

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4-6年度総合報告書

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

化学物質の神経毒性や発達神経毒性（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いる。そこで本研究では、インシリコ手法を活用したDNT及び神経毒性の予測手法の開発を目指した。まず、DNTに関する文献情報をもとに361物質からなるデータセットを構築した。これらを用いた解析の結果、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評価に基づくリードアクロスにより、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な影響を与えていることも明らかになった。そこでより毒性情報の精度が高い食品安全委員会が公開している農薬評価書のラット90日間反復投与毒性試験結果を利用して350物質のデータセットを構築し、コリンエステラーゼ活性阻害関連所見や神経毒性と関連する外観・行動変化を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を行った。その結果、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、化学構造情報に加えて適切な数の生物活性予測値を変数として利用することが有用であることが示唆された。さらに、DNTのデータセットを利用した解析により、新たなインシリコDNTリスク予測手法を考案した。本手法は、類似物質数、類似性の高さ、並びにその組み合わせにより、被験物質のDNTリスクをランク付けすることが可能であった。

A. 研究目的

化学物質の神経毒性や発達神経毒性（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。そこで我々は、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。本研究では、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の類似性を評価し、その結果に基づいたグルーピングやリードアクロスを行い、使用する分子記述子の種類、毒性予測に利用する類似物質の数などの検討を行った。さらに、食品安全委員会が公開されている農薬評価書を利用して異なるデータセットを作成し、分子記述子を利用したリードアクロスの予測性、並びに生物活性情報の追加が予測精度に与える影響を解析した。他方、これらのデータベースを活用して、DNTリスクが高い物質を化学構造情報からインシリコ手法で簡便にスクリーニングする方法の開発を試みた。

B. 研究方法

1) 文献情報を利用した解析

データセット：文献（*Neurotoxicol Teratol*, 52:25-35, 2015）から、DNTを示す物質及びDNT情報がない物

質を選択し、前者を「DNT陽性物質」（164物質）、後者を「DNT不明物質」（197物質）として使用した。データセットのDNT陽性率は0.454である。

分子記述子：alvaDescソフトウェア（Alvascience, ver 2.0）を利用して分子記述子を計算した。解析には、搭載されている33ブロックに分類された5,666記述子のうち、化学構造との関連を理解しやすい6ブロック（Constitutional indices、Ring descriptors、P_VSA-like descriptors、Functional group counts、Atom-centred fragments、Molecular properties）に含まれ、被験物質で計算可能であった376記述子（セットA：6b all）を解析に利用した。また、これらから以下の方法でさらに選択した。セットB～D：セットAの分子記述子のうち、相関係数の閾値を0.99、0.95又は0.90に設定し、相関する分子記述子ペアの片方を削除したセットをそれぞれセットB（ $r < 0.99$ 、311種）、セットC（ $r < 0.95$ 、288種）、セットD（ $r < 0.90$ 、261種）とした。セットE～G：376種について、DNT陽性物質と陰性物質の間でWelchのt検定を行い、得られたp値が0.2、0.1、0.05であった分子記述子のセットをそれぞれセットE（ $p < 0.2$ 、173種）、セットD（ $p < 0.1$ 、129種）、セットG（ $p < 0.05$ 、81種）とした。

リードアクロス：各分子記述子を最大値が1、最小値が0となるように標準化したのち、物質間のユークリッド距離を計算した。物質間距離は理論上の最大距離（使用した分子記述子数の平方根）で除して相対距離とした。本解析では、データセット内の全物質を被験物質として解析に用いた。リードアクロスと予測精度の算出の概略は以下の通りである。ある物質（予測対象物

質/被験物質) について、残りの360物質から相対距離が近い順に一定数の物質を選択して「ソース物質」とし、ソース物質におけるDNT陽性物質の割合がデータセットの陽性率 (0.454) より大きかった場合に被験物質を陽性と判定し、小さかった場合は陰性と判定した。これらの予測を全361物質で実施し、361物質の感度、特異度、一致率及びbalanced accuracy (BA、感度と特異度の平均値) を算出した。

