 4: ジアベリジン(11)とトリメトレキサート(12)

アラート 329(表 6 中のエントリー7)に関して、陽性予測率が 50%と算出されたにも関わらず、このアラートは拡張されなかった。この化合物クラスに対する構造活性相関(SAR)は、例え

ばベンゾピレン(13)、および、ピレン(14)のように、それぞれベイ領域とK領域の芳香族多環式炭化水素(PAHs)の双方、および、ヘテロ類縁体をカバーしている(図 5)。

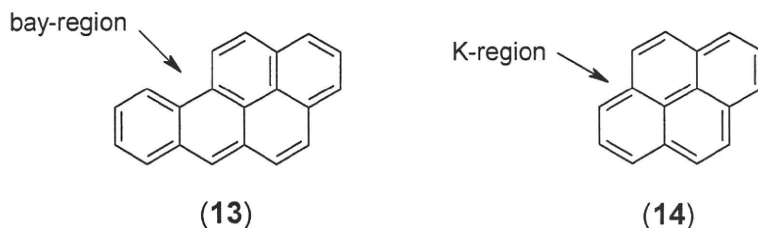


図 5: ベンゾピレン(13) とピレン(14)

in vivo 小核試験データを更に解析したところ、ピレン(14)は in vivo 染色体異常試験(NTP)に

対して陰性であり、ベイ領域の PAHs のみが in vivo 活性を呈しているため、それは in vivo

活性に対して異なるSARの可能性を示唆しているように思われる。エポキシドヒドロラーゼがK領域を持つエポキシドを加水分解することによる解毒化パスウェイは、これらの化合物のin vivo活性の欠如に関与しているかも知れない。従って、この化合物クラスに対する新規のin vivo染色体異常アラートが知識ベースに実装された(付録Vの中のDfW RTFレポートを参照して下さい)。

in vivo染色体異常アラートの予測精度

新規および修正されたアラートを含む知識ベースの予測精度が、NIHSより提供されたデータセットに対してDfW version13に対して評価された。表7と表8は、NIHSにより提供されたデータセット⁵中の化合物のin vivo染色体異常に対する、標準的なDerek version13とDfW13 NIHS 020211_1の予測精度をそれぞれ示している。

Derek for Windows 試験結果	陽性	陰性	合計
陽性	4	108	112
陰性	0	130	130

感度: $4/112 = 4\%$; 特異性: $130/130 = 100\%$;

一致率: $134/242 = 55\%$

表7: トレーニングデータセット⁵中の化合物に対するDfW version13のin vivo染色体異常の予測精度

Derek for Windows 試験結果	陽性	陰性	合計
陽性	23	89	112
陰性	3	127	130

感度: $23/112 = 21\%$; 特異性: $127/130 = 98\%$;

一致率: $150/242 = 62\%$

表8: トレーニングデータセット⁵中の化合物に対するDfW13 NIHS 020211_1のin vivo染色体異常の予測精度

表 8 から、感度に対して 4%から 21%への大幅な改善と、同時に特異性に対して 98%への僅かな下降が達成されたことが分かる。システムによってまだ予測されていない 89 個の陽性化合物がある。しかしながら、これらの化合物の一部(89 個中の 26 個)が in vitro 染色体異常アラートにヒットし、それらは以下のアラートに対して発生していることに注意されたい。

- 007 (N-Nitro or N-nitroso compound)
- 027 (Alkylating agent)
- 306 (Alkyl aldehyde or precursor)
- 329 (Aromatic nitro compound).

in vivo 細胞遺伝学的試験データの初期の解析は、これらのアラートを拡張可能な候補として特定しなかったが、新規アラートが導出できそうなこれらの化合物クラス中の陽性化合物のサブクラスを特定するための更なる調査が必要とされるかも知れない。

結論

5 本の in vitro 染色体異常アラートが、in vivo 染色体異常も記述するように拡張され、一本の in vivo 染色体異常アラートが実装され、そして、一本の in vitro 染色体異常アラートが、化合物クラスの in vivo 活性との関連性を反映するように更新された。新規および更新されたアラート実装後のトレーニングデータセットに対する in vivo 染色体異常予測精度は、感度 21%、特異性 98%であった。

in vitro と in vivo 染色体異常の相関関係が五

つの化合物クラスに対して特定され、その一方で、一つの化合物クラスに対して、in vitro のサブクラスの毒性を引き起こすメカニズムは in vivo とは関連がないように思われ、それ故、別の in vivo 染色体異常アラートを実装した。この手法は、DfW の in vivo 染色体異常エンドポイントの被覆率を向上させるための比較的迅速で信頼性のある過程であることが示された。遭遇した主な制約事項は、文献中の幾つかの化合物に対する試験上で見受けられる差異と、アラートコメント中でこれらの差異(幾つかの場合においてはデータ量も)を正確にかつ簡潔に表現することであった。しかしながら、これらの大部分はアッセイプロトコル(投与経路、投与量、試験された組織など)の差異によって説明できるだろう。

