

AI-SHIPS 統合的毒性予測システム ユーザーガイド 第1章

AI-SHIPS 統合的毒性予測システム

全体像と予測モデルの説明

(第 1.1 版)

2026 年 7 月
AI-SHIPS プロジェクト

目次

1.	AI-SHIPS 統合的毒性予測システムとは	1
1.1.	開発経緯	1
1.2.	AI-SHIPS 統合的毒性予測システム全体像	2
1.2.1.	毒性予測	2
1.2.2.	体内動態予測	6
1.2.3.	類似物質検索	7
2.	毒性予測、体内動態予測の方法	8
2.1.	AI-SHIPS を用いた基本的な操作フロー	8
2.2.	結果の解釈のポイント	9
3.	毒性予測における <i>in vivo</i> 毒性予測モデルの説明	11
3.1.	<i>in vivo</i> 毒性予測モデルの予測対象	11
3.2.	学習データ	13
3.3.	モデル構築方法と hold-out の予測精度	16
3.4.	信頼性スコア	19
3.5.	信頼性スコアによる AD の考え方	20
3.6.	矛盾した予測結果 (NOEL \leq 300 で陰性で NOEL \leq 30 で陽性) が出るケースについて	21
4.	体内動態予測モデルの説明	23
4.1.	化学物質の消化管利用率 FaFg、吸収速度定数 ka、分布容積 V ₁ および肝代謝固有クリアランス CL _{h,int} の予測モデル	23
4.2.	体内動態 (PBPK) シミュレータ	24
4.3.	参考資料	24
5.	AI-SHIPS <i>in vitro</i> 試験とその予測モデル構築	25
5.1.	AI-SHIPS <i>in vitro</i> 試験	25
5.2.	予測モデル化対象の決定	27
5.3.	予測モデルの構築と精度評価結果	31
6.	AI-SHIPS Tox21 <i>in vitro</i> 試験とその予測モデル構築	32
6.1.	予測対象	32
6.2.	学習データとモデル化手法	35
7.	その他の情報	37
8.	おわりに	37

1. AI-SHIPS 統合的毒性予測システムとは

1.1. 開発経緯

化学物質の安全性の評価は、従来、反復投与毒性試験など動物実験により行われてきましたが、動物実験は高額な費用や時間がかかること、また、動物福祉の観点から、動物実験に代わる手法として、化学物質の構造から毒性を予測する QSAR（定量的構造活性相関）や、細胞等を用いた *in vitro* 試験などの代替手法の開発が先進諸国を中心に進められてきています。

一方で、構造活性相関手法は、変異原性などの一定の化学構造と毒性発現メカニズムとの関連が明らかな毒性には適用可能であるものの、反復投与毒性のような複雑な機序を有する毒性については、その不確実性から、予測手法の開発はチャレンジングなテーマとなっていました。

我が国では「有害性評価支援システム統合プラットフォーム（通称：HESS。以後、HESS という）」が開発されています。HESS は、ラットを対象とした化学物質の反復投与毒性試験データ及び毒性発現の作用機序情報、代謝情報等のデータベースを備えており、毒性予測の支援システムとして国際的に利用されています。

一方、欧米では Tox21 や ToxCast のように大量の化学物質を対象に多数のハイスループットな *in vitro* 試験を実施し、その結果を基に計算科学的手法により人への有害性情報を評価する手法が試みられています。

このような背景から、AI-SHIPS プロジェクト(2017-2021)では、毒性発現の作用機序に基づいた膨大な *in vitro* 試験を実施し、*in vivo* 毒性試験結果との関連性に関する情報を提示できる毒性予測システムを構築しました。