2) 農薬評価書を利用した解析

データセット: 食品安全委員会により公開されている農薬評価書のラット90日間反復投与毒性試験を基に構築した独自のデータベースに含まれる350農薬を利用した。

評価対象エンドポイント: 本研究では、脳、赤血球、血中のコリンエステラーゼ (ChE) 活性低下をまとめたグループエンドポイント (gEP) (CE01と定義)、並びに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gEP (NV01と定義) の2つを評価対象とした (表1)。これらの陽性物質数 (陽性率) はそれぞれ35農薬 (10.0%) 及び59農薬 (16.9%) であった。

化学物質の類似性評価: 分子記述子はalvaDesc、生物活性予測値はPASSソフトウェア (geneXplain社、ver. 2022Standard) を利用して計算した。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。相対距離の計算は前述の通り行った。

リードアクロスの実施: 350物質から1物質を予測対象物質 (被験物質) として選択し、残りの物質を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、以下に示したWeighted sum (WS) ruleを用いて行った。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。
- 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、これらの値がデータベース全体の陽性率を上回った場合、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) 350物質の判定結果について感度、特異度、BAを予測精度の指標として算出した。

3) DNTリスクのインシリコスクリーニング手法の開発

データセット: 1) で使用した「DNT陽性物質」 (164物質) 及び「DNT陰性物質」 (197物質) を使用し、後者を「DNT不明物質」と再定義した。

化学物質の類似性評価: 1) で用いたalvaDescソフトウェアの計算値を使用した。各分子記述子について、最大値が1、最小値が0となるように正規化したのち、物質間のユークリッド距離を計算した。物質間距離は理論上の最大距離 (使用した分子記述子数の平方根) で除して相対距離とした。

C. 研究結果

1) 文献情報を利用した解析

(解析1) AからGの7つの分子記述子セットを利用して全物質間の相対距離をそれぞれ算出し、各物質について近傍の1、4、6、8、10、12、14又は16物質をソース物質として毒性判定を行った。その結果、全分子記述子 (セットA) を用いた場合、10~14物質をソース物質

とした際に、感度と特異度の差が小さく、比較的精度の高い予測結果が得られた。相関係数に基づいて関連性の高い分子記述子を削減した場合は、BAに大きな変化は認められなかったが、削減数が増えると感度と特異度の差が大きくなり、BAが低下するケースも認められた (セットB~D)。DNTとの関連性により分子記述子を選択した場合は (セットE~G)、8又は10物質をソース物質とした際に0.65を超えるBAが得られ、これはセットAからEで得られた値よりも高かった。ソース物質数を増やすと、特異度は上昇したが、感度が著しく低下した。以上の結果より、毒性学的に関連性の高い分子記述子を選択して使用することで、リードアクロスの精度が向上すること、またソース物質数を10物質程度とすることで感度と特異度のバランスがよい精度が得られることが示された。

(解析2) ソース物質数を固定した解析では、被験物質と近傍物質の距離が考慮されず、それほど類似性が高くない物質もソース物質に含まれてしまう。そこで次に、一定距離内にソース物質が存在しない物質を解析対象外として予測精度を算出した。具体的には、上記と同様に近傍10物質をソース物質として選択し、最も遠い10番目の物質が設定した閾値内に含まれる場合にのみリードアクロスによる評価を行い、閾値内に含まれない場合には解析対象外として精度の算出から除外した。全376分子記述子を利用した場合 (セットA)、閾値の設定によりBAは0.05程度上昇した。閾値を狭くすることで10種のソース物質が閾値内に含まれない解析対象外物質数が増え、特異度の上昇は認められたが、感度が低下し、BAや一致率に大きな変化は認められなかった。相関性に基づいて削除した分子記述子セットを用いた場合 (セットB~E) も全分子記述子を用いた場合とほぼ同様の結果が得られた。一方、DNTと関連がある分子記述子セット (セットE~G) を利用した場合には、「 $p<0.2$ 」セットで閾値の設定により特異度が上昇し、その結果BAも0.02程度上昇したが、その他のセットでは顕著な上昇は認められなかった。以上の結果から、閾値の設定の効果が認められる分子記述子セットは、解析1とは異なることが明らかになった。

