

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（課題番号：22KD1002）
令和6年度研究成果報告書

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発
研究代表者 安彦行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長
分担課題：化学構造によるグルーピング及びリードアクロスによる神経毒性のin silico予測
研究分担者：吉成浩一 静岡県立大学 教授

研究要旨

以前の研究において、発達神経毒性に関する文献情報を基にデータセットを構築し、化学構造情報（分子記述子）を利用した化学物質間の類似性を評価してクラスタリング解析やリードアクロスを利用することで、化学構造からある程度の精度でDNTを予測できることが示唆された。一方で、使用したデータセット内物質の毒性評価の不確実性が予測結果に大きく影響することが強く示唆された。そこで本年度は、よりデータの信頼性が高いと考えられる食品安全委員会の農薬評価書を利用して、ラット90日間反復投与毒性試験の神経毒性と関連する2つのエンドポイント、すなわちコリンエステラーゼ活性阻害（CE01と定義）及び神経毒性と関連する外観・行動変化（NV01と定義）を評価対象として分子記述子と生物活性予測値を利用したリードアクロスによる予測手法の検討を行った。CE01では、陽性物質として有機リン系農薬が多く含まれていたこともあり、化学構造情報（分子記述子）のみを用いた予測においても感度及び特異度の平均値であるbalanced accuracy（BA）は0.75程度と高かった。さらに生物活性予測値を変数として追加することで、精度の向上が見られ、BAは0.8程度となった。NV01については、CE01に比べて予測精度は低く、分子記述子のみの予測におけるBAは0.56であった。生物活性予測値を加えた場合には、統計学的に毒性と関連する変数を選択することで、BAは0.62程度まで上昇した。以上の結果から、神経毒性と関連するエンドポイントのリードアクロスを利用した予測においては、化学構造情報だけでなく生物活性予測値の利用が有用であることが示唆された。

A. 研究目的

化学物質の発達神経毒性（DNT）を動物実験で評価するには多大なコストと時間を要する。また、近年動物福祉の観点から、実験動物を用いた安全性試験の代替法の開発が求められており、インビトロ及びインシリコ手法を活用した評価手法の研究開発が進められている。しかし、DNTに関しては、公的に利用可能な毒性試験データベースがないことなどの理由から研究が遅れている。そこで私達は、本研究班において、DNT評価におけるインシリコ手法の有用性を提案するために、既存情報からDNT予測のためのデータセットを構築し、DNTを示す物質のグルーピング解析や階層的クラスタ解析並びにリードアクロス手法によるDNT評価手法の開発に向けた基礎検討を行ってきた。

これまでに、化学構造情報を数値化した分子記述子を利用して化学物質間の類似性を評価し、クラスタリング解析やリードアクロスを利用することで、化学構造からある程度の精度でDNTの予測が可能であることが明らかになった。また、これらの結果とインビトロ試験を組み合わせることで予測精度の向上に繋がることが示唆された。一方で、使用したデータセットの毒性評価の不確実性が結果に大きな影響を与えていることも明らかになった。そこで本年度は、これまでのデータセットとは異なるより信頼性の高い毒性試験情報のデータセットを用いて、これまでの分子記述子を用いたリードアクロス手法の妥当性の検証を行うとともに、生物活性情報の利用の有用性を解析した。

B. 研究方法

1. データセット

当研究室では、食品安全委員会が公開している農薬評価書のラット反復投与毒性試験（90日間、2年間）の結果を独自にデータベース（DB）化している。このDBでは、試験結果を約1000のエンドポイント（EP）として整理している。本研究では、このDBのうち、90日間試験の結果がある350農薬を利用した。

2. 評価対象EPの設定

本研究では2つのEPを解析対象とした（表1）。1つは「脳コリンエステラーゼ（ChE）活性低下」、「赤血球ChE活性低下」及び「血中ChE活性低下」の3つのEPをまとめたChE関連所見、もう1つは神経毒性と関連すると考えられる外観・行動の33所見をまとめたものとした。本研究ではこれらをそれぞれグループEP（gEP）、CE01及びNV01と定義した。CE01及びNV01の陽性物質数（陽性率）はそれぞれ35農薬（10.0%）及び59農薬（16.9%）であった。

