

平成 30 年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質の
ヒト健康リスクの評価戦略の開発
(H30-化学-指定-005)

分担研究報告書

反復投与毒性の AOP キーイベントリードアクロスモデルの精度向上に関する研究

研究分担者	広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	部長
研究協力者	山田 隆志	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	室長
研究協力者	城島 光司	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究生
研究協力者	田邊 思帆里	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	主任研究官
研究協力者	五十嵐 智女	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究助手
研究協力者	鈴木 洋	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	川村 智子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員

研究要旨

H30 年度は、化学物質の主要な標的臓器である肝臓に対して、従来の化学構造情報のみを基にした肝毒性構造アラート作成に代わる新たなアプローチとして、AOP の一部である分子開始キーイベント（MIE）情報に基づいた *in vitro* 試験データを用いた肝毒性予測モデルの作成を試みた。MIE 情報を検索するための化学物質の *in vivo* データソースとしては HESS と Open TG-GATEs の反復投与毒性試験情報を用い、外部検証として ToxRefDB の反復投与毒性試験情報を適用した。一方、PubChem BioAssay より肝毒性と関連性のある MIE として 47 の *in vitro* 試験データを収集した。予測対象物質そのもの（Model A）あるいは類似化合物（Model B）が、それぞれの *in vitro* 試験データに含まれていた場合に、そのインビト試験の結果（Active or Inactive）を肝毒性の陽性と陰性を判定する 2 種類の予測モデルを作成した。予測モデルは、既存の知識ベース毒性予測モデル Derek Nexus と比較して幅広いケミカルスペースをカバーしており、高い予測性能を有していることが示された。また、Model B は、最適な類似度の設定を模索することで、より幅広いケミカルスペースを対象とすることでより感度の高い予測性能の高いモデルに発展していくことが期待できた。一方で、本モデルでカバー出来ていない毒性機序の存在や、*in vivo* における ADME の影響を考慮することにより、予測性能をさらに向上させることができることも示された。

A. 研究目的

近年の化学物質の規制に関わる国際的な関心は、化学物質の安全性評価において動物実験を用いた試験だけに頼ることなく、化学物質曝露による有害作用を同定し評価するための評価ストラテジーを確立することであり、その中において構造活性相関(QSAR)やカテゴリーアプローチなどの *in silico* 手法を用いたコンピュータトキシコロジーは重要な位置づけでもあり、発展の望まれる研究分野である。本研究では、反復投与毒性の毒性予測モデル開発の一環として、肝毒性に焦点を当ててきたが、従前の構造情報と毒性情報との相関性を基にした肝毒性アラートを作成してきた手法に代えて、肝毒性エンドポイントに関連する key event 情報を収集し、毒性試験結果で得られた肝毒性物質の毒性プロファイルと組み合わせることによる新たなアプローチを用いた肝毒性の予測モデルの作成を行うことを目的とする。

B. 研究方法

B-1. *In vivo* データの収集

肝毒性予測モデル構築のための MIE 情報を検索するための化学構造を持つ化学物質の *in vivo* データと、外部検証に用いるための *in vivo* データを収集した。MIE 検索用データは内部検証としても用いた。MIE 検索用データは、HESS (Hazard Evaluation Support System) と医薬基盤・健康・栄養研究所が提供する Open TG-GATEs (Toxicogenomics Project-Genomics Assisted Toxicity Evaluation System) の反復投与毒性試験情報(HESS : 約 700 試験、Open TG-GATEs : 約 150 試験) から収集した。肝臓の臓器重量変化および病理組織学的変化の所見における LOEL(最小

影響量) Liver が 50 mg/kg/day 以下の被験物質を肝毒性陽性物質とし、LOEL Liver 1000 mg/kg/day 以上の物質を肝毒性陰性物質とし、陽性物質 : 170 物質、陰性物質 : 173 物質を収集した。外部検証用データセットとしては US EPA が提供する ToxRefDB (Toxicity Reference Database) に記載された反復投与毒性試験(約 500 試験)の情報から、上記の基準に従い肝毒性陽性物質 : 128 物質、陰性物質 : 72 物質を収集した。

B-2. MIE 情報の収集

肝毒性と関連すると思われる分子キーイベント (MIE) を測定した *in vitro* 試験のデータを PubChem BioAssay から収集した。収集基準は次の(1)~(4)の条件を満たすものとした。

- (1) 標的タンパクが明示されていること
- (2) 試験されている物質数が 100 以上
- (3) 試験結果のうち陽性(Active)の物質数が 4 以上である
- (4) 試験結果のうち、肝毒性陽性物質数の割合が 0.7 以上であること。