(解析3) 毒性予測においては感度と特異度のバランスが重視されるが、DNTの毒性学的な重要性を考えると、偽陰性が少ない予測手法が必要かもしれない。そこで次に、ソース物質数を10に固定し、判定基準を「データセットの陽性率 (0.454) 以上で陽性」から「10物質中 n 物質の陽性物質が存在すれば陽性」に変更し、 n を1から10まで1ずつ変化させて予測精度を算出した。その結果、解析1で最も良い精度が認められたセットG ($p<0.05$) の分子記述子を用いた場合での結果を見ると、ソース物質10物質中1、2又は3物質以上が存在した場合を陽性と判断する条件において、感度がそれぞれ0.98、0.96、0.90と高い値を示した。このときの特異度はそれぞれ0.06、0.20、0.32であった。

(解析4) 予測結果の詳細を確認すると共に、分子記述子セットG ($p<0.05$) の選択による予測精度向上の理由を解析することを目的として、データセットのDNT陽性物質、陰性物質それぞれについて、セットA及びGの分子記述子を用いた場合のソース物質10物質中の陽性物質数を調べた。その結果、多少のゆがみはあるが、正規分布曲線に近い形状のヒストグラムが得られた。DNT陽性物質について見ると、セットA (6b a11) とセットG ($p<0.05$) では、感度はともに0.63程度と変わらなかったが、陽性物質が7物質以上であった物質数は、セットGではセットAの37物質から42物質に増加していた。予測結果が一致しなかった物質については、いず

れの記述子セットにおいても陽性物質数が3または4である物質が多かった。

DNT陰性物質について見ると、セットAに比べてセットGの分子記述子を用いた場合の特異度が0.60から0.69に大きく上昇したことと一致して、ヒストグラムが全体的に左側にシフトしていた。特に、ソース物質10物質中、陽性物質が1物質以下しか含まれない被験物質数は、15（セットA）から40（セットG）に大きく増加した。

予測が難しい物質の特徴を明らかにするために、セットG ($p < 0.05$) の分子記述子を用いた場合に、ソース物質に陽性物質が0または1物質しか含まなかった陽性物質並びに陽性物質が8物質含まれた陰性物質を抽出し、それらの化学構造を確認した。陽性物質では比較的単純な構造を有する物質がほとんどであったのに対し、陰性物質では構造が複雑で分子量の大きな物質が多く含まれていた。

以上の結果より、本研究で用いた手法において、少なくともソース物質を10物質とした場合には、DNT陽性物質、陰性物質共に大きく予測が外れている物質はそれほど多くないことが明らかになった。さらに、DNTと関連した分子記述子を選択することで、陽性物質同士の距離を縮める効果はあまり認められないが、陰性物質と陽性物質の距離が離れ、陰性物質同士の距離が近くなると考えられた。また、化学構造が比較的小さい、または大きい物質の予測が困難であることが示された。

【解析5】 解析4で示唆された「DNTと関連した分子記述子を選択することで陰性物質同士の距離が近くなる」という仮説を検証するために、データセット中の各物質について、各記述子セットを用いた場合のソース物質10物質中における毒性（DNT）が一致するソース物質との距離の平均値を算出した。そして、全DNT陽性物質および陰性物質について、平均距離の分布を比較したところ、陽性物質同士の距離並びに陰性物質同士の距離は、セットAの分子記述子を使用した場合に比べて、セットD～Gの分子記述子を使用した場合でともに減少したが、その程度は陰性物質間の距離でより大きく、解析4の結果を支持していた。

2) 農薬評価書を利用した解析

【解析1】 まず、gEPと統計学的に関連する分子記述子を選択することで予測精度が向上するか否かを解析した。CE01又はNV01の陽性及び陰性で物質を2群に分け、Wilcoxonの順位と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 値が小さい順に選択した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以上の分子記述子を削除した1889記述子（以下「 $r < 0.05$ 記述子」）を用いた。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。

【解析2】 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。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の順位と

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の順位と検定の p 値が低い上位350位の変数のセット（n350）を使用して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を行った（表2、図1）。

CE01においては、分子記述子のみを用いた場合に比べて、生物活性予測値を追加した場合に、程度はわずかであったが、感度、特異度及びBAのいずれも向上した。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で求めた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。

