

日本動物実験代替法学会 (JSAAE) 協賛シンポジウム
日時: 2013 年 10 月 31 日 (木) 13:30-15:00
会場: タワーホール船橋 福寿 (2F)

in vitro 試験と代替法をつなぐ計算毒性学の立ち上げ

オーガナイザー

石田 誠一 (国立医薬品食品衛生研究所) -JSAAE

湯田 浩太郎 (株式会社 インシリコデータ) -JSAAE

動物実験代替法学会における取り組みの紹介

Research approaches in the Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments

竹澤 俊明 Toshiaki Takezawa, Ph.D.

独立行政法人 農業生物資源研究所 動物科学研究領域

Division of Animal Sciences, National Institute of Agrobiological Sciences

日本動物実験代替法学会 (<http://www.asas.or.jp/jsaae/>) では、動物実験の適切な施行の国際原則である 3Rs【Replacement (動物を用いない代替法への置換)、Reduction (動物数の削減)、Refinement (動物に対する苦痛軽減)】の推進と普及を目的として、研究、開発、教育、調査等を行っている。本講演では、その概略を紹介するとともに、特に動物を用いない「In vitro 試験法」における計算毒性学の必要性については、自らの研究から言及したいと考えている。

in silico の予測系の概説と代替法への橋渡し

Technology development for database integration to make use of huge amount of public biological data in DBCLS

湯田 浩太郎 Kohtaro Yuta, Dr. of Pharmacy

株式会社 インシリコデータ

In silico data, Ltd.

動物愛護の観点での 3R の理念に基づく動物実験禁止は、化粧品関連分野に大きな変化を強いている。この流れは医薬品や機能性化合物開発分野にも影響し、実験動物の使用を少なくする努力が求められている。

In silico による予測は予測項目の違いにより様々なアプローチが展開されてきた。中でも、毒性予測は動物実験禁止のみならず、創薬研究の ADME/T の観点で重要となり、機能性化合物では化合物規制や環境の観点でその重要性が急速に拡大している。

In vitro による動物実験代替法の内容的特徴は、in silico 毒性予測に類似する。従って、in silico 技術の動物実験代替法上での展開は、in silico 毒性予測技術が基本となる。

本講演では in silico による毒性予測の基本と概要を俯瞰し、この技術を代替法上で展開する場合のシステム上での課題とその効果等について議論する。

反復投与毒性評価支援システム HESS の開発

Development of HESS system for supporting the evaluation of repeated dose toxicity

櫻谷 祐企 Yuki Sakuratani, Ph.D.

独立行政法人製品評価技術機構 化学物質管理センター

Chemical Management Center, National Institute of Technology and Evaluation (NITE)

有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) は、試験データがない化学物質の反復投与毒性を類似物質の試験データから推定することを支援するシステムとして NEDO 及び経済産業省のプロジェクトで開発され、NITE のウェブサイトから無料で公開されている。HESS の DB には、化審法の既存化学物質を中心とした反復投与毒性試験データの詳細情報と、これらの物質に関連する毒性メカニズムの情報 (*in vitro* 等) や代謝の情報 (*in vivo/in vitro/in silico* 等) が記載されている。HESS の解析ツールは、OECD の QSAR Toolbox と互換性を持った仕様となっている。評価者は、HESS の解析ツールにより、最適な類似物質を効率良く探索することができ、HESS DB の情報によりその根拠を確認することができる (毒性のメカニズムが類似することを示すデータ等)。評価対象物質の反復投与毒性は、類似物質の毒性強度の分布に基づき、Read-across 等の手法により推定することができる。本発表では、HESS の概要と具体的な使用例を紹介する。

インビボ毒性データベースとインビトロ試験を利用した化学物質の肝毒性の機序解明、評価、予測

Mechanistic analysis, evaluation and prediction of chemical-induced hepatotoxicity using *in vivo* toxicity database and *in vitro* assays

吉成 浩一 Kouichi Yoshinari, Ph.D.

東北大学大学院薬学研究科 薬物動態学分野

Division of Drug Metabolism and Molecular Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

化学物質の安全性は従来動物試験で評価されてきたが、開発の効率化や動物愛護の観点から代替試験法の開発が強く求められている。これまでに、化学構造に着目したインシリコ手法、毒性標的分子を利用したインビトロ試験などによる評価・予測手法の開発が試みられている。しかし、化学物質の安全性評価において重要な反復投与毒性や発がん性については、代替試験法の開発は進んでいない。これら毒性の発現機序が非常に複雑であることがその理由の 1 つと考えられる。我々は、毒性試験データベースを有効に活用することで、インビトロ試験とその結果の情報科学的解析により、化学物質の毒性発現機序の解明や毒性予測が可能になるのではないかと考え、研究を進めている。本セッションでは、複数の異物応答性転写因子のインビトロ試験と薬物代謝予測およびそれらの情報科学的解析を利用したラット反復投与肝毒性の評価・予測に関する我々の取り組みを紹介する。

in vitro 試験と代替法をつなぐ計算毒性学の立ち上げ

Launch of the computational toxicology connecting alternative methods for animal tests and *in vitro* toxicity tests

石田 誠一 Seiichi Ishida, Ph.D.