さらに収集した *in vitro* 試験データの中から、肝毒性と関連性のあるタンパク質の絞り込みを行うため、QIAGEN 社が提供する遺伝子パスウェイ解析ソフトウェアの IPA (Ingenuity Pathway Analysis) から肝毒性に関する ToxList に記載されている MIE 情報で絞り込みを行った。その結果、肝毒性と関連性のある MIE として 47 の *in vitro* 試験データを収集した。核内受容体および芳香族炭化水素受容体のシグナル攪乱に関する試験は 24 試験、CYP の阻害試験は 12 試験、その他各種シグナル活性化や阻害を測定した試験 11 試験から各種物質の *in vitro* 試験データを収集した。

(倫理面への配慮) 本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

C-1. 予測モデルの構築

収集した 47 の *in vitro* 試験データを用いて肝毒性予測モデルを構築した。予測のプロセスの原則としては、クエリー (予測対象) 物質についてそれぞれの *in vitro* 試験データに含まれていた場合にその試験結果 (Active or Inactive) をそれぞれ陽性/陰性の判定とした。この予測方法は、収集した *in vitro* 試験で測定されている分子キーイベントが引き起されると肝毒性発現につながるであろうという仮説から設定している。しかし、全てのクエリー物質に *in vitro* 試験データが存在するとは限らないので、予測手法として、2 つのモデル (Model A および Model B) を構築した。

Model A: この Model では、クエリー物質の構造と一致する *in vitro* 被験物質の試験結果を採用する。構造の一致する被験物質が存在しない *in vitro* 試験については、試験結果の採用は行わない。

Model B: この Model では、Model A の判定に使用できた物質に加えて、類似する被験物質の試験結果も採用する。類似物質としては、クエリー物質と分子類似度の最も高い被験物質の試験結果を採用する。しかし、被験物質の分子類似度が予め設定した閾値を超えていない場合は試験結果の採用を行わないことにした。分子類似度の算出には比較する物質同士の Morgan Fingerprint (Feature Definition、半径 3、2048 ビット) から Dice 係数を用いて算出した。

モデルの構築はプログラミング言語であ

る Python (version 2.7.12) を用い、構造情報の InChIKey や Morgan Fingerprint の生成、および Dice 係数の計算にはオープンソースのケモインフォマティクスソフトウェアである RDKit を使用した。

C-2. 予測モデルの検証

作成した Model A および Model B の予測性能を検証として、内部検証用には HESS-TGP データセットを、外部検証用には ToxRefDB データセットを用いた。比較対象の毒性予測モデルとして、Lhasa 社が提供する知識ベース毒性予測モデルの Derek Nexus を用いた。Derek Nexus の予測の条件としては、肝毒性アラートの Level of Likelihood(毒性発現の確からしさ)を Equivocal(7 段階の真ん中)以上に設定した。また、Model A と Derek Nexus のどちらか一方でも陽性と予測した時の予測性能も検証した(Model A + Derek)。

HESS-TGP データセットを用いて内部検証の結果、各モデルのクロス集計表と、肝毒性予測性能は以下のとおりであった。

Model A のクロス集計表

		予測 (Model A)	
		陽性	陰性
<i>in vivo</i> 肝毒性	陽性	84	86
	陰性	27	146

Model B のクロス集計表

		予測 (Model B)	
		陽性	陰性
<i>in vivo</i> 肝毒性	陽性	88	82
	陰性	37	136

HESS-TGP データセットに対する肝毒性予測性能

	Model A	Model B	Derek	Model A + Derek
感度	0.49	0.52	0.44	0.72
特異度	0.84	0.79	0.82	0.69
陽性的中率	0.76	0.70	0.72	0.70
F 値	0.60	0.60	0.55	0.71
正確度	0.67	0.65	0.63	0.71

感度は Model A で 0.49 であった。Model B では Model A よりも真陽性が 4 物質増えたために、感度は上昇し、0.52 であった。特異度は Model A で 0.84 となった。Model B では、偽陽性が Model A よりも 10 物質増加したため、特異度は 0.79 に減少した。そのほか陽性的中率、F 値、正確度については Model B が Model A を下回った。Derek Nexus との比較では、Model A, Model B とともに Derek Nexus より高い感度となった。Model A では全ての評価指標で Derek Nexus よりも高い数値が得られた。Model A + Derek ではそれぞれのモデルと比べて特異度が低下したが、感度が 0.7 を超え、F 値と正確度で最も高い数値となった。