3. 化学物質の類似性評価

分子記述子及び生物活性予測値は、それぞれalvaDescソフトウェア（Alvascience、ver 2.0.12）及びPASSソフトウェア（geneXplain社、ver. 2022Standard）を利用して計算した。PASSでは、生物活性予測値を陽性である確率（Pa）と陰性である確率（Pi）の差（Pa-Pi）として提示することからこの値を使用した。Pa及びPiは0～1の値を取るため、Pa-Piは1～-1の値を取る。これらの値は最大値が1、最小値が0となるように正規化

した。使用した変数により物質間のユークリッド距離を計算した後、理論上の最大距離（使用した変数の数の平方根）で除して相対距離とした。この相対距離を物質間の類似性の指標とした。

4. リードアクロスの実施

350農薬から1物質を予測対象物質（ターゲット物質）として選択し、残りの物質を類似物質（ソース物質）の候補物質とする解析を全350農薬について実施した。

毒性判定は、Weighted sum (WS) ruleを用いて行った。具体的な方法は以下の通りである。なお、近傍物質数（ k ）は先行研究に従い、350の平方根の最大奇数である17とした。

- 1) k -近傍物質に対する近傍スコアを次式で算出した。
(近傍スコア) = $1/\log_2(1+k)$
- 2) 陽性スコアと陰性スコアをそれぞれ第1近傍から第17近傍に対するスコアの和（総陽性スコア及び総陰性スコア）として算出した。参考として、 $k = 1 \sim 5$ のスコアを下表に示した。

k	1	2	3	4	5
gEP	陰性	陽性	陰性	陽性	陽性
近傍スコア	1	0.63	0.5	0.43	0.39
陽性スコア	0	$0 + \underline{0.63}$ = 0.63	$0.63 + 0$ = 0.63	$0.63 + \underline{0.43}$ = 1.07	$1.07 + \underline{0.39}$ = 1.46
陰性スコア	<u>1</u>	$1 + 0$ = 1	$1 + \underline{0.5}$ = 1.5	$1.5 + 0$ = 1.5	$1.5 + 0$ = 1.5

各近傍物質の毒性により、近傍スコアを陽性スコア又は陰性スコアとして与え（下線部）、 $k = 17$ まで合計した。

- 3) 得られた総陽性スコアと総陰性スコアから、下式により毒性判定スコアを算出し、これらの値がDB全体の陽性率（CE01：10.0%、CV01：16.9%）を上回った場合、被験物質をgEP陽性と判定した。
(毒性判定スコア)
= 総陽性スコア / (総陽性スコア + 総陰性スコア)
- 4) これらの判定を350物質で行い、全体の感度、特異度、balanced accuracy (BA) を予測精度の指標として算出した。

C. 研究結果

1. 分子記述子の選択が予測精度に与える影響

まず、gEPと統計学的に関連のある記述子を選択した場合、予測精度が向上するか否かを解析した（図1）。

CE01又はNV01の陽性及び陰性で物質を2群に分け、Wilcoxonの順位和検定を用いて比較し、 $p < 0.05$ となった記述子（CE01：801種、NV01：170種；以下「 $p < 0.05$ 記述子」）、 p 値が小さい順に並べた際の上位350記述子（以下「n350記述子」）を用いた。また、対照として、相関係数が0.99以上の記述子を削除した1889記述子（以下「 $r < 0.05$ 記述子」）を用いた。なお、1889記述子は量gEPで共通であるが、n350記述子は両gEPで異なる種類の記述子から構成される。

その結果、CE01ではBAが0.75程度の高い精度が得られたのに対して、NV01では、BAは0.56程度で分子記述子のみのでは高い精度の予測は困難であった。また、両gEPにおいて、記述子の選択による感度、特異度及びBAの大きな変化は認められなかった。以上のことから、毒性と関連する記述子の選択は予測精度の向上に繋がらないことが示唆された。

2. 生物活性データの利用が予測精度に与える影響

次に、分子記述子に加えて生物学的な情報を追加することで予測精度が向上するか否かを解析した。ただし、対象農薬について実験結果を利用することは困難であることから、本解析では、約8000種を超える生物活性を予測可能なPASSソフトウェアの予測値（生物活性予測値）を利用した。