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部

Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences

医薬品等の安全性評価では、本年 3 月 11 日から執行された欧州における化粧品原料に対する動物実験の全面禁止に見られるように、動物実験の代替が急がれている。また、近年は、毒性発現の作用機構に基づく評価が求められている。一方で、オミクス解析やハイコンテンツアナリシスなどの発展に見られるように、安全性評価でも比較的大規模のデータを扱う試験系が用いられるようになってきている。本セッションのまとめとして、大量データの処理に必要なインフォマテクス技術を新たな試験系と融合させることにより、従来の動物試験では実現できなかったヒトに近い安全性予測モデルの開発の可能性と期待について議論をしたい。

In silico の予測系の概説と代替法への橋渡し

株式会社 インシリコデータ
湯田 浩太郎

<http://www.insilicodata.com>

3Rs

(Reduction, Refinement, Replacement)

動物実験禁止
~~In vivo 試験~~

In vitro 試験

In silico 試験

WET実験
In vitro 試験

DRY実験
In silico 試験

個別展開／発展

個別展開／発展

今後 関係

試験法の融合／協調

化合物安全性(毒性)評価の現状:環境

- ◇化合物の安全性に対する意識が向上
- ◇ひとたび毒性のある化合物が環境中に排出されるとその影響は極めて甚大である
- ◇市販および開発されている化合物数は膨大である
- ◇安全性が評価されている化合物は少ない
- ◇安全性評価には多額の費用と時間がかかる
 - ・評価対象化合物数が多い
 - ・安全性(毒性)の種類が多い
 - ・安全性評価法単価が高く、時間がかかる

安価、高速な安全性評価手法が必要

インシリコによる安全性評価手法の確立が必要

インシリコ予測手法と毒性予測

適用手法	多変量解析 パターン認識	人工知能	ドッキング	3-D QSAR	QSAR
要求項目					
化合物構造 変化性対応	高い	高い	中程度	中程度	極小
高速/大量処理	高速	高速	低速	低速	高速
薬理活性予測	可能	事例無し	定性のみ可	可能	可能
ADME予測	可能	可能	限定的	限定的	限定的
毒性予測					

インシリコによる特性(毒性)評価システム

□現状でのアプローチと実施主要技術

1. 化学多変量解析/パターン認識技術
 - ・データ解析技術
 - ・パラメータ化関連技術

2. 人工知能技術
 - ・ノウハウの収集
 - ・ルール化技術

3. 類似性の利用
 - ・サンプルの収集
 - ・データベース化技術

個々の手法の特徴(1)

1. 化学多変量解析／パターン認識

長所:

- ・サンプルやノウハウの少ない特性にも適用可能
- ・データ解析可能なサンプルがあれば実施可能
- ・要因解析も実施可能
- ・定量／定性の両データに対応可能
- ・様々な要因を数値パラメータに代表させることが可能

欠点／限界:

- ・内容が理解しにくい
- ・パラメータ情報が読めない場合がある
- ・サンプル数が多くなると解析精度が落ちてくる

7

個々の手法の特徴(2)

2. 人工知能によるアプローチ

長所:

- ・人間が持つノウハウを利用できる: 学習が出来る
- ・予測結果の追跡が可能: 理解しやすい

欠点／限界:

- ・ノウハウの無い新規分野への適用不可
- ・定量的評価が出来ない
- ・ルール化出来ない、あるいはルールに乗らない
情報を利用できない
- ・ルール同士の矛盾が発生する場合がある

8

個々の手法の特徴(3)

3. 類似性の利用(カテゴリーアプローチ等)

長所:

- ・「似たものは似た特性を有する」という基本原理に従う
- ・データ解析可能なサンプルがあれば実施可能

欠点/限界:

- ・似た化合物が少ない場合は実施できない
- ・定量評価が出来ない
- ・似た化合物の特性が異なる場合、評価が困難
- ・要因解析が出来ない
- ・「似た」という基準作りが難しい

化学多変量解析/パターン認識による 毒性(安全性)評価

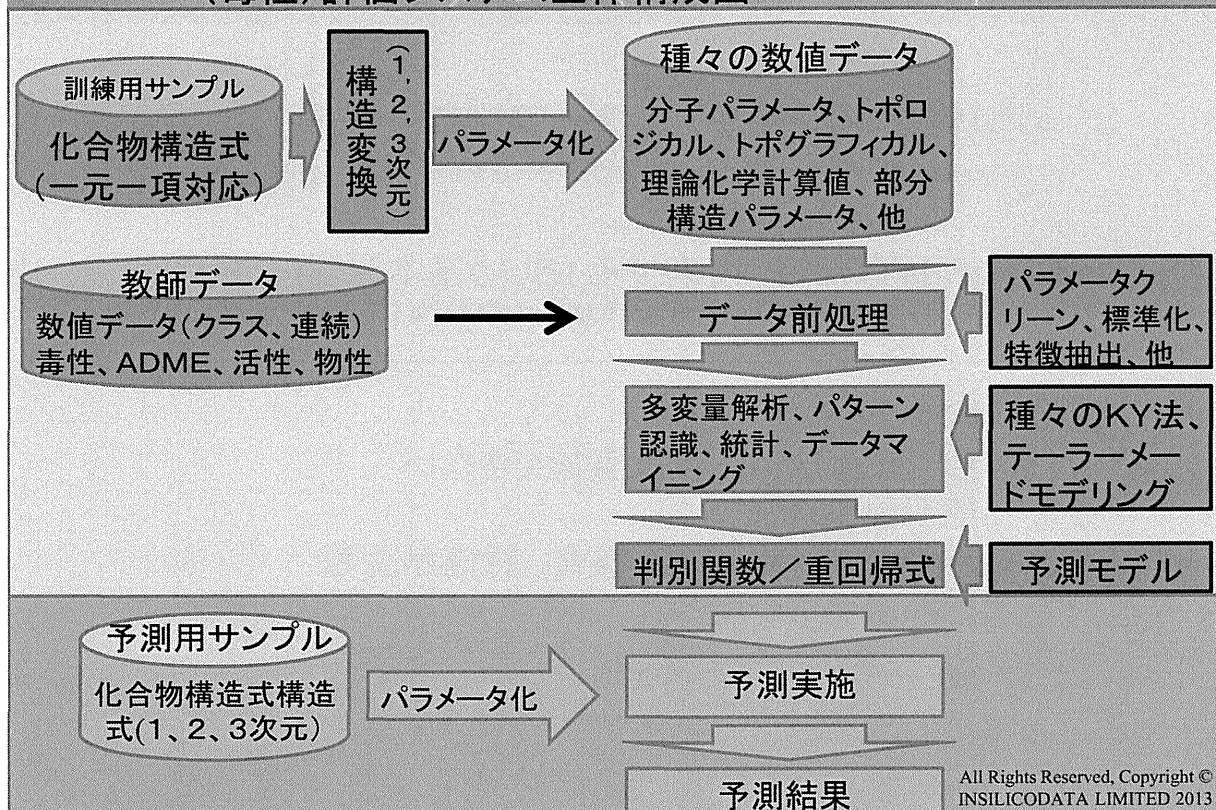
Kohtaro Yuta and Peter C. Jurs ; Computer-Assisted Structure-Activity Studies of Chemical Carcinogens : Aromatic amines, Journal of Med. Chemistry, 24, 241(1981)