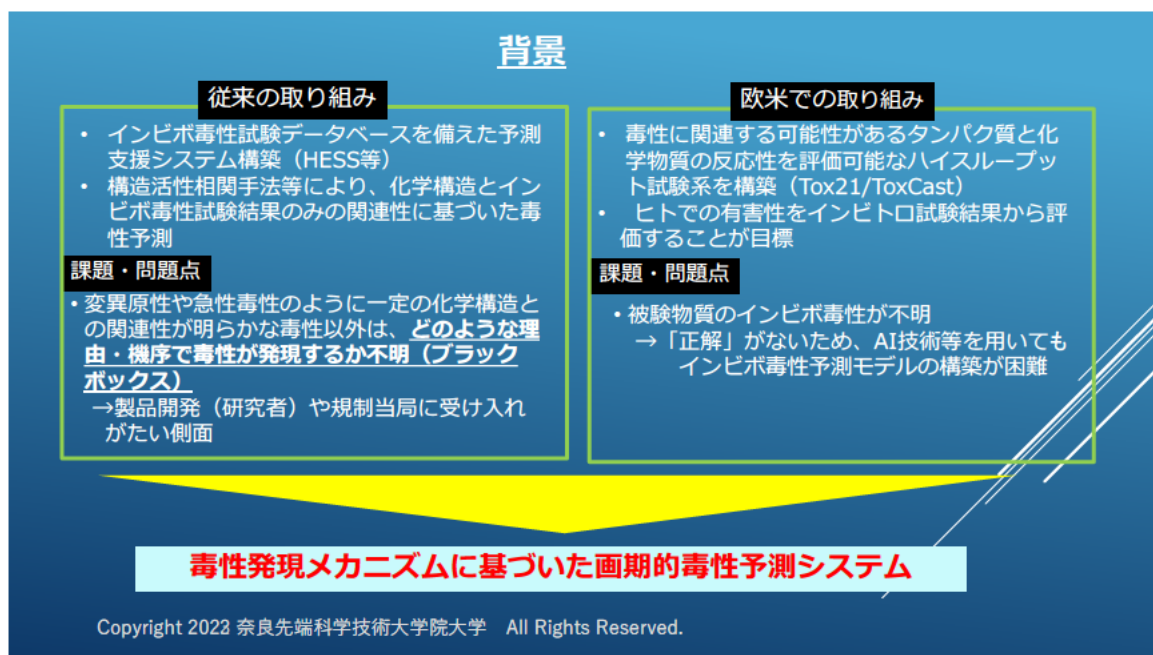


図 1.1-1 AI-SHIPS プロジェクトの背景

1.2. AI-SHIPS 統合的毒性予測システム全体像

AI-SHIPS 統合的毒性予測システムの主な機能は、「毒性予測」、「体内動態予測」、「類似物質検索」です。

AI-SHIPS 統合的毒性予測システムは、ユーザーが保持しているデータを登録することが可能ですが、登録したユーザーデータは、全てのユーザーが閲覧できる状態となりますので、企業秘密にあたる情報は登録しないでください。

No.	機能	説明
1	毒性予測	予測対象物質の構造を入力とし、 化審法28日間反復投与毒性試験(*1) における、 肝臓、血液、腎臓 に関する9つのエンドポイントについて 30mg/kg/day以下 ならびに 300mg/kg/day以下の投与量での陽性か陰性を予測(*2) 。 併せて、各種インビトロ試験結果の予測結果(陽性か陰性)を表示。
2	体内動態予測	予測対象物質の構造と摂取量を入力とし、これを ラットに28日間反復投与した際の血液、肝臓、腎臓での経過時間に対する化合物濃度 を予測
3	類似物質検索	対象物質の構造と類似性の条件を入力とし、データベース内の類似物質を検索し、類似化合物の毒性予測結果等を比較可能な形式で表示

*1:動物に被験物質を一定期間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、被験物質の毒性を明らかにすることを目的とする試験 (OECD TG407)。
*2:毒性予測の想定対象物質は一般工業用化学品と生分解性試験での分解物。生分解性試験で無機化されるもの、高分子物質、低懸念高分子物質、高蓄積性物質は想定対象外。

Copyright 2023 奈良先端科学技術大学院大学 All Rights Reserved.