このプロジェクトの開始前には、DfW 知識ベースには 10 本の in vivo 染色体異常アラートがあった。このプロジェクトは、関連する in vivo 細胞遺伝学的試験データの解析を通じて、この重要なエンドポイントの被覆率を大きく向上させた。更なる調査は、残りの in vitro 染色体異常アラートの解析と、ある化合物クラス中の化合物と関連する in vivo 染色体異常メカニズムの関連性の特定、および、これらのアラートに関連したメカニズムの in vivo 関連性の評価を含むものとなるだろう。

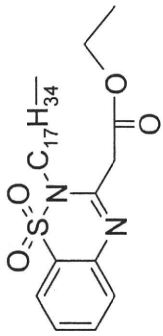
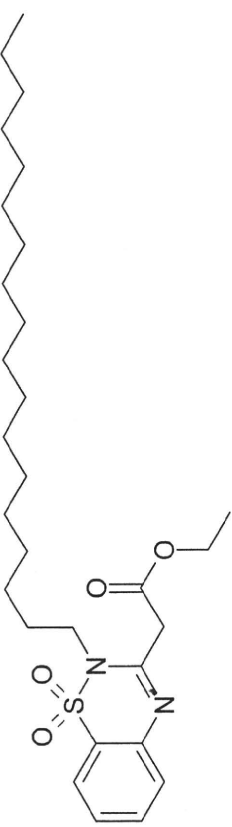
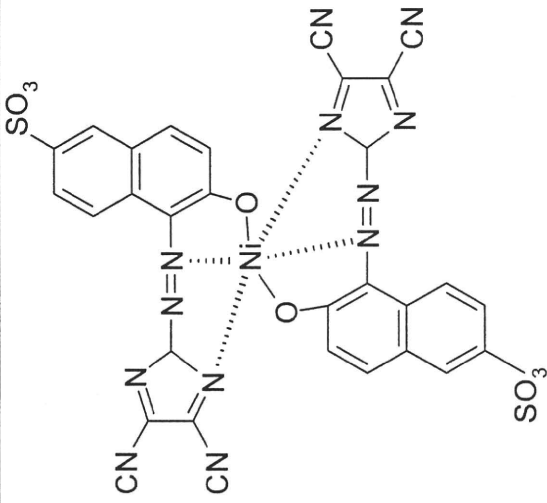
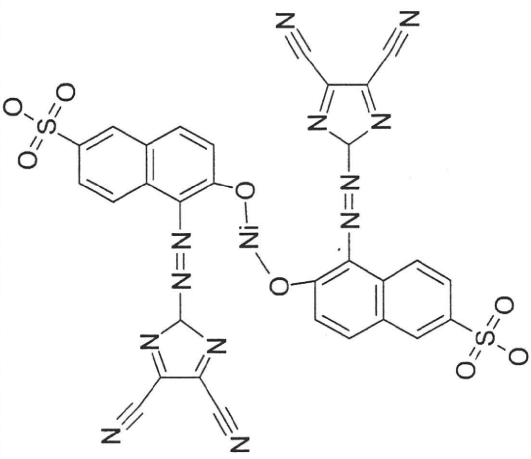
参考文献

- Bergman K, Muller L and Weberg Teigen S, *Mutation Research*, 1996, **349**, 263-288
- Food and Drug Administration (FDA), 2010, Lamictal (lamotrigine)

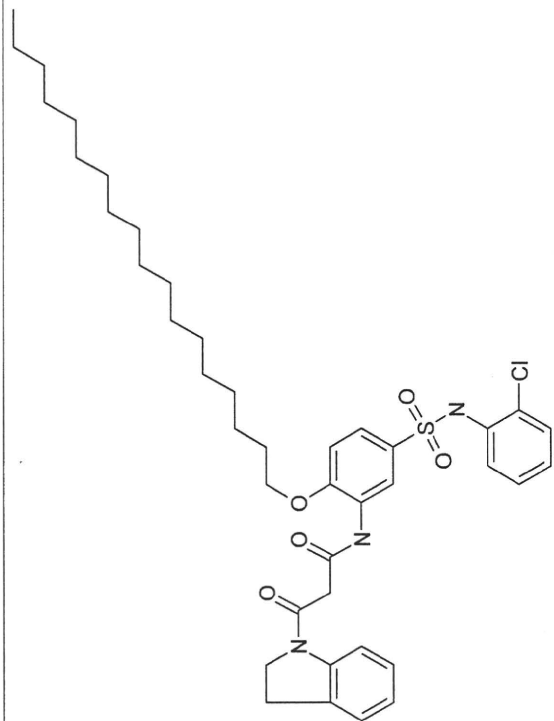
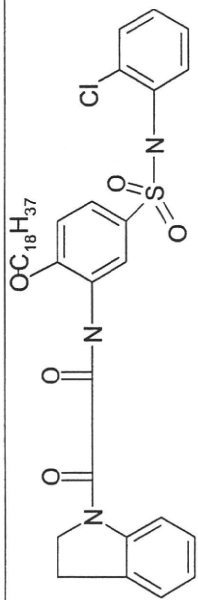
- Food and Drug Administration (FDA), 2005, Neutrexin
- In vivo cytogenetics - chromosome aberrations of pyrene (CAS No. 129-00-0), National Toxicology Program Report, 1984-1988, **Study ID A72952**
- Kirkland D, Aardema M, Henderson L and Muller L, *Mutation Research*, 2005, **584**, 1-256
- Ono T, Sekiya T, Takahashi Y, Sasaki YF, Izumiyama F, Nishidate E, Tsuda S and Ohta T, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 1997, **3**, 297-306