【解析3】 リードアクロスに関する先行研究では、化学構造に基づいてソース物質候補を選択した後に生物活性に基づいて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（「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（「2段階リードアクロス」）、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の順位と検定を行った。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だけ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。得られた結果を図1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、向上は認められな

った。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組み合わせた場合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。

3) DNTリスクのインシリコスクリーニング手法の開発

(解析1) 1) の解析で用いた164種のDNT陽性物質について、それぞれの最近傍物質との相対距離セットのうち、90%が含まれる値を閾値として設定した。次に、197種のDNT不明物質それぞれについて、全陽性物質(164種)との相対距離を算出し、横軸にDNT不明物質、縦軸に陽性物質との相対距離をプロットした。この図を元に、各DNT不明物質について、閾値内に含まれた物質数をカウントした。その結果、全197物質の最低値は0、最大値は56、平均値は16.1、中央値は14であった。約30%の物質は、0~3物質しか含まない一方で、12物質は、陽性物質の25%(41物質)以上を含んでおり、後者の物質は、非常に多くのDNT陽性物質と化学構造が類似していることからDNTを示す可能性が高いと考えられた。これら12物質にはカルバメート系農薬が2物質、他に抗てんかん薬(paramethadione)、オピオイド(t ramadol)が含まれていた。

(解析2) 上記の解析では、近傍物質数でDNTリスクを予測していることから、用いたDNT陽性物質セットの構造的な偏りに左右される可能性が高い。すなわち、あるDNT陽性物質と非常に類似しているにもかかわらず、類似する化学物質の数が少ない場合には、DNTリスクは小さく(ランクが低く)判定される。そこで次に、各DNT不明物質について、最も構造が類似しているDNT陽性物質との相対距離(最近傍相対距離)に着目し、その最近傍相対距離の短さによりDNTリスクをランク付けした。

その結果、距離が短い15物質の化学構造を確認すると、pentane、propyleneoxide、isopropyl alcoholのような比較的分子量から、isotretinoinや α -noralcety l methadolのような比較的大きな分子までが含まれていた。また、いずれも最近傍のDNT陽性物質とはメチル基等の官能基1つ程度の違いしかなく、化学構造が非常に類似していたことから、DNTを示す可能性が非常に高いと考えられた。実際、神経毒性を示すと考えられる有機リン系農薬が2物質、枯葉剤の成分である2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid(別名2,4,5-T)、抗てんかん薬paramethadione、レチノイン酸異性体のisotretinoin、中枢神経毒性が知られているメトキシ酢酸の関連物質2-methoxyethanolなどが含まれていた。解析1で着目した12物質と共通していたのは、paramethadioneの1物質のみであった。

(解析3) 解析1と解析2では1物質しか重複しなかったことから、両手法は異なる物質群を高DNTリスクと予測していると考えられた。そこで、これらの解析を組み合わせた予測を行うために、両手法でのDNTリスクを低い順にランクをつけ、2つのランクの値の積を「DNTリスクスコア」として算出した。図2に物質数によるDNTリスク予測ランクと最近傍相対距離によるDNTリスク予測ランクをそれぞれ縦軸、横軸とした散布図を示した。その結果、両者のランクには有意な正の相関が認められた(Spearmanの ρ 値:0.794、 $p<0.001$)。また、リスクの上位15物質もほぼ右上の領域に含まれていた。

D. 考察

1) 文献情報を利用した解析

リードアクロスによる毒性評価においては、毒性試験結果がある物質をソース物質として選択して被験物質の毒性を予測する。そのため、適切なソース物質の選択が高い予測精度を得るための鍵となる。解析1の結果から、分子記述子を利用したリードアクロスによるDNT評価においては、統計学的にDNTと関連する分子記述子を選択して使用することで、より高い予測精度が得られることが明らかになった。これは、使用する分子記述子計算ソフトウェアのバージョンならびにソース物質の選択方法が異なる当研究室の以前の解析結果と一致しており、得られた結果は妥当かつ普遍的であると考えられた。