図 1.2-1 AI-SHIPS 統合的毒性予測システムの主な機能

1.2.1. 毒性予測

毒性予測では、予測対象とする化学物質の構造情報を入力値とし、28 日間ラット反復投与毒性試験の結果を予測します。毒性試験の結果は、NOEL (毒性試験においていかなる影響も認められない最高投与量) や LOEL(毒性試験において何らかの影響が認められた最小投与量)の値が得られますが、本プロジェクトでは、本毒性試験について、肝臓、血液、腎臓に関する9つの毒性エンドポイントで投与量 30mg/kg/day 以下ならびに 300mg/kg/day 以下で陽性か陰性かを予測します。併せて、各種 *in vitro* 試験の予測結果を表示します。

予測の機構としては、まず入力値である物質の構造情報から、分子の多種多様な構造的・物理化学的特徴を数値化した mordred 記述子を生成し、これらを、200 あまりの *in vitro* 試験の予測モデルで、各種の *in vitro* 試験の予測値を算出します。次に、得られた *in vitro* 試験の予測値ならびに化学物質の構造情報を入力値として、肝臓、血液、腎臓に関する9つの毒性エンドポイントについて、NOEL = 30 mg/kg/day ならびに NOEL = 300mg/kg/day を閾値とした 2 値判定予測モデルで、毒性の陽性/陰性を予測します。陽性/陰性の結果とともに、予測結果の信頼性を示すスコア (信頼性スコア) も出力します。また、システムでは、*in vitro* 試験の予測結果も表示されます(図 1.2-2)。本モデルのインプット項目とアウトプット項目を表 1.2-1、表 1.2-2 に示します。

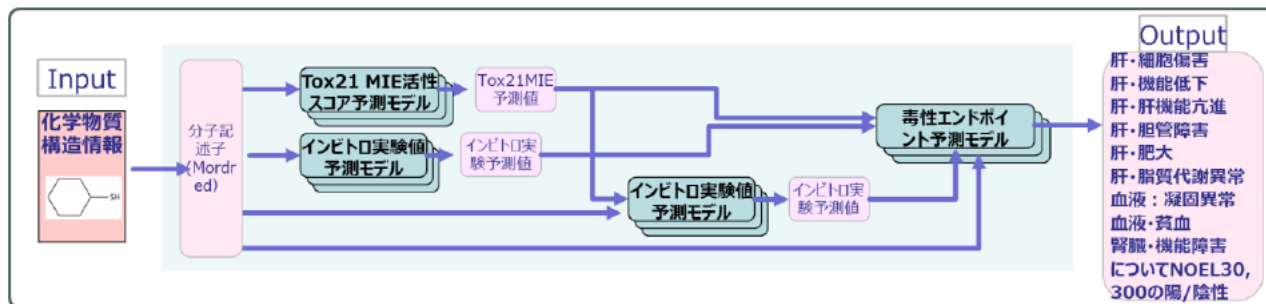


図 1.2-2 毒性予測モデルの予測機構の概要

表 1.2-1 毒性予測のインプット項目一覧

必須/任意	必須/任意	説明
必須	予測対象の化学構造	構造式エディタ (Molecule Editor) による構造式の描画、MOI ファイル、SD ファイルや SMILES などの方法が用意されており、いずれかの方法で予測対象の化学構造を指定する。
任意	物質 ID	物質を識別する ID。未入力の場合は、日時 (予測・検索の開始時刻) が ID として自動的に設定される。
任意	解析 ID	ジョブ管理する際の ID。未入力の場合は、日時 (予測・検索の開始時刻) が ID として自動的に設定される。
任意	コメント	必要に応じて計算条件など、記録しておきたい内容を入力する。