世界で二番目のインシリコによる毒性(発がん性)評価の論文
* 最初の論文は同じくADAPTを用いたD. Henry&P.C.Jursによるもの

ADAPT

(Automated Data Analysis by Pattern recognition Techniques)

化学多変量解析／パターン認識による (毒性)評価システム全体構成図



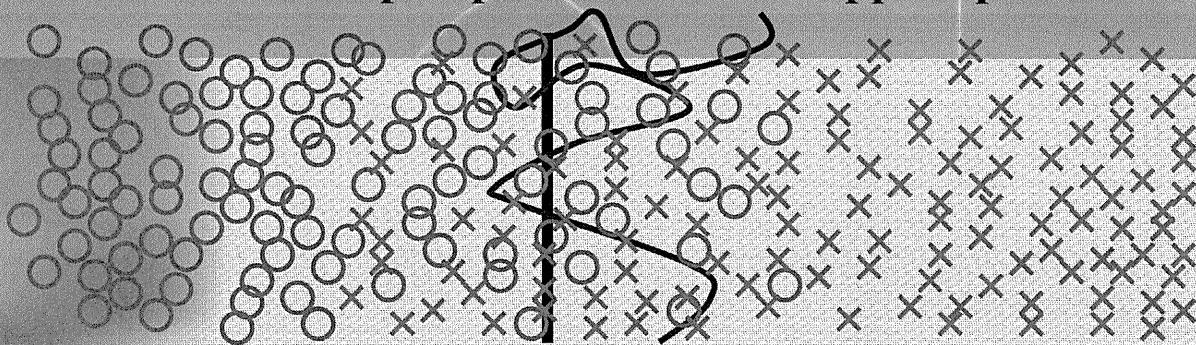
従来手法の限界と新データ解析手法の展開

- ◇安全性評価実施上での要求事項および特性
 - ・安全性評価では極めて高い分類／予測率が求められる
誤った分類や予測が許されない分野
 - ・化合物の構造変化性が高く、サンプル空間が極めて大
総ての化合物が分類や予測の対象となる
 - ・毒性有り／無し of 化合物の重複度が高く、分類困難
構造式が極めて似た化合物で毒性有りと無しが存在し、識別困難
 - ・扱う化合物数が多い
総ての化合物がデータ解析の対象となる