具体的には、分子記述子と生物活性予測値を組み合わせ、相関係数が0.99を超える変数の一方を削除した変数のセット（ $r < 0.99$ ）、Wilcoxonの順位和検定にてCE01又はNV01の陽性・陰性と有意な関連が認められた変数のセット（ $p < 0.05$ ）、並びにWilcoxonの順位和検定の p 値が低い順に並べた際の上位350位の変数のセット（n350）を使用し、物質間のユークリッド距離を計算し、同様の手法でリードアクロスの予測を行った。使用した変数の数を表2に、リードアクロスの予測精度を図2（レーン2～4）に示した。

CE01においては、分子記述子のみを用いた場合（レーン1）に比べて程度はわずかであったが、生物活性予測値を利用することで感度、特異度及びBAのいずれも向上し、n350セットを用いた場合に最も高い感度が、 $p < 0.05$ を用いた場合に最も高い特異度が得られた。NV01においては、n350セットを用いた場合において、分子記述子のみを用いた場合に比べて感度の大きな向上（0.47→0.56）が認められ、BAも0.56から0.63に向上した。以上の結果から、PASSによる生物活性予測値を変数に追加することで予測精度が向上すること、さらにその際には対象とするgEPとの関連性が高い変数を絞り込んで利用することが精度向上に寄与することが示唆された。

3. 分子記述子及び生物活性予測値の組み合わせ手法の検討

肝毒性を対象としたリードアクロスに関する先行研究では、まず化学構造に基づいてソース物質候補を選択し、その後生物活性に基づいてさらにソース物質を絞り込むことで予測精度が向上する可能性が示されている。そこで本研究においても類似の手法の有用性を検討した。

具体的には、①分子記述子による物質間距離と生物活性予測値による物質間距離に基づいて物質を2次元空間にプロットし（被験物質は原点に位置）、原点からの距離に基づいてソース物質を選択する手法（以下「2次元リードアクロス」）並びに②分子記述子による物質間距離に基づいてソース物質候補を選択し、その後生物活性の一致度に基づいて最終ソース物質を選択する手法（以下「2段階リードアクロス」）の2つの手法の有用性を解析した。

2次元リードアクロスでは、表2に記載した変数を利用して2次元における被験物質とソース物質の物質間距離を計算し、各被験物質について、17種のソース物質を選定した。

2段階リードアクロスでは、まず、ソース物質の絞り込みに用いる生物活性を選定した。具体的には、各gEPの陽性・陰性に基づいて物質を2群に分け、Wilcoxonの順位和検定を行った。その結果、各gEPにおいて最も p 値が小さかった生物活性、すなわちCE01では「Pyruvate dehydrogenase kinase 1 inhibitor」、NV01では「Cognition disorders treatment」を選択した。また、CE01及びNV01はChE活性の阻害に起因する可能性が高いことから、PASSに含まれるChE関連生物活性のうち、 p 値が最も小さかった生物活性として、CE01では「Butyrylcholinesterase inhibitor」、NV01では

「Acetylcholinesterase stimulant」を選択した。PASSでは、生物活性予測値はPa-Piの-1~1の値として算出されることから、 $(Pa-Pi) \geq 0$ の場合にその活性は陽性、 $(Pa-Pi) < 0$ の場合には陰性として判定し、判定が被験物質と一致したものをソース物質の候補とした。

ソース物質の選択は、まず前述の「 $r < 0.99$ 記述子」を利用して計算物質間相対距離に基づいて順位付けを行い、その後第1近傍から順に、被験物質と生物活性予測が一致した物質のみを17物質選択した。リードアクロスによる毒性判定は、前項1と同様にWS ruleを用いて行った。

得られた結果を図2に示した。CE01については、2次元リードアクロスにおいて $p < 0.05$ セット及びn350セットを用いた場合に（レーン6、7）、これまでの方法に比べて高い予測精度が得られ、感度は0.71、特異度は0.88、BAは0.80であった。一方、2段階リードアクロスでは、いずれの変数を用いた場合もBAは0.75程度と高いものの、分子記述子のみを用いた場合と同程度であり、生物活性予測値の利用に伴う精度向上は認められなかった（レーン1 vs. 8, 9）。NV01については、n350セットの変数を用いた2次元リードアクロスでは（レーン7）、分子記述子のみを用いた場合に比べるとよい精度は得られたが、分子記述子と生物活性予測値を併せて行った場合（レーン4）と同程度の精度であった。また、2段階リードアクロスでは分子記述子のみを用いた場合に比べて精度の向上は認められなかった。