表 1.2-2 毒性予測のアウトプット項目一覧

No.	毒性予測のアウトプット内容
1	肝毒性：細胞傷害・炎症についての NOEL ≤ 300mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
2	肝毒性：細胞傷害・炎症についての NOEL ≤ 30mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
3	肝毒性：肝機能低下についての NOEL ≤ 300 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
4	肝毒性：肝機能低下についての NOEL ≤ 30 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
5	肝毒性：肝機能亢進についての NOEL ≤ 300 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
6	肝毒性：肝機能亢進についての NOEL ≤ 30 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
7	肝毒性：胆管障害についての NOEL ≤ 300 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
8	肝毒性：胆管障害についての NOEL ≤ 30 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
9	肝毒性：肥大についての NOEL ≤ 300 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
10	肝毒性：肥大についての NOEL ≤ 30 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
11	肝毒性：脂質代謝異常についての NOEL ≤ 300 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
12	肝毒性：脂質代謝異常についての NOEL ≤ 30 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
13	血液毒性：凝固についての NOEL ≤ 300 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
14	血液毒性：凝固についての NOEL ≤ 30 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
15	血液毒性：貧血についての NOEL ≤ 300 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
16	血液毒性：貧血についての NOEL ≤ 30 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
17	腎毒性：腎障害・機能障害についての NOEL ≤ 300 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア
18	腎毒性：腎障害・機能障害についての NOEL ≤ 30 mg/kg/day での陽性/陰性とその信頼性スコア

本予測モデルの背景となる考え方を説明します。

摂取された化学物質は、まず生体内の標的臓器細胞の細胞膜の受容体やタンパクといった生体分子と反応します。これを Molecular initiating event : MIE といいます。それらが以後複雑な機構を介し、標的細胞内における Key Event を経て個体の毒性発現に至ります(図 1.2-3)。

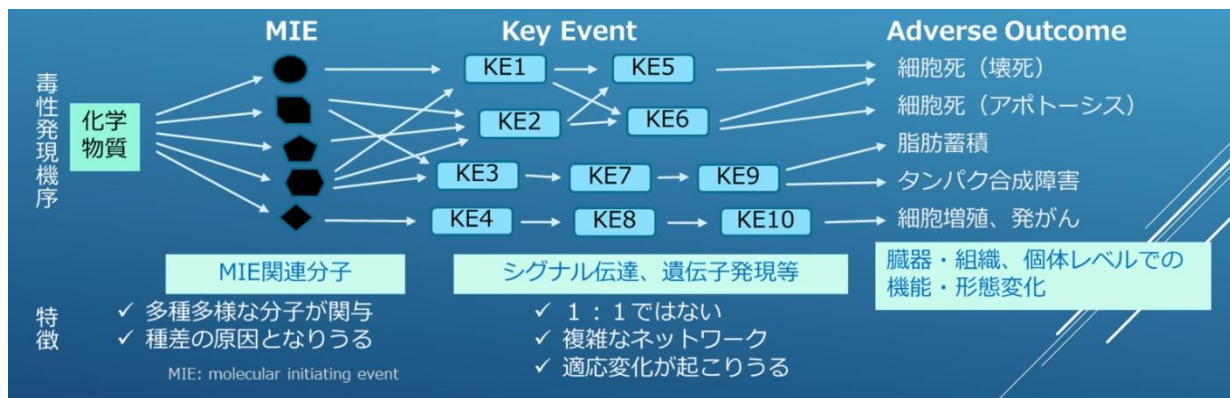


図 1.2-3 化学物質を暴露したときの毒性発現までの経路 (イメージ)

化学物質と MIE やキーイベントの関連性は、対応する *in vitro* 試験情報があり、モデル化できます。また、化学物質とエンドポイントである毒性との関連性も、対応する *in vivo* 毒性試験結果があり、モデル化できます。しかしながら、*in vitro* 試験情報と毒性との関係性はそのメカニズム自体が不明であり、モデル化ができません。毒性情報と *in vitro* 試験情報との関連性を明確にできないことが、これまで毒性発現メカニズムに基づく毒性予測が行えなかった原因です。

上記を解決するために、物質から *in vitro* 試験情報を予測するモデルを構築し、*in vitro* 試験の予測値を使って毒性を予測するモデルを構築することで、物質、*in vitro* 情報、(*in vivo*)毒性という3層をつなぎました (船津の3層モデル、図 1.2-4)。