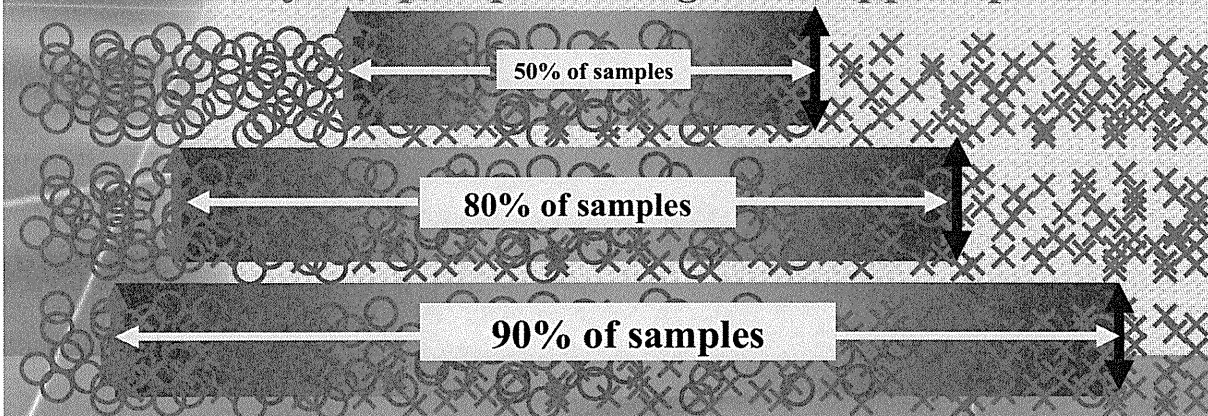
従来のデータ解析手法で
上記要求事項に応えることは殆ど不可能

化合物安全性評価の要求事項(特に完全分類)に
耐える新データ解析手法の開発を目指す

Normal sample space : small overlapped space



Toxicity sample space : large overlapped space



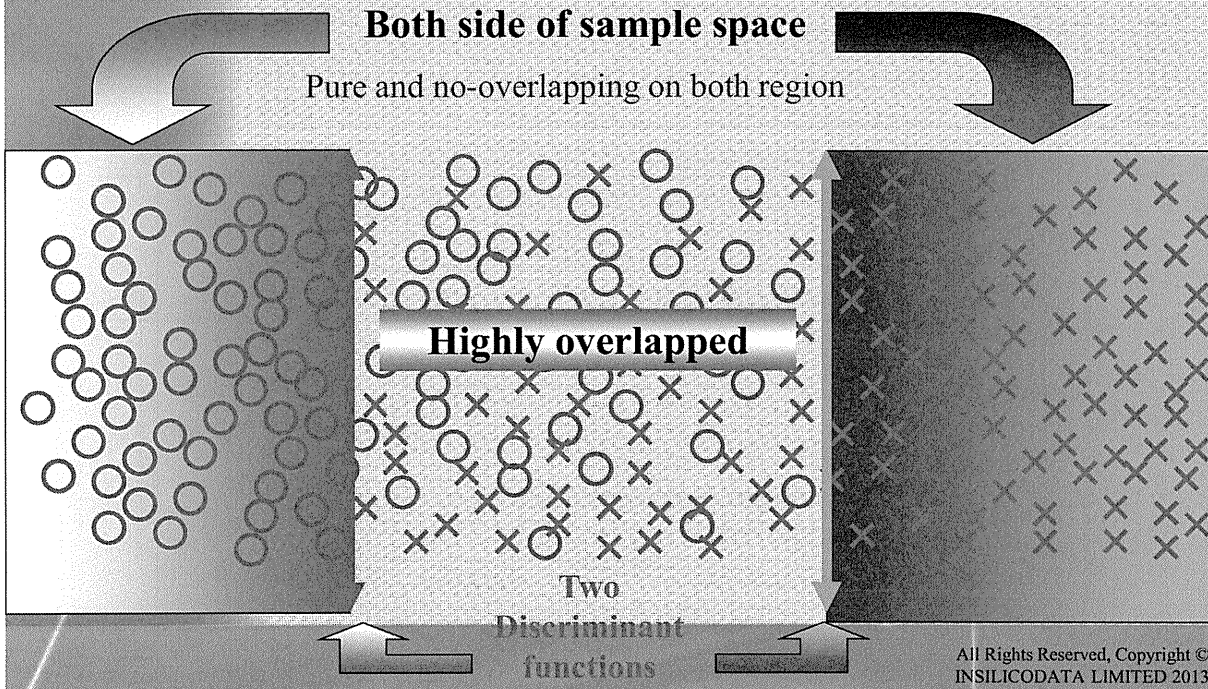
First basic concept of KY method

In Silico Data
Miracles by the KY-method

Spatial region on sample space

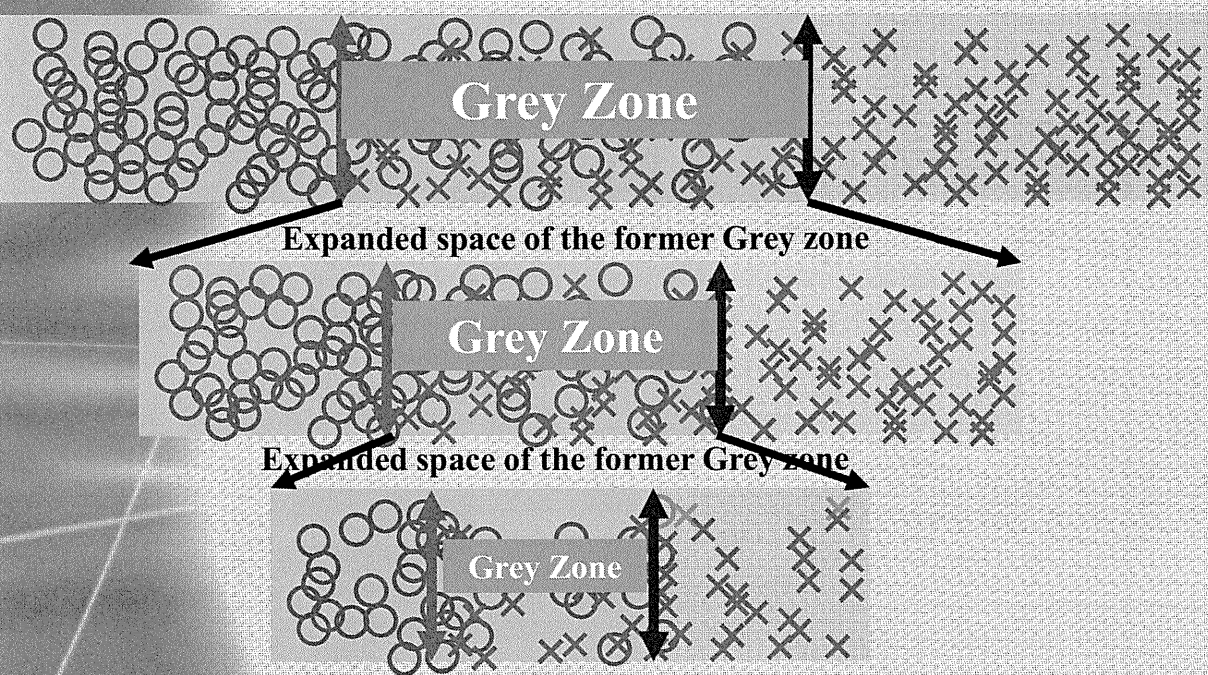
Both side of sample space

Pure and no-overlapping on both region



All Rights Reserved, Copyright ©
INSILICODATA LIMITED 2013

Second basic concept of KY method Multi-steps for 100% classification



Application test of “K-step Yard sampling”

Samples

1. Ames test data
2. Sample population
total :6,965
Mutagen; 2,932
Non-mutagen; 4,033

Result of KY-method

1. Number of steps : 23 steps ; 22 (2 models) + 1 (1 model)
2. Classification ratio : 100 %

Used system

ADMEWORKS / ModelBuilder V 3.0.22

Used parameters (Initial condition)

Number of generated parameters : 838
Number of parameters for step 1 : 98
Confidency index (Samples(6965) / Parameters(98)) : $71.1 > 4.0$

Application test by various D.A. methods

1. Linear discriminant analysis with linear least-squares method

Classification ratio : total; 73.50(6965), Mutagen;73.02(2932), Non mutagen;73.84(4033)
 Number of miss-classified : (1846), (791) (1055)
 Prediction ratio (L100 out) 72.58% deviance(0.92%)
 (L500 out) 73.32% deviance(0.18%)

2. SVM (Support Vector Machine with Kernel)

Classification ratio : total; 90.87(6965), Mutagen;86.83(2932) Non mutagen; 93.80(4033)