付録 I

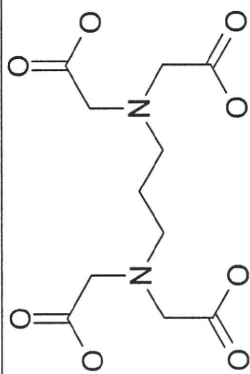
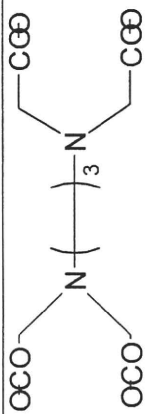
NIHS データセット中の化合物に対する小規模修正(Kison と Sinki 結合済み)

化合物 ID	旧構造	新構造
0212014A		
0303001A		
化合物 ID	旧構造	新構造

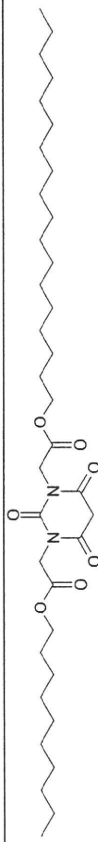
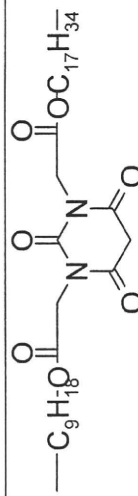
9207004A



9104007A



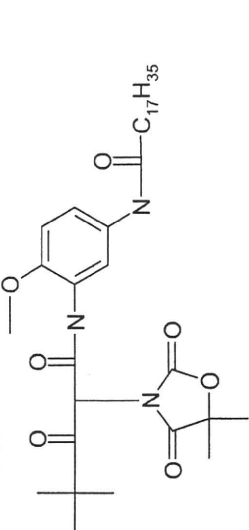
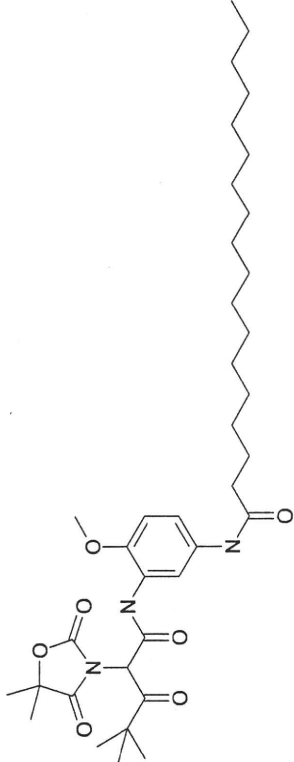
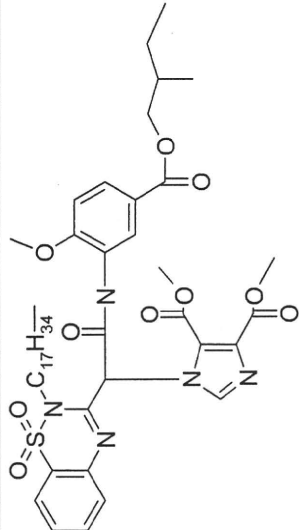
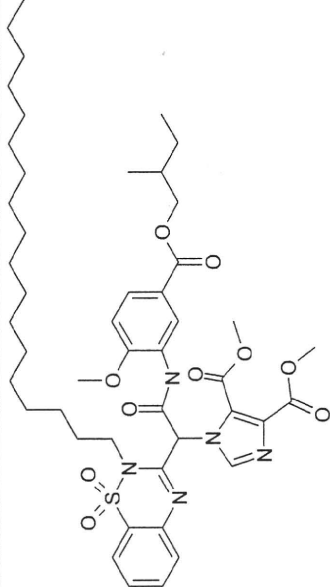
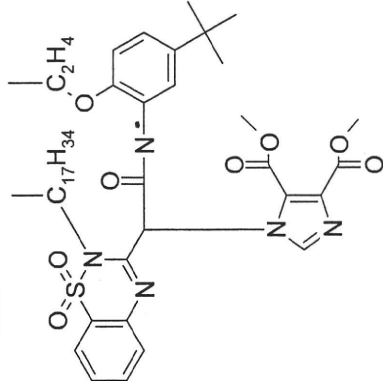
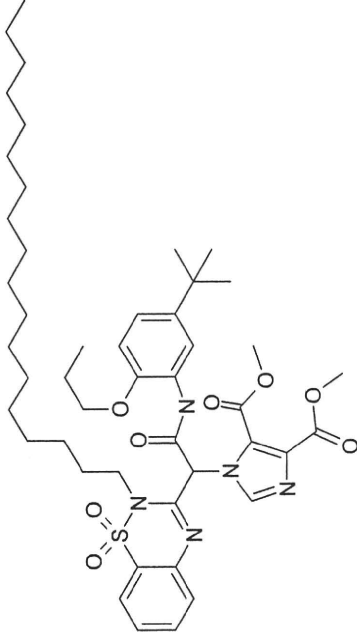
0207010A