肝毒性予測に寄与した *in vitro* 試験データを解析するために、Model A についての *in vitro* 試験データごとに F 値を計算した結果、最も高い F 値が得られた *in vitro* 試験データは甲状腺ホルモン受容体(Thrb)シグナルの抑制に関する試験データで、次いでアンドロゲン受容体(AR)のアンタゴニスト試験と CYP2C9 の阻害試験のデータとなった。F 値の高い上位 10 データの各々の感度は低いが、陽性適中率はどれも 0.75 以上と高いものであった。

ToxRefDB データセットを用いての外部

検証の結果、各モデルのクロス集計表と、肝毒性予測性能は以下のとおりであった。

Model A のクロス集計表

		予測 (Model A)	
		陽性	陰性
<i>in vivo</i> 肝毒性	陽性	88	40
	陰性	19	53

Model B のクロス集計表

		予測 (Model B)	
		陽性	陰性
<i>in vivo</i> 肝毒性	陽性	95	33
	陰性	20	52

HESS-TGP データセットに対する肝毒性予測性能

	Model A	Model B	Derek	Model A + Derek
感度	0.69	0.74	0.43	0.81
特異度	0.74	0.72	0.78	0.61
陽性的中率	0.82	0.83	0.78	0.79
F 値	0.75	0.78	0.55	0.80
正確度	0.71	0.74	0.55	0.74

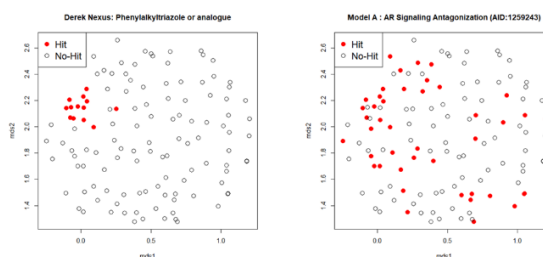
Model A は感度が 0.69、特異度が 0.74 となり、HESS-TGP データセットを用いた時より感度が高くなった一方で特異度が減少した。また Model B では Model A と比較して特異度の減少に対する感度の上昇が大きく、陽性的中率、F 値、正確度のいずれにおいても Model A を上回った。Model A, Model B とともに Derek Nexus と比較して特異度は下回った。一方で Derek Nexus の感度は 0.5 以下であったことに対して、Model A および Model B は 0.7 前後の感度が得られた。肝毒性予測に寄与した *in vitro* 試験データを

解析するために、Model A についての *in vitro* 試験データごとに F 値を計算した結果、HESS-TGP データセットと同じくアンドロゲン受容体(AR)と甲状腺ホルモン受容体(Thrb)のアンタゴニストを測定した試験データが上位2位の高いF値を示した。一方、HESS-TGP データセットで上位を占めていた CYP の阻害に関する試験に代わって、エストロゲン受容体(ER)や CAR などの核内受容体のシグナル攪乱に関する試験のデータが上位に入った。F 値の高い上位 10 データの各々の感度は低い、陽性適中率はどれも 0.83 以上と HESS-TGP データセットの場合よりも高いものであった。

D. 考察

本研究で作成した Model A の予測性能については、内部検証用の HESS-TGP データセットに対する全ての評価指標(感度、特異度、陽性的中率、F 値、正確度)と外部検証用の ToxRefDB データセットに対する特異度以外の評価指標は Derek Nexus を上回った。このことから、本研究で用意したデータセットに対して、Model A は Derek Nexus よりも高い予測性能を有していることが明らかになった。Derek Nexus の構造アラートによるアプローチと比べて、Model A によってカバーされる肝毒性陽性物質のケミカルスペースが幅広いことが要因の一つであると考えられた。例えば、ToxRefDB データセットの肝毒性陽性物質に対して最も多くヒットした Derek Nexus のアラートは「Phenylalkyltriazole or analogue」であるが、肝毒性陽性物質全体のケミカルスペースの中でカバーしている範囲は狭い。これに対して Model A で最もヒットしたアンドロゲ

ン受容体(AR)アンタゴニスト試験(AID:1259243)では、広いケミカルスペースをカバーしているため、*in vitro* 試験データを利用した Model A が Derek Nexus より高い予測性能を示したと推測される。



Derek Nexus (左) と Model A (右) がカバーするケミカルスペースの例 (ToxRefDB データセットの肝毒性陽性物質について分子類似度を用いて距離行列を作成し、多次元尺度構成法で 2 次元に配置した。)