D. 考察

本研究では、農薬のラット90日間反復投与毒性試験結果を利用して、神経毒性と関連する2つのEPを対象としたリードアクロス予測における生物活性予測値の有用性を検討した。その結果、化学構造情報を反映する分子記述子に加えて、市販のソフトウェアで計算可能な生物活性予測値を用いることで予測精度の向上が認められること、また生物活性予測値を利用する際には毒性学的な関連性を考慮した上で変数の絞り込みが必要であることが明らかになった。

本研究で用いたPASSでは、約8000種の生物活性を予測可能であるが、入力情報は化学構造情報であり、分子記述子計算ソフトと同様である。しかしながら、生物活性予測値を追加して変数を選択することでリードアクロスによる予測精度はCE01及びNV01のいずれにおいても上昇した。この理由は明確ではないが、PASSに利用されている生物活性予測モデルを介することで、分子記述子とは異なる特徴をもった変数が創出されたと考えられる。

さらに、 $p < 0.05$ セットとn350セットの予測結果を比較すると、NV01においてはn350で高い予測精度が得られた。分子記述子のみを用いた場合には変数選択の効果は認められなかったこととは異なる結果ではあるが、 $p < 0.05$ セットでは生物活性予測値の変数数が物質数に対して過剰と考えられたことから、より毒性EPとの関連が強い変数の選択が精度向上につながった可能性が考えられる。

対象とした2つのEPで比較すると、いずれの変数セットを用いた場合も、NV01に比べてCE01で予測精度は高かった。この理由として、CE01に含まれる所見はいずれもChE阻害であり、構造的に類似した物質が陽性になると考えられること、また、用いたデータセットの中にChEを阻害することが知られている有機リン系農薬が多く含まれていたことなどから、CE01では、化学構

造やそれに基づく生物活性予測値を利用したリードアクロスによる予測が比較的用意であったのではないかと考えられる。一方で、NV01に含めた所見は、ChE阻害や神経毒性と関連するとは考えられるが、化学物質による間接的影響を反映するEPであることから、このことが予測精度の低さにつながったと考えられる。しかしながら、反復投与毒性試験で認められる所見の多くは間接的なものであり、Adverse Outcome Pathwayのスキームで考えると、molecular initiating event (MIE)ではなく、key event (KE)やadverse outcome (AO)の予測が、動物実験代替法や新たなNew Approach Methodology (NAM)の開発には重要である。したがって、今後、変数の追加や予測条件のさらなる検討が必要と考えられる。

近年、リードアクロスのケーススタディが多く報告され、その中ではフィンガープリントなどを利用した構造一致性に基づいてソース物質の候補を選択したのち、被験物質との生物学的特徴の一致性によりソース物質を絞り込むことでリードアクロスの精度が向上することが報告されている。そのため、本研究においてもこの方法論に基づく2段階リードアクロスを実施した。しかしながら、CE01及びNV01のいずれにおいても予測精度の向上は認められず、精度は分子記述子のみを用いた場合と同程度かそれ以下であった。本研究では単一の試験結果に基づいて生物活性の特徴を判定し、ソース物質の絞り込みを行っていたことが原因となっている可能性は否定できないことから、今後は複数の変数を利用した絞り込みを検討する必要がある。

一方で、本研究では、分子記述子と生物活性予測値を同程度のウェイトで利用することを目的として、両者の値に基づいて2次元に物質をプロットすることで被験物質からの距離を算出し、それを類似度の指標としてソース物質を選択する二次元リードアクロスを実施したところ、CE01では用いた条件のうち、最も高い予測精度が得られた。NV01でも変数の数を350に絞ることで分子記述子のみを利用した場合に比べて高い予測精度が得られた。精度が向上した正確な理由は不明であるが、上述のようにリードアクロスにおいては生物学的特徴の利用が有用であることが報告されており、2段階リードアクロスでは単一の試験のみを利用してのに対してこの解析では多数の変数を利用したことが効果的であった可能性がある。今後、さらなる変数選択や異なるEPへの適応などを検討し、本結果の検証を行う予定である。