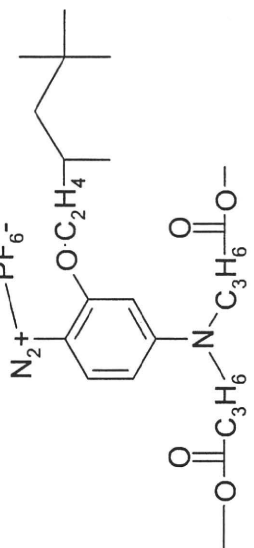
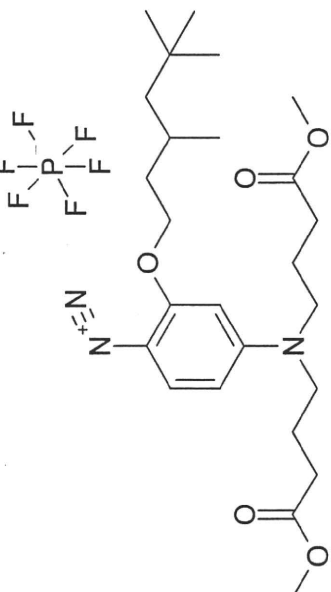
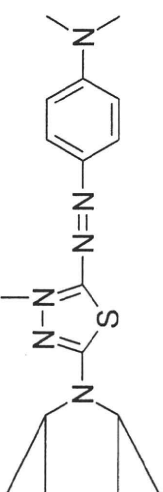
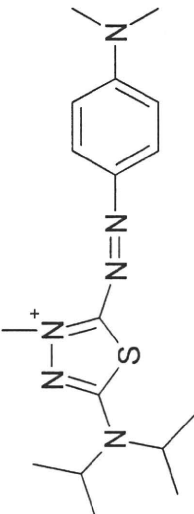

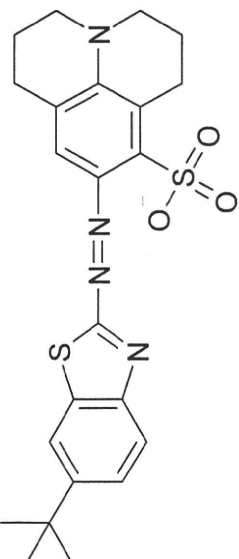
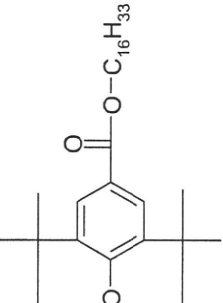
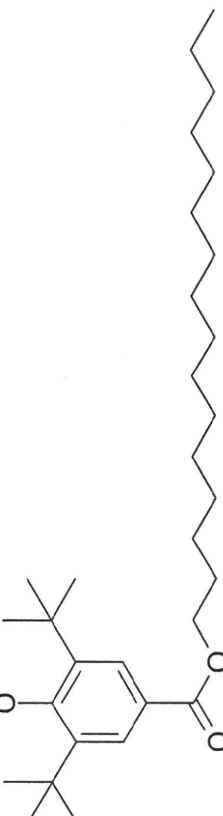