一方、収集された *in vitro* 試験データの多くは内部検証だけでなく、外部検証用の ToxRefDB データセットにおいても高い陽性的中率を有しており、これらが測定の対象としている分子キーイベントは何等かの形で肝毒性に寄与していると考えられる。例えば、肝毒性予測に対して高い F 値を達成した核内受容体のシグナル攪乱に関する化学物質については、肝臓における様々な内在性代謝への影響や、細胞の肥大・増殖などとの関連性を示唆する研究報告が知られているほか、CYP 阻害の肝毒性影響に対する機序的な関連性についてはよく解明されていないが、一部は化学物質が CYP 分子種の阻害剤として作用することにより、肝臓における内在性リガンドの代謝を抑制する可能性、あるいは化学物質が CYP 分子種の基質として作用して反応性代謝物が生成し、生体高分子に作用することにより細胞スト

レスや機能障害を引き起こす可能性などが報告されている。

一方、知識ベースの Derek Nexus より感度は上がったとは言え、未だ相当数の偽陰性物質が存在する。これは、未だ肝毒性に関する MIE 情報が不足していることを示すものであるが、それだけではない。HESS-TGP データセットにおいて Model A で偽陰性となり Derek Nexus で真陽性となった物質について Derek Nexus のアラート数を解析すると「Aromatic nitro compound」「Halobenzene」「Halogenated hydrocarbon」に 6 物質が含まれていた。このうち、「Halobenzene」と「Halogenated hydrocarbon」については、ハロゲン化物の多くは CYP2E1 による代謝活性化が毒性発現に関与していると考えられているが、本研究で収集した *in vitro* 試験データの中に CYP2E1 に関する試験は含まれていなかった。「Aromatic nitro compound」も Derek Nexus によると毒性発現に代謝が関与しているとされている。同様に ToxRefDB データセットに対する Model A の偽陰性物質については「Phenoxyacetic acid or derivative」のアラートが多く、このアラートも代謝活性化が毒性発現に関与しているとされている。この様に Model A で偽陰性となる物質の特徴の 1 つに代謝活性化の関与が考えられた。

一方、本研究で作成した肝毒性予測モデルの予測性能を下げる偽陽性の要因として、ADME の影響が考えられ、その 1 つに、経口アベイラビリティの影響が挙げられる。経口バイオアベイラビリティに影響する化学記述子として TPSA (Topological Polar Surface Area) と RBC (Rotatable Bond Count) が提案されており、RBC > 10 または TPSA

> 140 で経口アベイラビリティが低くなることが示されている。HESS-TGP データセットの解析では、RBC > 10 または TPSA > 140 である物質の多くは肝毒性陰性であり、これらの記述子等を用いて経口バイオアベイラビリティが低い物質をあらかじめ予測することにより、予測性能を向上させることができる可能性がある。また、排泄の影響も考えられた。HESS-TGP データセットおよび ToxRefDB データセットでスルホ基を持つ物質は全部で 22 物質あり、その内 21 物質が肝毒性陰性であったが、Model A に偽陽性となった物質が 5 物質含まれていた。スルホ基を持つ物質は、硫酸抱合反応などで速やかに体内から排泄され、肝毒性影響が軽減されると考えられる。この様な ADME を考慮することにより偽陽性を減らすことができる可能性が示された。

E. 結論

H30 年度は、化学物質の主要な標的臓器である肝臓に対して、従来の化学構造情報のみを基にした肝毒性構造アラート作成に代わる新たなアプローチとして、AOP の一部である分子キーイベント (MIE) 情報に基づいた *in vitro* 試験データを用いた肝毒性予測モデルの作成を試みた。MIE 情報を検索するための化学物質の *in vivo* データソースとしては HESS と Open TG-GATEs の反復投与毒性試験情報を用い、外部検証として ToxRefDB の反復投与毒性試験情報を適用した。一方、PubChem BioAssay より肝毒性と関連性のある MIE として 47 の *in vitro* 試験データを収集した。予測対象物質そのもの (Model A) あるいは類似化合物 (Model B) が、それぞれの *in vitro* 試験データに含

まれていた場合に、その *in vitro* 試験の結果 (Active or Inactive) を肝毒性の陽性と陰性を判定する 2 種類の予測モデルを作成した。予測モデルは、既存の知識ベース毒性予測モデル Derek Nexus と比較して幅広いケミカルスペースをカバーしており、高い予測性能を有していることが示された。また、Model B は、最適な類似度の設定を模索することで、より幅広いケミカルスペースを対象とすることでより感度の高い予測性能の高いモデルに発展していくことが期待できた。一方で、本モデルでカバー出来ていない毒性機序の存在や、*in vivo* における ADME の影響を考慮することにより、予測性能をさらに向上させることができることも示された。