一方で、BAは高くても0.65程度であり、予測精度としては十分とは言えなかった。その理由として、本研究ではデータセットを固定し、その中の全物質を解析対象としていることから、必ずしもデータセット内に構造的に類似する物質が存在しないために予測が外れる物質が存在する可能性が考えられた。そこでソース物質の選択に条件(距離の閾値)を設定して解析した結果、全分子記述子を用いた場合や相関係数で選択した記述子セットを用いた場合には、閾値の設定による予測精度の向上が認められた。しかし、解析1で良い精度を示したDNTと関連する分子記述子セットを使用した場合にはそのような効果は認められなかった。これは、事前に適切な分子記述子を選択していない場合には、閾値を設定することで不適切なソース物質が選択される被験物質が解析から除外され、結果的に予測精度の向上が認められたが、DNTと関連する分子記述子を使用した場合には、その選択に伴いソース物質の選択が比較的適切に行われたため、閾値の設定による解析に不適切な被験物質の除外効果が認められなかったためではないかと考えられた。

インシリコ手法による評価は、コンピュータ上での評価が可能であり、スループットに優れていることから、体系的なDNT評価における初期スクリーニングに有用と考えられる。そのような評価では高い感度が必要であると推察されることから、上記解析で決定した条件(分子記述子セット、ソース物質数)において、ソース物質に基づく判定条件を変化させて、感度を高めた際の全体の予測精度を確認したところ、10物質中3物質が陽性の場合に陽性と判定する条件において、感度が0.90と高い判定精度が得られた。一方、この条件における特異度は0.32、一致率は0.59であり、初期スクリーニングに利用した場合、陰性物質の約7割を偽陽性としてしまうと考えられた。

最後に、予測結果の詳細を確認するために、DNT陽性物質と陰性物質について、それぞれにおけるソース物質中の陽性物質数をヒストグラムとして可視化したところ、一致率が20%未満などの予測がひどく外れている物質数が多いわけではないこと、またDNT関連記述子の選択は、陰性物質同士の距離の短縮に寄与していることが明らかになった。さらに、構造が小さい陽性物質、大きい陰性物質の予測が難しいことが示された。おそらく、データセット内に類似物質が少なく、ソース物質の選択時に適切な参照物質が存在しなかったことが原因と考えられる。

2) 農薬評価書を利用した解析

文献情報に基づくデータセットとは異なるデータセットとして農薬のラット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を実施した。また予測における生物

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が向上すること、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を絞り込む必要が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gEP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ること、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、その中に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。

3) DNTリスクのインシリコスクリーニング手法の開発

項目1)の解析において、文献情報を用いて構築したデータセットを利用して、リードアクロスによるDNT予測手法の検討を行った結果、6割程度の物質の判別が可能であったが、様々な条件検討を行ってもそれ以上の精度向上は認められなかった。その理由として、データセットには、複数のDNT陽性物質と化学構造が類似したDNT陰性物質が多く含まれており、それらが「偽陽性」として判定されること、また分子量が100未満程度の小さな化学物質や500を超える大きな化学物質についてはデータセットに類似物質がほとんど存在しないことなどが、主要な原因であると考えられた。実際、前者の「偽陽性」と判定された物質が「真陽性」である可能性については、共同研究者のインビトロ試験結果からも示唆されている。そのため、これまでに使用してきたDNT陰性物質は、実際にはDNT陽性物質を多く含む可能性が考えられた。また、この一連の過程により、インシリコ手法によるDNT懸念物質のスクリーニングとインビトロ試験による検証という組み合わせは、DNT評価の動物実験代替法として有用であることが示唆された。項目3)では、これまでの「DNT陰性物質群」を「DNT不明物質」として再定義し、既知のDNT陽性物質の情報から「DNT不明物質」のDNTリスクの予測を試みた。すなわち、本項目では、164種のDNT陽性物質を活用して、それらの類似性からDNT不明物質のDNTリスクを3つのアプローチにより予測した。第1に、DNT陽性物質間での類似性(物質間相対距離)から、類似物質を定義する物質間相対距離の閾値を定義し、各DNT不明物質についてその閾値内に含まれるDNT陽性物質数による予測、第2に、各DNT不明物質と最も類似している(相対距離が近い)DNT陽性物質との相対距離による予測、そして第3に、これら2つの手法を掛け合わせた予測である。