これにより、対象毒性がどの *in vitro* 情報と関係があるか、つまり毒性発現の作用機序の理解につながる情報を得ることが可能となりました。

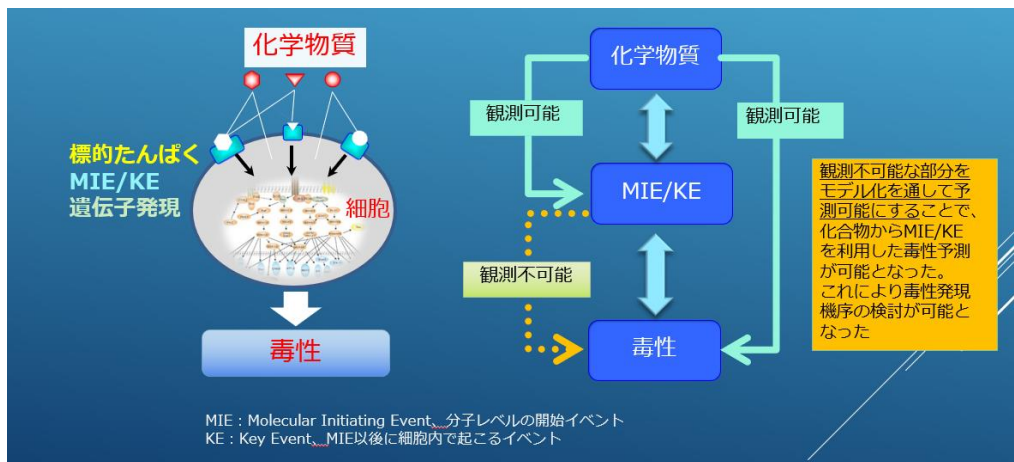


図 1.2-4 船津の3層モデル

AI-SHIPS プロジェクトでは、*in vivo* 毒性の有無が既に知られている (*in vivo* 毒性モデルの学習データの中から選定した) 約 350 の化学物質に対して、毒性発現の作用機序に関連する多様な *in vitro* 試験を実施しました。具体的には、MIE に相当する分子として、薬物代謝・トランスポーター関連分子並びに核内受容体等の化学物質応答性転写因子の *in vitro* 試験と、より毒性影響に近く、毒性発現に関与する様々な細胞内イベント (Key Event) の結果として影響を検出可能と考えられる細胞小器官レベルやストレス応答系に関する *in vitro* 試験を実施しました(表 1.2-3)。これらの *in vitro* 試験の結果を解析し、測定結果の本質を表現する 95 のパラメータを抽出しました。そして、化学物質の構造情報から各パラメータを予測するモデルを構築しました。詳細は 5 を参照ください。

また、米国 Tox21 プロジェクトによって公開されている MIE データベースから、59 の MIE 活性スコアを抽出し、これについての予測モデルも構築しました。詳細は 6 を参照ください。

in vivo 毒性予測モデルは、化学物質の構造情報を示す構造記述子のほか、上記で示した毒性発現の作用機序に関連する多様な *in vitro* 試験の予測値を、*in vivo* の毒性に寄与する因子 (以後、説明変数という) に設定して、構築しました。このようにして“船津の三層モデル”を実装しました。

なお、*in vivo* 毒性予測モデルの構築では、HESS (ver.4.0) に収載の約 950 のラット雄の毒性試験データ、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (以後、化審法という) の新規審査シートや REACH 登録情報から収集した約 1,250 のラットの毒性試験データを精査した上で、約 1,900 のデータを学習データとして用いました。