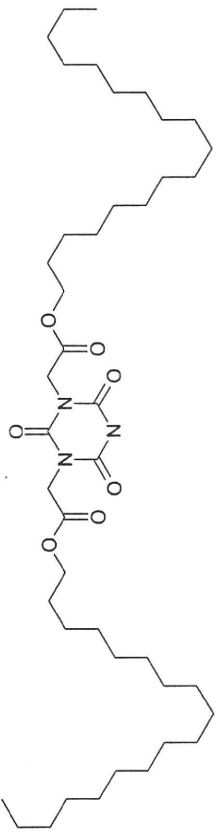
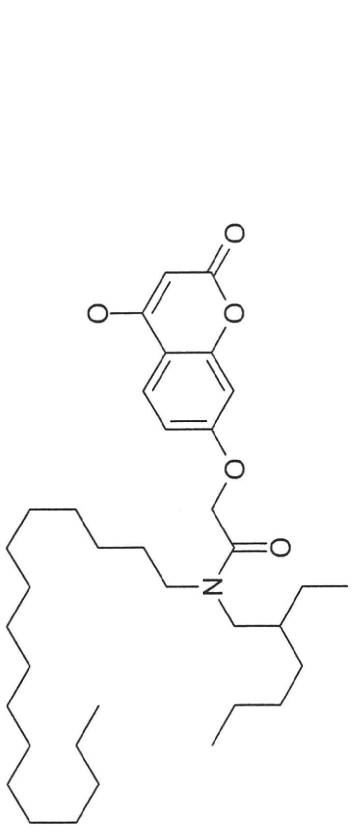
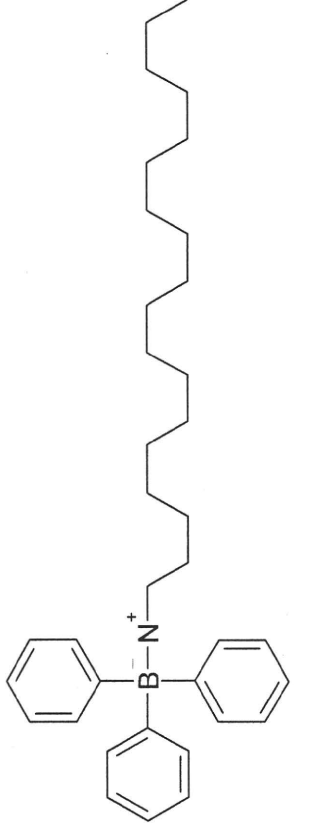
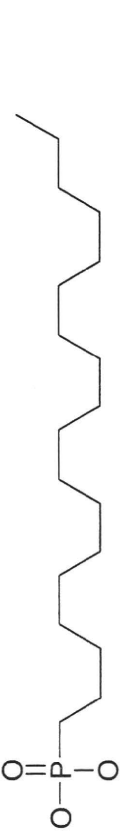
化合物 ID

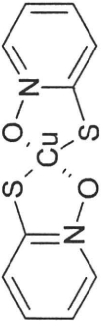
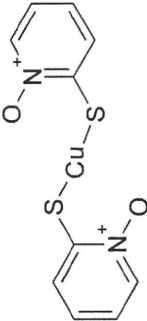
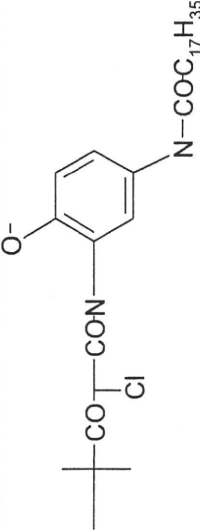
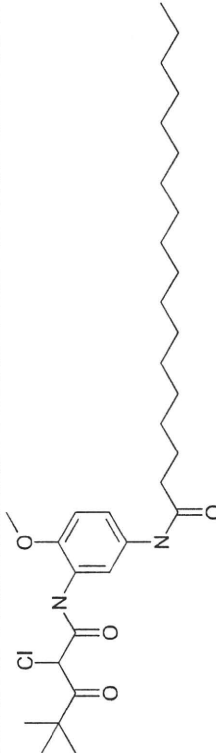
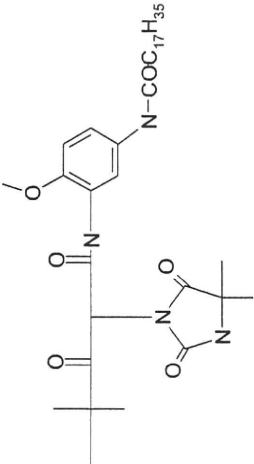
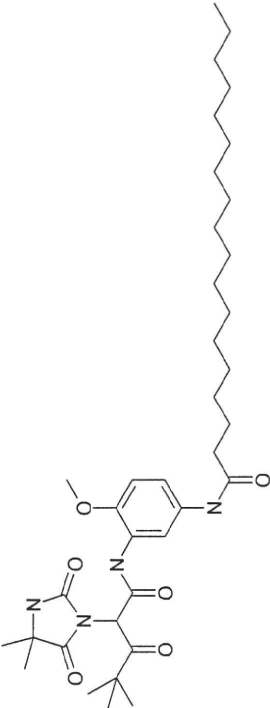
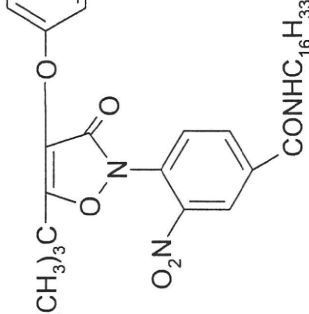
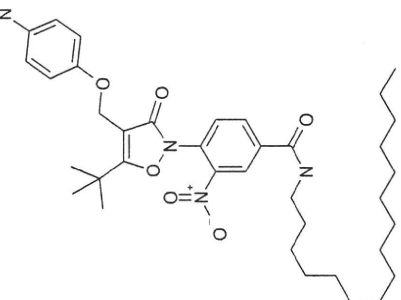
旧構造