第1の手法によりDNTリスクが高いと予測された12物質を確認したところ、カルバメート系農薬や抗てんかん薬、オピオイドなど、神経毒性を示すと考えられる物質が多く含まれていた。また、第2の手法においてDNTリスクが高いと予測された上位15物質についてその化学構造を確認したところ、既知の陽性物質との類似性が非常に高い物質が多数見出された。例えば、高用量曝露により催奇形性を示すall-trans-レチノイン酸(tretinoin)の異性体であるisotretinoin、有機リン系農薬、枯葉剤成分、神経毒性を示すメトキシ酢酸の関連物質などが含まれていた。これらの結果から、2つの基準によるDNTリスク予測は共にある程度の精度でDNTリスクの高い化学物質を同定できていると考えられた。

一方で、構造を確認した化学物質数は限られているものの、両手法で共通して同定された物質は抗てんかん薬のparamethadioneのみであった。DNT陽性物質であるtretinoinの異性体であるisotretinoinについては、

最近傍相対距離による予測では検出されたが、類似物質数による予測では検出されなかった。これは、DNT陽性物質群中に、tretinoinやisotretinoinと類似した物質がほとんど含まれないことを示唆しており、実際、isotretinoinは閾値内にDNT陽性物質を2物質しか含まなかった。逆に、類似物質数による予測でDNTリスクが高いと予測されたカルバメート系農薬や枯葉剤成分の2,4,5-trichlorophenoxyacetic acidは、最近傍相対距離による予測では検出されなかった。これらのDNT不明物質は、その化学構造や既知情報からDNT陽性である可能性が非常に高いと考えられることから、2つの基準を用いた予測は共に有用であるものの、いずれの手法もDNTリスクが高い物質を見落とす可能性があることが示唆された。

そこで、両基準を加味した予測を行うために、両予測で算出された値をDNTリスクとしてランク化し、両ランクの値の積を「DNTリスクスコア」として定義し、予測に用いた。リスクが高かった上位15物質を確認したところ、1位～11位及び14位の12物質は、単独の基準による予測のいずれかで同定された物質であり、総合評価による予測で同定された物質は3物質であった。これらの結果から、統合予測は有用であると考えられた。

一方で、isotretinoinは197物質中102位となり、比較的低リスクであると予測された。今回の解析では、ランク値の積を用いたことから、一方の指標が著しく低い場合には、総合評価では上位に入る可能性は低くなる。これらの問題点を克服するために、今後、2つ指標（図2の縦軸及び横軸の値）を複数のクラスに分類してマトリクス化することで、全DNT不明物質やデータセット外の物質のDNTリスクを複数のクラスに分類できるのではないかと考えている。さらには、DNTリスクが高いと予測された物質について、共同研究者の協力を得ながらDNT関連インビトロ試験等で検証することで、本予測手法の妥当性を検証したいと考えている。

E. 結論

DNTに関する文献情報に基づいてデータセットを作成し、化学構造情報を利用したリードアクロス手法の確立に向けて基礎検討を行った結果、分子記述子を利用したリードアクロスにおけるソース物質の選択においては、DNTと関連する分子記述子を選択して使用することで、予測精度が向上することが示唆された。

農薬評価書のラット反復投与毒性試験結果における神経毒性と関連するエンドポイントのリードアクロスに関する解析では、化学構造情報だけでなく生物活性予測値の利用がリードアクロスの精度向上に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。