 Number of miss-classified : (636), (386) (250)
 Prediction ratio (L500 out) 80.99% deviance(9.88%)

3. AdaBoost

Classification ratio : total; 77.24(6965), Mutagen;66.13(2932) Non-mutagen; 85.32(4033)
 Number of miss-classified : (1585) (993) (592)
 Prediction ratio (L500 out) 75.16% deviance(2.08%)

Classification result by the AdaBoost

Classification ratio of total 6,965 compounds is 77.24%



Figure of the ADMEWORKS

Spatial features of “K-step Yard sampling”

□ Summary 1

■ Features

1. KY-method is a meta-method
Executed on various DA (linear and non-linear) methods.
2. Perfect classification is achieved on any condition
3. Three different types of KY-methods are available at this time
4. Applicable not only on Binary classification but Fitting methods

Spatial features of “K-step Yard sampling”

□ Summary 2

■ Advantages

1. Sample number free approach
2. Sample distribution free approach
3. Perfect classification is achieved in any sample condition
4. Need not spatial data analysis softwares

■ Disadvantages

Relatively complex operation to generate discriminant functions

インシリコによる毒性(安全性)評価 実施上での留意点

*** 人(システム)任せにしない:**

既製品の利用⇒基本原理をある程度理解してシステムを利用
単純なオペレーターのシステム利用と、システムの特性を理解し
た上での正しい利用は結果が大きく異なることにつながる

*** 予測率の勝負にしない: 予測結果を読めるようにする**

予測率(特に毒性予測)は多種多様の要因により大きく変化する

*** 予測モデルは使うものではなく育てるものである:**

多種多様の要因により予測結果が大きく変化する。従って、既存
の予測モデルは差別化にならない。現場に最も最適化された予
測モデルや環境は、そのまま差別化に繋がる。

Thank you for your attention

3Rs (Reduction, Refinement, Replacement)