表 1.2-3 AI-SHIPS プロジェクトで実施した *in vitro* 試験一覧

	評価項目	内容	分子・項目	方法の概要
MIE 関連	1 薬物代謝酵素	異物の解毒、代謝活性化に関わる酵素との反応性を評価	<ul style="list-style-type: none"> ● ラットP450 (7分子) ● ヒトP450 (11分子種) ● UGTs (総活性) 	組換え酵素と発光基質(P450-Glo/UGT-Gloシステム)を利用した阻害試験 (3濃度)
	2 酸化還元	細胞に対する酸化還元に関する傷害作用を評価	細胞内GSH含量	初代培養ラット肝細胞、HepG2細胞、ラット腎由来NRK-52E細胞を利用した細胞内GSHレベル測定試験 (3濃度)
	3 タンパク質反応性	化学物質の反応性評価	Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)	システイン、リジン誘導体との反応性評価 (1濃度)
	4 胆汁酸トランスポーター	肝毒性発現に関わる胆汁うっ滞影響を評価	<ul style="list-style-type: none"> ● ラットMRP2 ● ラットBSEP 	蛍光基質とベシクルを利用した阻害試験 (1濃度)
	5 核内受容体	異物代謝、エネルギー代謝等に関わる受容体への影響を評価	<ul style="list-style-type: none"> ● ラットAHR ● ラット核内受容体 (PPARα, PXR, RXRα, LXRα, FXR) 	レポーターアッセイ又は1-ハイブリッドアッセイ (3濃度)
	6 酵素誘導	酵素誘導に関わる誘導体CARへの影響を評価	<ul style="list-style-type: none"> ● ラットCYP2B1, CYP3A1, CYP4A1 	初代培養ラット肝細胞mRNAレベル測定 (1濃度)
Key Event 関連	7 細胞小器官	毒性発現に重要なミトコンドリア等の細胞小器官への影響を評価	<ul style="list-style-type: none"> ● 核 ● 細胞質 (F-actin) ● ミトコンドリア ● 中性脂肪 (TG) 蓄積 ● リン脂質 (PL) 蓄積 	初代培養ラット肝細胞、HepG2細胞、ラット腎由来NRK-52E細胞を利用した蛍光イメージング (HCA) 解析: 総蛍光強度・面積、平均蛍光強度・面積、スポット数等 (6濃度)
	8 細胞傷害	細胞に対する傷害作用を評価	<ul style="list-style-type: none"> ● LDHアッセイ (細胞死) ● Cell-titerアッセイ (生細胞数) 	初代培養ラット肝細胞、HepG2細胞、ラット腎由来NRK-52E細胞を利用した曝露試験 (6濃度)
	9-1 酸化ストレス	細胞ホメオスタシスに関わるストレス応答系への作用を評価	Nrf2	多色発光レポーター導入HepG2細胞を用いた経時的 (72h) 活性評価 (6濃度)
	9-2 炎症ストレス		NF-kB	
	9-3 小胞体ストレス		ATF6	
	9-4 DNA損傷ストレス		p53	
	9-5 低酸素ストレス		HIF1	
	10 非実質細胞 (マクロファージ細胞)	細胞間クロストークによる間接的な肝障害作用・炎症制御を評価	<ul style="list-style-type: none"> ● AP-1/NF-kB転写活性 ● 細胞障害性 (WSTアッセイ) 	マウスRAW264.7細胞 (レポーター安定発現細胞) を用いたレポーターアッセイ並びに、傷害性評価 (6濃度)

1.2.2. 体内動態予測

一般に哺乳動物での毒性予測とりわけ反復投与における全身毒性では、化学物質が生体にばく露、吸収された後の動態が重要な毒性発現要因となります。特にその吸収と蓄積性は予測において代謝とともに不可欠な判断要素です。

化学物質が経口投与された後、毒性のエンドポイント予測のためには、①経口ルートでの消化管吸収（血中移行）、②吸収後の生体内運命（曝露、蓄積）、③極性化および抱合化の主代謝予測（解毒、活性化）の各過程が重要です。

AI-SHIPS の体内動態予測では、予測対象とする化学物質の構造情報と投与量等を入力値とし、これをラットに 28 日間反復投与した際の肝臓、血液、腎臓での経時的な物質濃度を予測します。あわせて吸収や蓄積性に係るパラメータの予測値も出力します。