E. 結論

神経毒性と関連するEPのリードアクロスを利用した予測においては、化学構造情報だけでなく生物活性予測値の利用が有用であることが示唆された。また、それらの変数を組み合わせて利用する際には、変数の選択手法や組み合わせ方の種類により予測精度に差が出る可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 解析対象としたEP

gEP	CE01	NV01
含まれる 所見	中枢神経-ChE活性阻害-脳	外観/行動-一般状態-消瘦
	血液学-赤血球ChE活性-減少	外観/行動-一般状態-流涎
	血液生化学-ChE-減少	外観/行動-汚れ-下腹部
		外観/行動-汚れ-顔
		外観/行動-汚れ-尾
		外観/行動-眼-眼瞼痙攣
		外観/行動-筋肉-筋緊張低下
		外観/行動-筋肉-筋緊張亢進
		外観/行動-呼吸-その他
		外観/行動-呼吸-緩徐呼吸
		外観/行動-呼吸-呼吸困難
		外観/行動-筋肉-その他
		外観/行動-行動-異常発声
		外観/行動-行動-自発運動低下/鎮静
		外観/行動-行動-自発運動亢進/興奮
		外観/行動-行動-身づくろいの減少
		外観/行動-行動-歩行異常
		外観/行動-行動-その他
		外観/行動-姿勢-円背位
		外観/行動-姿勢-側臥位
		外観/行動-姿勢-腹臥位
		外観/行動-姿勢-その他
		外観/行動-神経系-筋攣縮
		外観/行動-神経系-振戦
		外観/行動-神経系-反応異常
		外観/行動-神経系-痙攣
		外観/行動-体温-低下
		外観/行動-被毛-粗毛
		外観/行動-被毛-立毛
		観-眼球突出
		眼-その他-瞳孔
		耳-その他-平衡感覚
		便-性状-軟便