株式会社 インシリコデータ

湯田 浩太郎

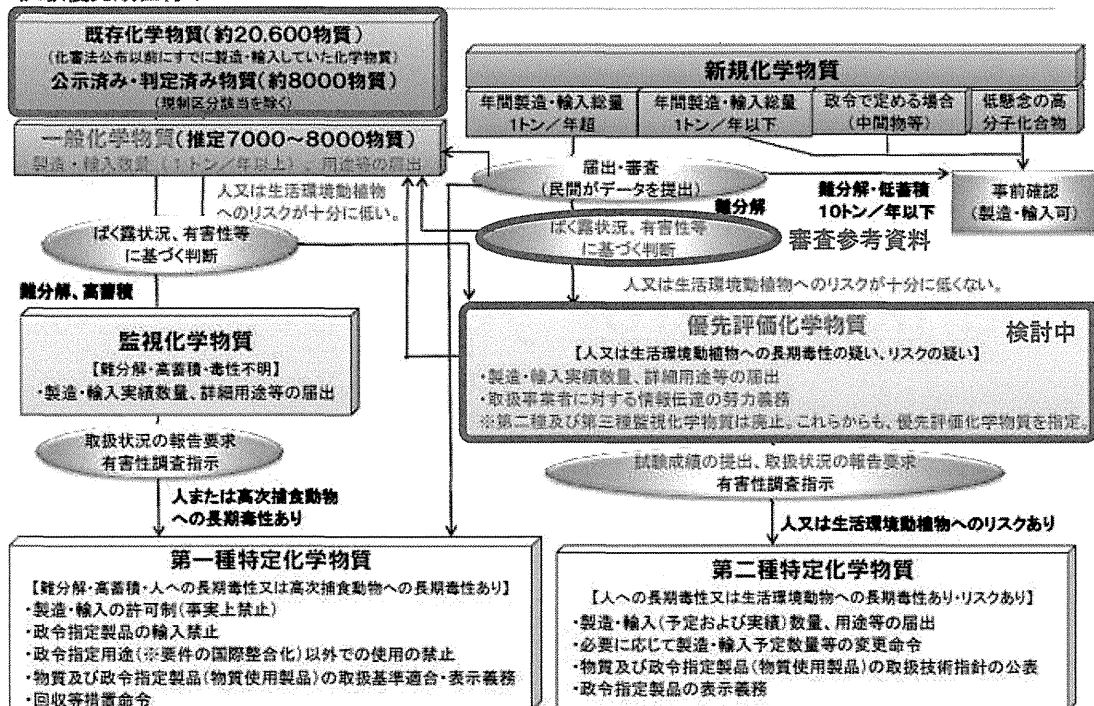
<http://www.insilicodata.com>

反復投与毒性評価支援 システムHESSの開発

2013年10月31日(木)
 (独)製品評価技術基盤機構
 櫻谷 祐企

化審法の評価フローとin silico手法の活用状況

試験優先順位付け



化審法における*in silico*評価の利用開発

	分解度試験	濃縮度試験	生態毒性試験
担当機関	NITE	NITE	国環研
化審法物質試験データ数 (2011年6月時点公表済)	1487物質	833物質	644物質
主な <i>in silico</i> モデル	BIOWIN, CERIMODEL, CATABOL	BIOWIN, CERIMODEL, Baseline Model カテゴリーアプローチ	ECOSAR, KATE, TIMES

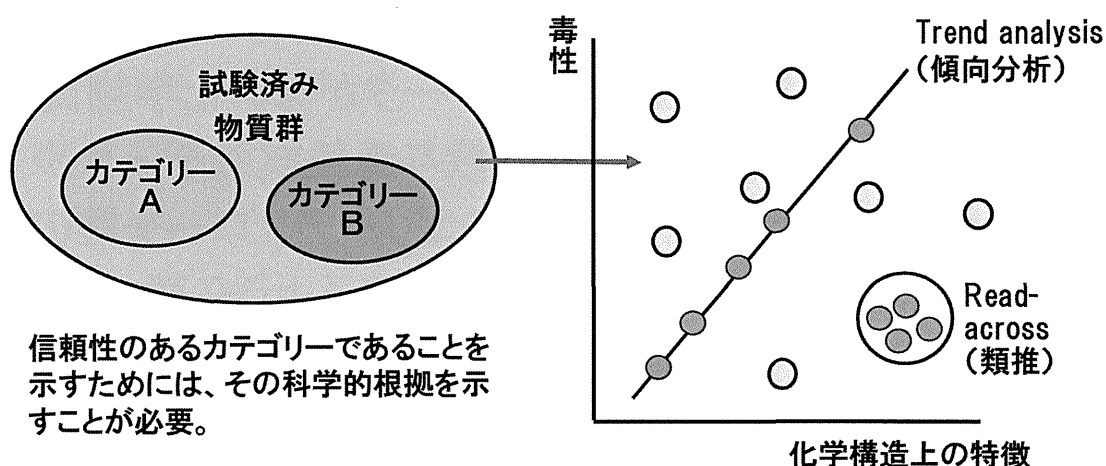
	Ames試験	染色体異常試験	反復投与毒性試験 /生・反併合試験
担当機関	国立衛研	国立衛研	国立衛研
化審法物質試験データ数 (2011年6月時点公表済)	257物質	266物質	256物質
主な <i>in silico</i> モデル	DERECK, MultiCase AdmeWorks, TIMES	DERECK, MultiCase, AdmeWorks, TIMES	HESS (当プロジェクトで開発)

nite

3

カテゴリーアプローチ

化学物質管理分野において未試験の化学物質の有害性を推定する手段として国際的に推奨されている手法。カテゴリーとは、化学構造が類似し、化学構造上の特徴に対し毒性が規則的なパターンを示す又は類似する物質のグループ。傾向分析(Trend analysis)や類推(Read-across)によるデータギャップ補完を行う。



nite

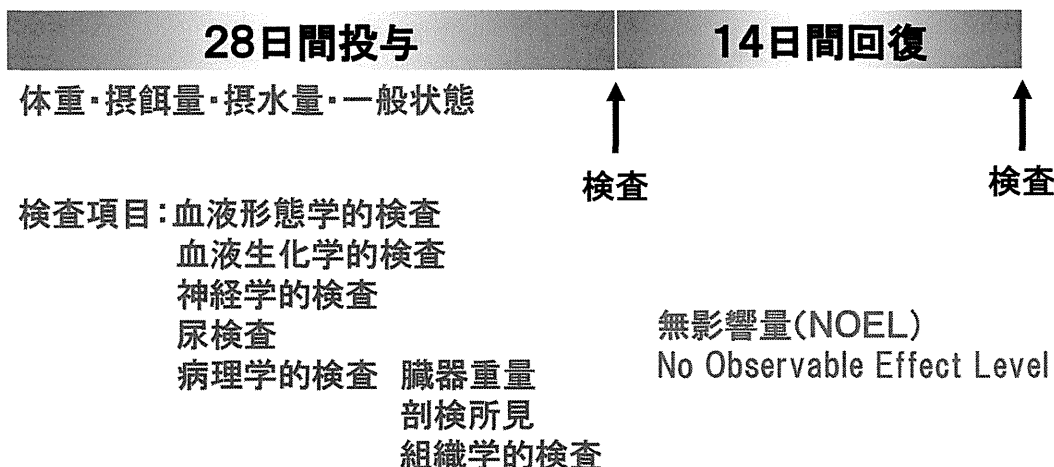
OECD. 2007. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 80, Guidance on grouping of chemicals.