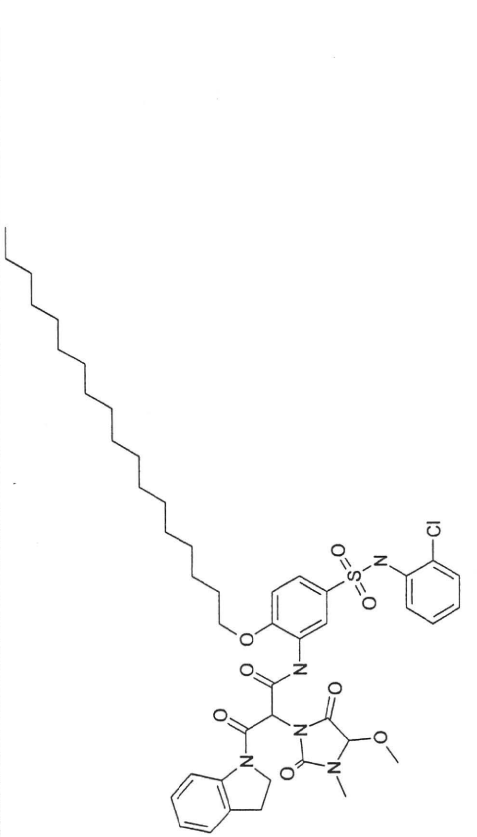
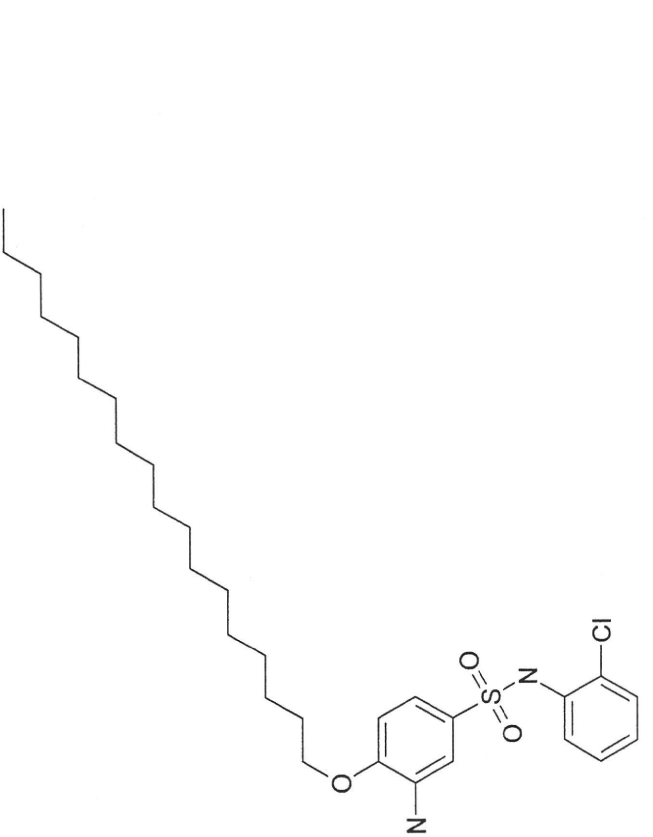
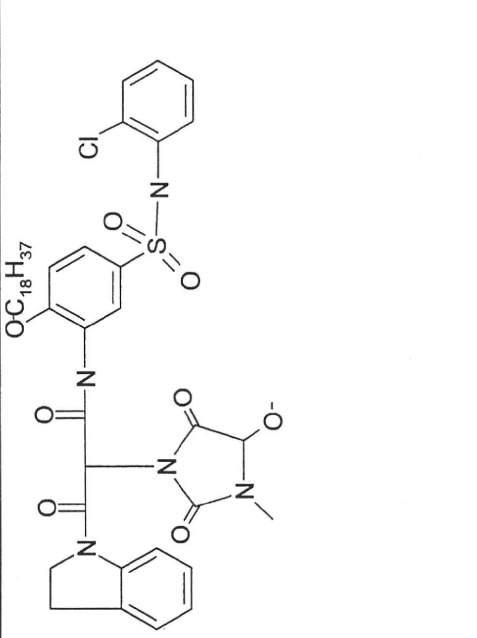
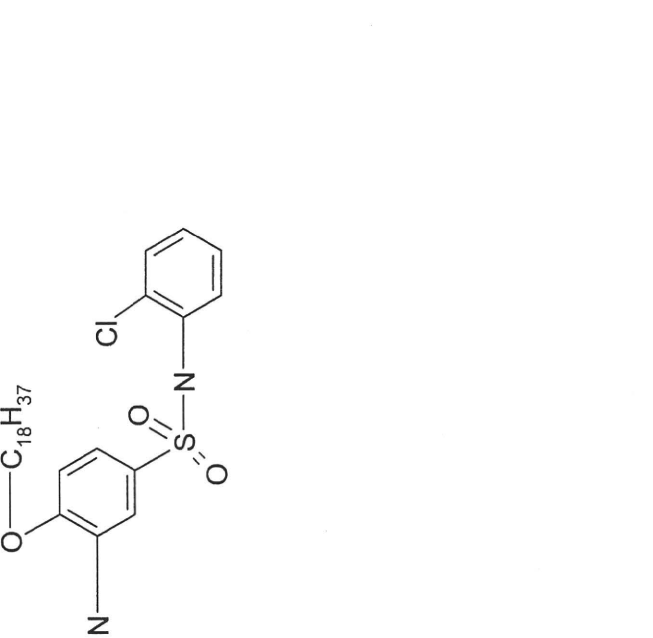
新構造