F. 研究発表

誌上発表

1. Igarashi T, Serizawa H, Kobayashi K, Suzuki H, Matsumoto M, Iso T, Kawamura T, Inoue K, Ono A, Yamada T, Hirose A. Initial hazard assessment of 4-benzylphenol, a structural analog of bisphenol F: Genotoxicity tests *in vitro* and a 28-day repeated-dose toxicity study in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **96**, 64-75, 2018.
2. Igarashi, T., Takashima, H., Takabe, M., Suzuki, H., Ushida, K., Kawamura, T., Matsumoto, M. Iso T, Tanabe S, Inoue K, Ono A, Yamada T, Hirose A. Initial hazard assessment of benzyl salicylate: *In vitro* genotoxicity test and combined repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats. *Regul.*

Toxicol. Pharmacol., **100**, 105-117, 2018.

3. Kohara A, Matsumoto M, Hirose A, Hayashi M, Honma M, Suzuki T. Mutagenic properties of dimethylaniline isomers in mice as evaluated by comet, micronucleus and transgenic mutation assays. *Genes Environ.* 2018 Aug 22; **40**:18. doi: 10.1186/s41021-018-0106-3. eCollection 2018.
4. Matsumoto, M., Furukawa, M., Kobayashi, K, Iso, T., Igarashi, T., Yamada, T., Hirose, A. A 28-day repeated oral-dose toxicity study of insecticide synergist N-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2.2.2]oct-5-ene-2,3-dicarboximide in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.*, **5**, 1-11, 2018.
5. Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A. Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N, N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt. *Fundam. Toxicol. Sci.*, **5**(5):167-170. 2018
6. Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Igarashi, T., Hirose, A. Male-specific prolongation of prothombin time by industrial chemicals. *Fundam. Toxicol. Sci.*, **5**, 75-82, 2018.

学会発表

1. Yamada, T., Kurimoto, M., Miura, M., Kawamura, T., Jojima, K., Taira, N., Ohata, H., Tsujii, S., Ohno, A., Hirose, A. Establishing mechanistic key event information of repeated dose toxicity to support category-based read-across

- assessment. 58th Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2019, Baltimore, USA)
2. Yamada, T., Matsumoto, M., Kitajima, S., Aisaki, K., Kanno, J., Hirose, A., Category assessment of repeated-dose hepatotoxicity of phenolic benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016. 54th EUROTOX 2018 (September 2018 Brussels)
 3. 五十嵐智女、高部道仁、高島宏昌、鈴木洋、牛田和夫、松本真理子、磯貴子、川村智子、井上薫、小野敦、山田隆志、広瀬明彦：サリチル酸ベンジルの遺伝毒性、反復投与毒性及び生殖発生毒性のスクリーニング. 第45回日本毒性学会学術大会 (2018年7月大阪)
 4. 山田隆志、栗本 雅之、広瀬明彦、Chihae Yang, James F Rathman：非発がんエンドポイントのTTCアプローチを改良するための新しいデータベースの開発. 日本動物事件代替法学会第31回大会 (2018年11月熊本)
 5. 松本真理子、田邊思帆里、芹沢英樹、高部道仁、川村智子、五十嵐智女、磯貴子、井上薫、山田隆志、広瀬明彦：アセナフチレンの人健康影響に係る安全性試験結果：28日間反復投与毒性試験及び遺伝毒性試験. 第45回日本毒性学会学術大会 (2018年7月大阪)
 6. 城島光司、山田隆志、広瀬明彦：インビトロ試験データを用いた分子レベルのイベントによる肝毒性予測. 第46回構造活性関連シンポジウム(2018年12月大阪)
 7. 城島光司、山田隆志、広瀬明彦：分子キーイベントのインビトロ試験データを用いた肝毒性予測モデルの開発. 日本動物事件代替法学会第31回大会 (2018年11月熊本)
 8. 田邊思帆里、広瀬明彦、山田隆志：Adverse Outcome Pathway(AOP)の構築～ヒストン脱アセチル化酵素阻害による精巣毒性に関するAOPを例に～. 第45回日本毒性学会学術大会 (2018年7月大阪)
 9. 田邊思帆里、山田隆志、広瀬明彦：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDI)によるシグナルパスウェイ～OECDにおける有害性発現パスウェイ (Adverse Outcome Pathway) の取り組みについて～. 第41回日本分子生物学会年会 (2018年11月横浜)
 10. 田邊思帆里、山田隆志、広瀬明彦：遺伝子ネットワーク解析による分子パスウェイ解明及びAOP 開発状況について. 日本薬学会第139年会 (2019年3月千葉)
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
なし