4

28日間反復投与毒性試験

目的:動物に被検物質を一定期間毎日反復投与したときに現れる生体の機能及び形態の変化を観察することにより、被検物質の毒性を明らかにすることを目的とする。

齧歯類(原則ラット)



nite

NEDO/経済産業省委託事業

「構造活性相関手法による有害性評価手法開発」

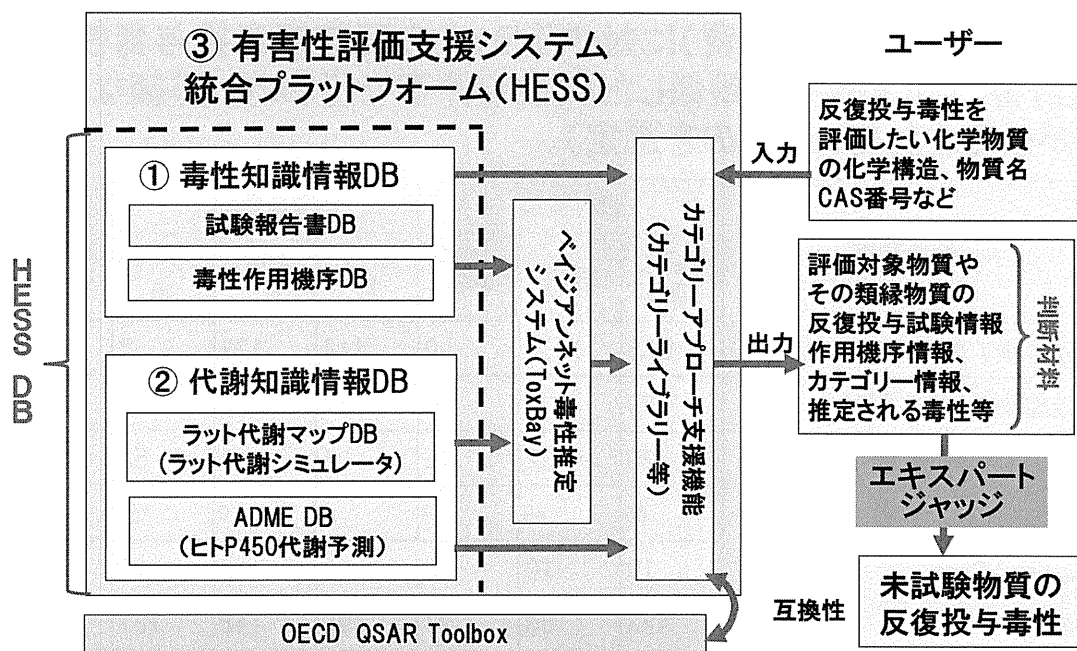
実施期間 平成19年度～平成23年度

基本計画 化学物質のリスク評価におけるヒト健康影響の評価に際し、安全性試験データがない化学物質に対し、類似化学物質の反復投与毒性試験データやその他の既知見を用いて、カテゴリーアプローチ等の手法により反復投与毒性を推定できるよう必要となる判断材料を評価者(専門家)に提供するデータベース及び評価支援システムを開発する。

nite

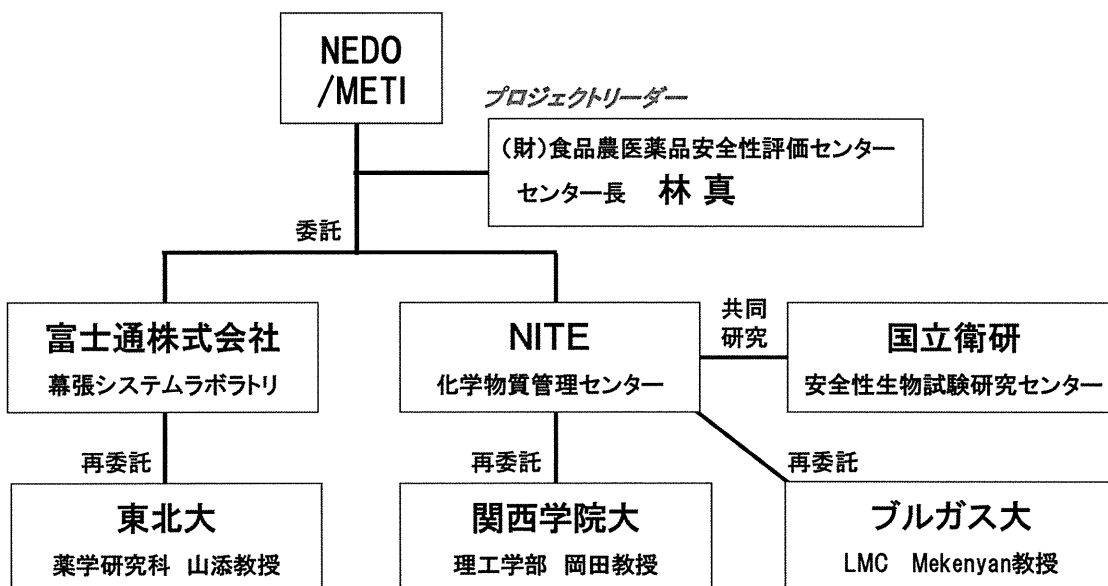
6

HESSの構成



Hayashi, M. and Sakuratani, Y. 2011. Development of an Evaluation Support System for Estimating Repeated Dose Toxicity of Chemicals Based on Chemical Structure. In: New Horizons in toxicity Prediction. Wilson, A. G. E. ed., Royal Society of Chemistry: Chap. 3.