最後に、DNT陽性物質の化学構造情報を活用した新たなインシリコDNTリスク予測手法を考案した。本手法は、①類似物質数、②類似性の高さ、並びに③その組み合わせにより、被験物質のDNTリスクをランク付けすることが可能であり、実際に神経毒性が知られている有機リン系農薬やカルバメート系農薬、抗てんかん薬、中枢神経毒性物質などを検出することができた。本手法は、簡便に既知のDNT陽性物質の類似物質を検出することが可能であり、DNTリスクのスクリーニング手法としての活用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 大村奈央、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一：発達神経毒性を予測するためのリードアクロス手法の検討、日本動物実験代替法学会第35回大会、2022年11月18日～20日、静岡市
- 2) 吉成浩一：化学構造情報を用いたリードアクロスによる発達神経毒性の評価、日本動物実験代替法学会第35回大会、2022年11月18日～20日、静岡市
- 3) 大村奈央、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一：リードアクロスによる発達神経毒性評価手法の開発：分子記述子を用いた類似物質選択の有効性、第49回日本毒性学会学術年会、2022年6月29日～7月2日、札幌市
- 4) 吉成浩一：化学構造情報を利用したリードアクロスによる化学物質の毒性予測、第49回日本毒性学会学術年会、2022年6月29日～7月2日、札幌市
- 5) 高村真弥、大村奈央、保坂卓臣、志津怜太、竹下潤一、吉成浩一：分子記述子を用いたリードアクロスによる発達神経毒性予測手法の開発、フォーラム2023 衛生薬学・環境トキシコロジー、2023年9月13日、広島市

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

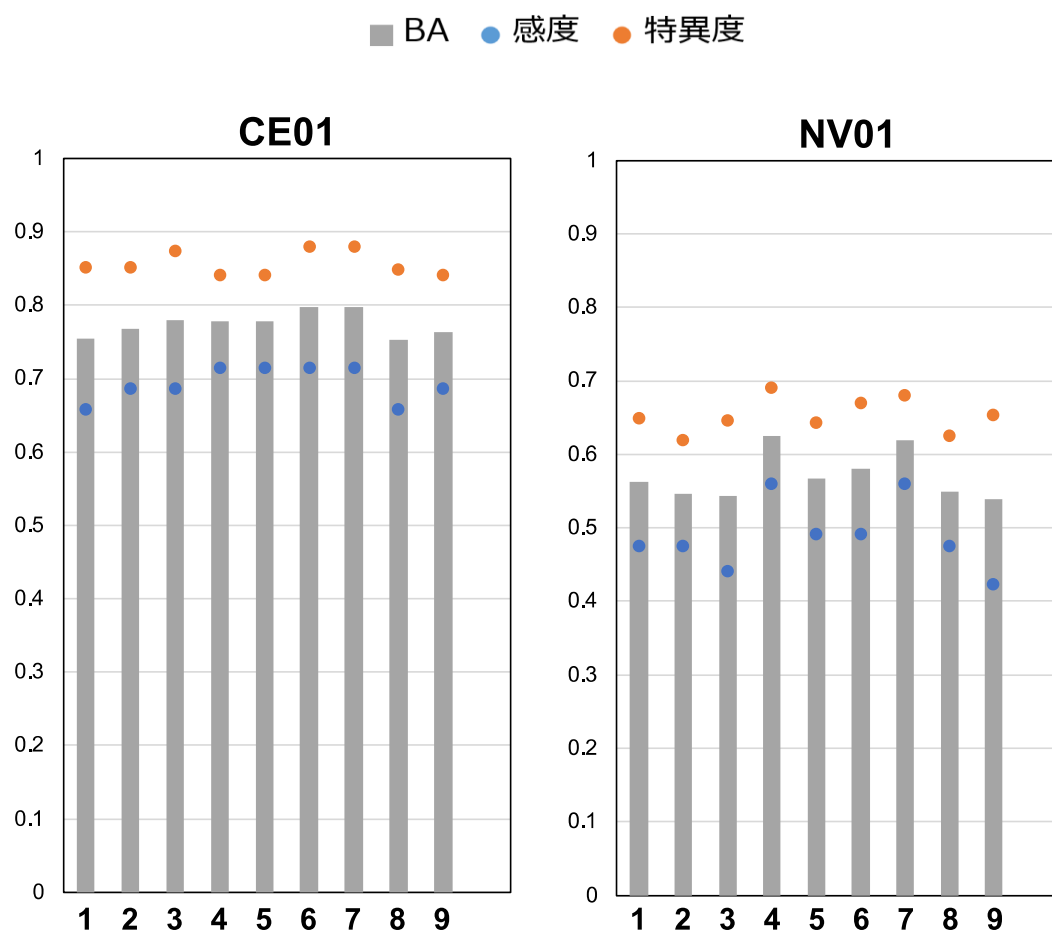
なし

表 1 解析対象としたgEPとそれらに含まれる個別所見

gEP	CE01	NV01
含まれる 所見	中枢神経-ChE活性阻害-脳 血液学-赤血球ChE活性-減少 血液生化学-ChE-減少	外観/行動-一般状態-消瘦
		外観/行動-一般状態-流涎
		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