0212011A		
0212013A		
0303008A		
化合物 ID	<div data-bbox="1256 1391 1290 1473" data-label="Text">旧構造</div> <div data-bbox="1256 629 1290 712" data-label="Text">新構造</div>	

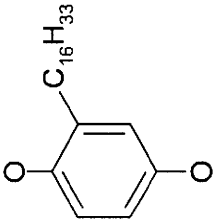
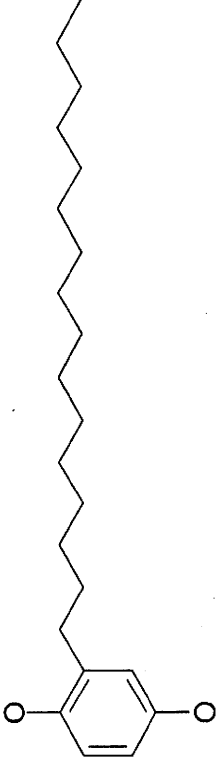
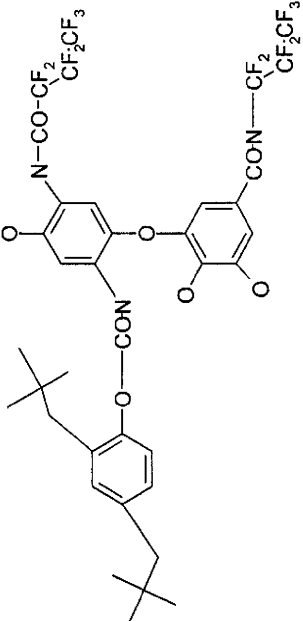
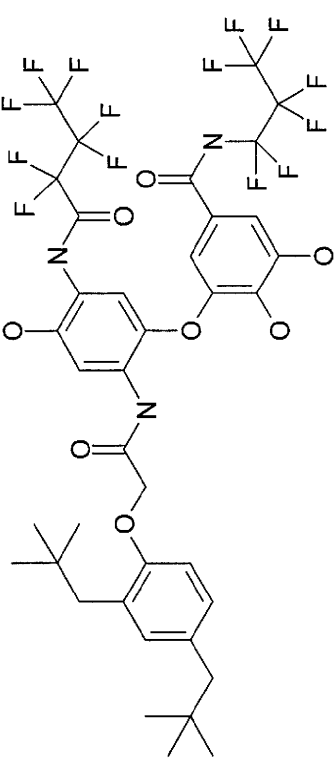
0309012A		
0003012A		
0002011A		
9906004A		
化合物 ID	旧構造	新構造

9810003A	$\text{---C}_{17}\text{H}_{35}\text{O} \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{N} \begin{array}{c} \text{---C}(=\text{O}) \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{C}_{17}\text{H}_{34} \\ \text{---C}(=\text{O}) \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \end{array}$	
9709009A	$\text{---}(\text{CH}_2)_3 \text{---} \text{N}(=\text{O}) \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}_2\text{H}_5 \text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}$	
9703006A	$\text{---}(\text{CH}_2)_3 \text{---} \text{N}^+ \text{---} (\text{CH}_2)_{17} \text{CH}_3$	
9604002A	$\text{C}_{18}\text{H}_{37} \text{---} \text{P}(=\text{O}) \text{---}$	
化合物 ID	旧構造	新構造