実施体制



試験報告書DB

一般化学物質(500物質)に対するラットの反復経口投与毒性試験報告書。(GLP準拠の類似した試験条件下で行われ、詳細なデータが公表されているものを選定)。

(試験数)

報告書群	投与経路			投与期間			合計
	強制経口	混餌	飲水	28-30日	約42日*	12-17週	
厚労省 / 国衛研 化審法試験	268	0	0	144	122	2	268
経産省 / NITE 試験	50	0	0	27	23	0	50
米国NTP短期試験	20	22	15	4	0	53	57
米国NTP長期試験(予備試験)	66	49	9	2	0	122	124
Journal Paper	19	12	0	18	3	10	31
合計	423	83	24	195	148	187	530

※ 併合試験。雄ラットの反復投与毒性試験データのみ使用。

nite

阿部 武丸, 小林 克己, 西川 智, 山田 隆志, 長谷川 隆一, 櫻谷 祐企, 山田 隼, 広瀬 明彦, 鎌田 栄一, 吉田 緑, 藤内 桃子, 本間 正充, 山下 辰博, 酒井 広太, 山添 康, 林 真. 2012. Hazard Evaluation Support System Database (HESS DB) の開発. PHARM STAGE 10(5):40-47

9

毒性作用機序DB

作用機序文献情報: 試験報告書DBの試験において特定の臓器に対する毒性が強く認められた物質(54物質)について、その毒性の作用機序を示唆する実験データが、記載された文献の要約を収載(164文献)。各文献について、各種実験条件、トキシカント、提案されている作用機序等の21の項目についてDB化。

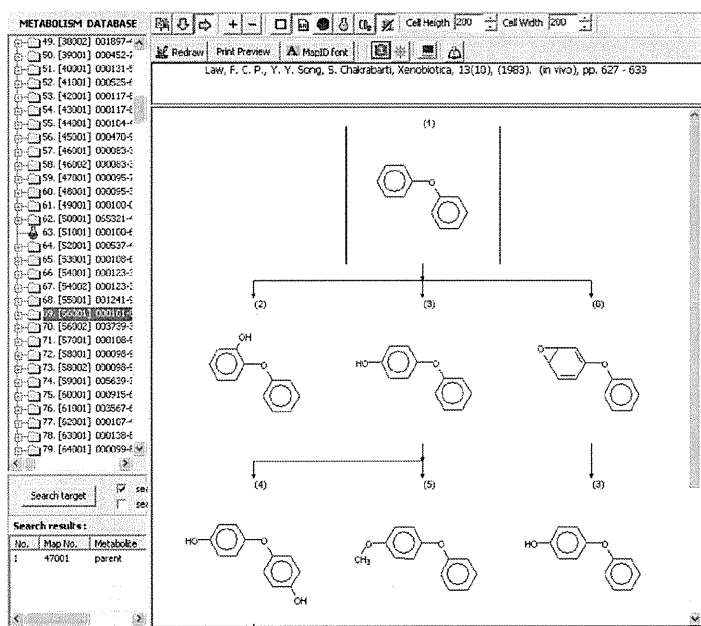
	溶血性貧血	肝毒性	腎毒性	精巢毒性	神経毒性	膀胱毒性	合計
物質数	29	13	7	9	2	1	54
文献数	76	41	13	26	7	1	164

作用機序解説文書: 多くの文献がある作用機序情報については、それらをまとめた解説文書を添付(4文書): ①Anilineによる溶血、②Ethylene glycol alkyl etherによる溶血、③Allyl esterによる肝毒性、④Ethylene glycol alkyl etherによる精巢毒性

nite

Yamada, T. Tanaka, Y. Zhang, H.Q. Hasegawa, R. Sakuratani, Y. Yamada, J. and Hayashi, M. 2012 A category approach to predicting the hemolytic effects of ethylene glycol alkyl ethers in repeated-dose toxicity. J. Toxicol. Sci. 37: 503-515.

ラット代謝マップDB



ラットの肝臓等における実測の代謝マップ (800 物質, 1040 マップ) をDB化。



化学構造から代謝物を予測する代謝シミュレータを開発し搭載。

nite

11

ADME DB (収載情報)

1) ADME文献情報

試験報告書DBの物質(61物質)について、ヒト及び実験動物の体内動態(吸収・分布・代謝・排泄)に関する実験データが記載された収載(約112文献)。各文献について32種類の項目をDB化。

生物種	ヒト	ラット	マウス	その他の生物種
文献数	18	77	14	35

2) ヒトP450代謝予測情報

試験報告書DBの物質(337物質)について、プロジェクトで開発した手法により予測したヒトP450(2E1, 1A2)による代謝物を収載。

nite Yamazoe, Y. Ito, K. Yoshinari, K. 2011. Construction of a CYP2E1-template system for prediction of the metabolism on both site and preference order. Drug Metabol. Rev. 43: 409-439.

12