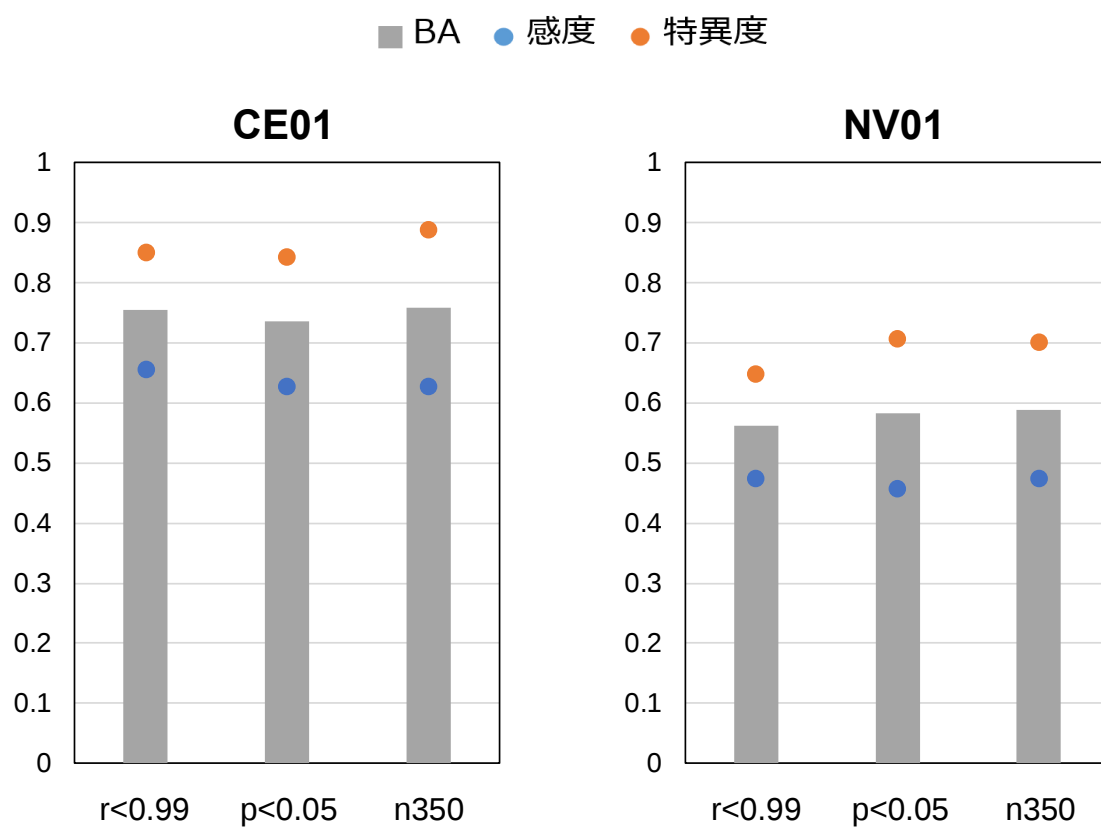
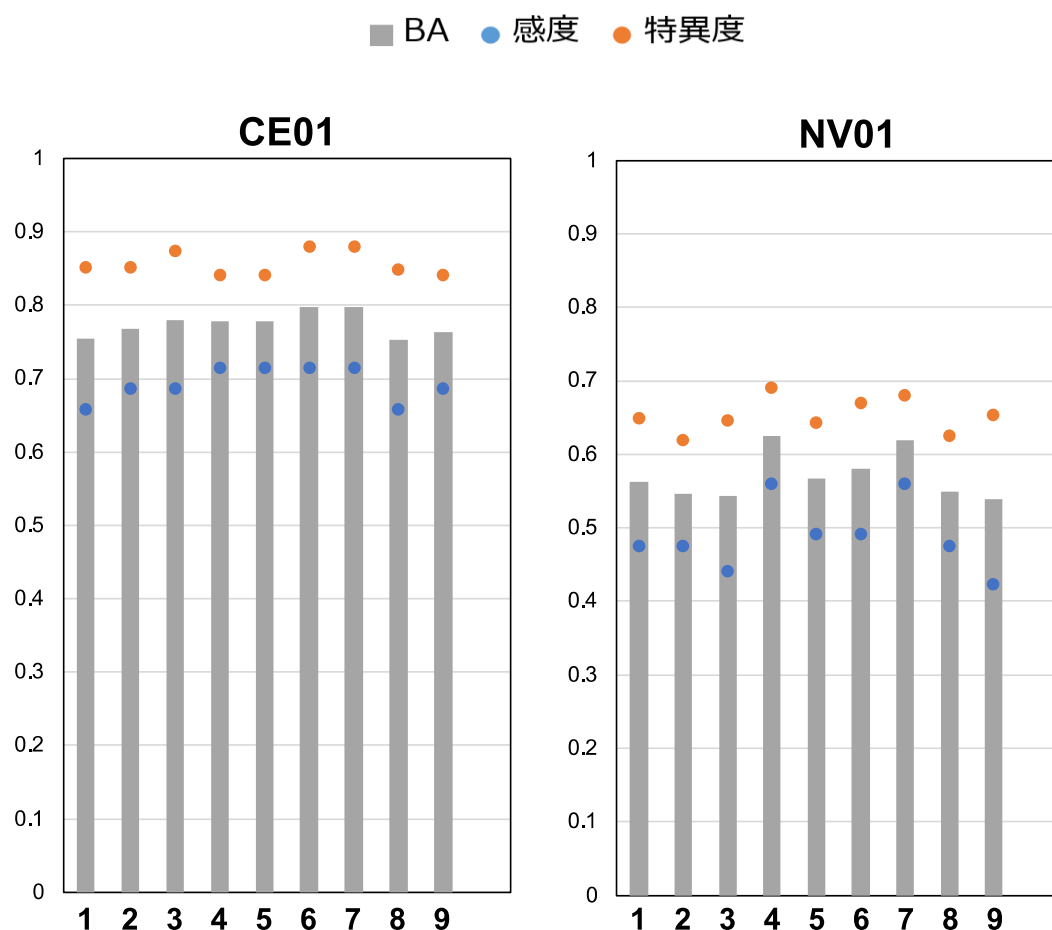


図1 分子記述子を利用したリードアクロスの予測精度



レーン	使用変数
1	分子記述子のみ ($r < 0.99$)
2	分子記述子+生物活性予測値 ($r < 0.99$)
3	分子記述子+生物活性予測値 ($p < 0.05$)
4	分子記述子+生物活性予測値 (n350)
5	2次元リードアクロス ($r < 0.99$)
6	2次元リードアクロス ($p < 0.05$)
7	2次元リードアクロス (n350)
8	2段階リードアクロス (最小p値)
9	2段階リードアクロス (ChE阻害関連)

図2 分子記述子と生物活性予測値を利用したリードアクロスの予測精度

表2 リードアクロスに利用した変数

変数セット	CE01			NV01		
	分子記述子	生物活性予測値	合計	分子記述子	生物活性予測値	合計
r<0.99	1926	8008	9934	1926	8008	9934
p<0.05	803	3813	4616	184	3006	3190
n350	56	294	350	29	321	350