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



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1 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

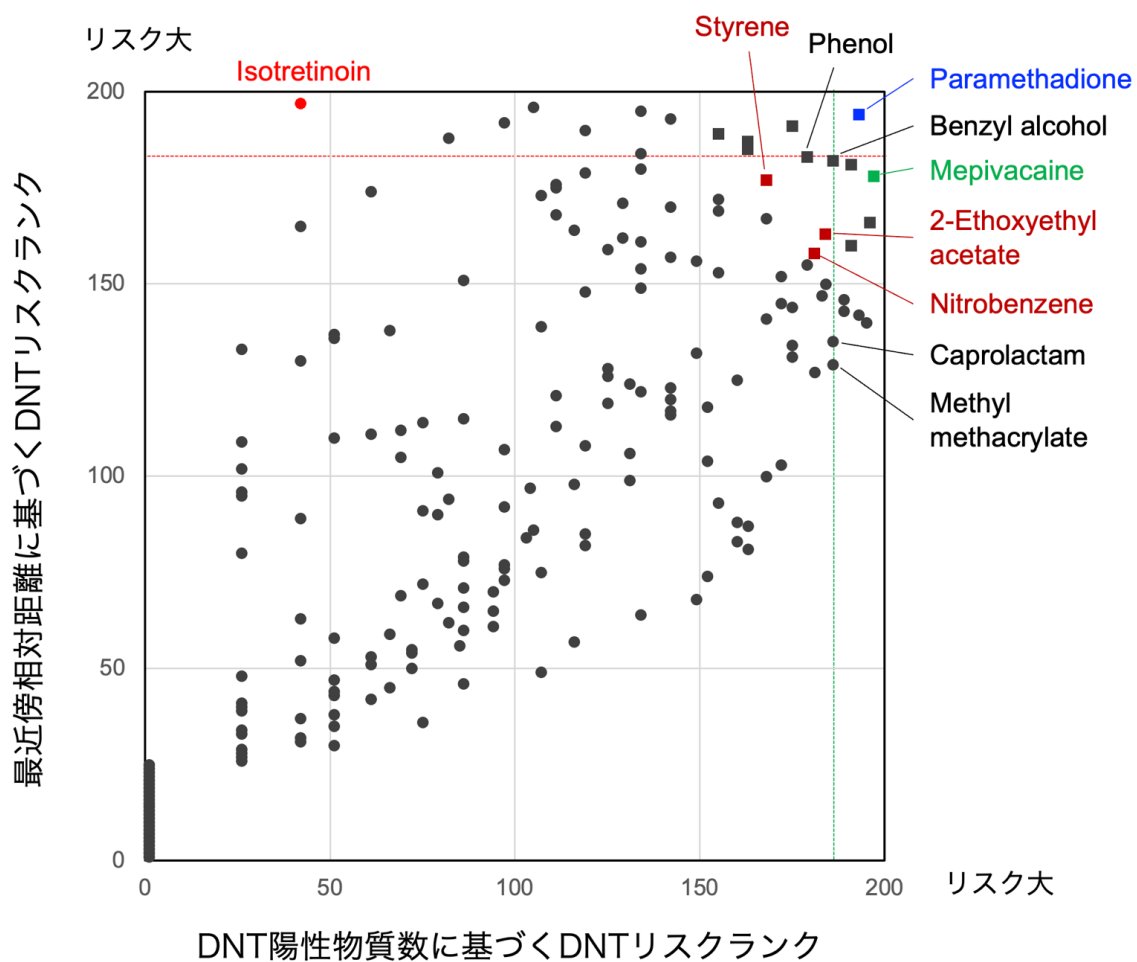


図2 2種類のDNTリスク予測ランクにおけるDNT不明物質の分布