9411005A			
9406004A			
9305014A			
9210002A			
化合物 ID	旧構造		新構造

<p>9207016A</p> 		<p>新構造</p>
<p>9207018A</p> 		
<p>化合物 ID</p>		<p>新構造</p>

9106005A		
9103009A		
9009010A		
化合物 ID	新構造	

8909001A	 <p>Chemical structure of 1-(3,5-difluorophenyl)hexadecane, showing a hexadecyl chain (C₁₆H₃₃) attached to a 3,5-difluorophenyl ring.</p>	 <p>Chemical structure of 1-(3,5-difluorophenyl)hexadecane, showing a hexadecyl chain (C₁₆H₃₃) attached to a 3,5-difluorophenyl ring.</p>
8905005A	 <p>Chemical structure of a complex molecule featuring a central benzene ring. It is substituted with a tert-butyl group, a hexadecyl chain, and a trifluoroacetyl group (CON-CF₂CF₃).</p>	 <p>Chemical structure of a complex molecule featuring a central benzene ring. It is substituted with a tert-butyl group, a hexadecyl chain, and a trifluoroacetyl group (CON-CF₂CF₃).</p>

付録 II

DfW13 NIHS 020211_1 に組み込まれた標的臓器毒性 Rapid Prototype アラート

エンドポイント	アラート番号	アラート名
甲状腺毒性	RapidPrototype094	2-Mercapto-benzimidazole, -benzothiazole or -benzoxazole
	RapidPrototype095	2,6-Di-tert-butylphenol derivative
	RapidPrototype096	Dithiocarbamate
	RapidPrototype097	Benzamide
脾臓毒性	RapidPrototype098	Oxime
	RapidPrototype099	Nitrobenzene
	RapidPrototype100	Aniline or precursor
	RapidPrototype101	Bis-4-oxyaniline
骨髄毒性	RapidPrototype102	Aniline or precursor
	RapidPrototype103	Thiourea S-dioxide
	RapidPrototype104	1,2-Ethylene glycol
	RapidPrototype105	Mycophenolic acid or precursor

付録 III

NIHS により提供された Kirkland データセットの中の少なくとも一つの陽性化合物がヒットした in vitro 染色体異常アラートに対する in vivo 染色体異常の陽性予測率

アラート番号	アラート名	陽性 ^a	陰性 ^b	陽性予測率 (%) ^c
007	N-Nitro or N-nitroso compound	7	5	58
019	Epoxide	2	2	50
023	vic-Dihalide	2	2	50
027	Alkylating agent	12	11	52
028	Mono- or di-alkylhydrazine	3	0	100
033	Hydrazine or monoacyl- or monosulphonyl-hydrazine	1	1	50
051	Azirine or aziridine	3	0	100
069	Nitrogen or sulphur mustard	6	1	86
306	Alkyl aldehyde or precursor	3	1	75
308	Alkyl carbamate	2	1	67
309	alpha,beta-Unsaturated ketone	1	1	50
314	Thiuram disulphide or dithiocarbamate	1	0	100
323	Aryldialkyltriazene	1	0	100
328	Halogenated methane	1	5	17
329	Aromatic nitro compound	4	12	25
334	Alkyl nitrite, nitrous acid or nitrite salt	1	0	100
339	Polycyclic aromatic hydrocarbon or hetero-analogue	4	0	100
341	Pyrroline ester, pyrroline N-oxide ester, pyrrole ester or pyrrole alcohol	1	0	100
362	Vinyl carbamate	1	0	100
470	Phenol	1	1	50
516	Triarylmethane salt	1	0	100
517	2,4-Diaminopyrimidine or analogue	1	0	100
521	N-Polyhaloalkylthio compound	1	0	100
529	Xanthine	1	0	100

577	Purine base	1	0	100
578	5-Fluoropyrimidine	1	0	100
580	Aryl N-alkylcarbamate	1	0	100
585	Indole or benzotriazole	2	0	100
625	Catechol	1	4	20
626	Aromatic hydrocarbon	1	1	50
627	Inorganic cadmium compound	1	0	100
642	Bisdioxopiperazine	1	0	100
674	Allylbenzene	1	0	100

(a): in vivo 細胞遺伝学的試験において総合的に陽性であった化合物の個数; (b): in vivo 細胞遺伝学的試験において総合的に陰性であった化合物の個数; (c): 陽性予測率 = 陽性化合物数 / (陽性化合物数 + 陰性化合物数).