予測の機構としては、まず入力値である化学物質の構造情報から、化学物質の消化管利用率 $FaFg$ 、吸収速度定数 ka 、分布容積 V_1 および肝臓での代謝消失を示す肝代謝固有クリアランス $CL_{h,int}$ の 4 つのパラメータを、機械学習で構築した予測モデルにより推定します。当該パラメータと投与量を生理学的薬物動態（PBPK）シミュレータに投入し、肝臓、血液、腎臓における濃度-時間曲線下面積（AUC）および最高臓器中濃度（ C_{max} ）を得ます（図 1.2-5）。本モデルのインプット項目とアウトプット項目を表 1.2-4、表 1.2-5 に示します。

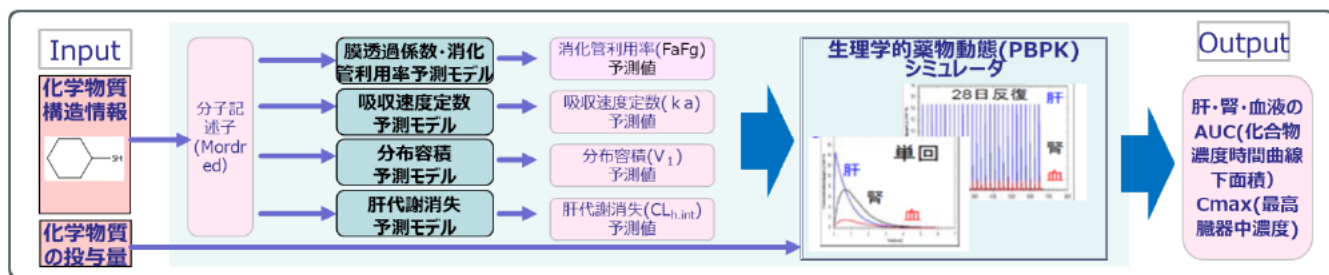


図 1.2-5 体内動態予測モデルの予測機構の概要

表 1.2-4 体内動態予測のインプット項目一覧

必須/任意	必須/任意	説明
必須	予測対象の化学構造	構造式エディタ（Molecule Editor）による構造式の描画、MOI ファイル、SD ファイルや SMILES などの方法が用意されており、いずれかの方法で予測対象の化学構造を指定する。
任意	物質 ID	物質を識別する ID。未入力の場合は、日時（予測・検索の開始時刻）が ID として自動的に設定される。
任意	解析 ID	ジョブ管理する際の ID。未入力の場合は、日時（予測・検索の開始時刻）が ID として自動的に設定される。
任意	コメント	必要に応じて計算条件など、記録しておきたい内容を入力する。
必須	投与量 (mg/kg)	1 日あたり、体重 1kg あたりの投与量。
任意	LogP	水-オクタノール分配係数。未入力時は自動推定される。
任意	$f_{u,p}$	血漿タンパク質結合率。未入力時は化学物質構造から自動的に推定される。
任意	LogD (pH 6.0)	小腸環境(pH=6.0)での分配係数。未入力時は化学物質構造から自動的に推定される。

必須/任意	必須/任意	説明
任意	LogD (pH7.5)	各臓器環境(pH=7.5)での分配係数。未入力時は化学物質構造から自動的に推定される。
任意	pKa acid, pKa base	酸解離定数。未入力時は化学物質構造から自動的に推定される。

表 1.2-5 体内動態予測のアウトプット項目一覧

項目		説明	
膜透過	膜透過係数	PappAtoB	消化管から血液側への膜透過係数(nm/s)
		PappBtoA	血液側から消化管への膜透過係数(nm/s)
体内動態	吸収	FaFg	消化管利用率
		インビボ吸収速度定数	ラットに物質を経口投与した際の吸収速度定数(1/h)
	分布	インビボ分布容積	物質の分布容積 (血中から臓器移行の目安を物質が及ぶ体積で提示) (L)
	肝代謝消失	インビボ肝固有クリアランス	ラット肝での物質の代謝変換効率(L/h)
	腎排泄	インビボ腎クリアランス	ラット腎での物質の代謝変換効率(L/h)
	血液 (血漿)	単回投与 AUC	ラット単回投与における血中濃度曲線下面積(($\mu\text{g/L}$)/h)
		単回投与 Cmax	ラット単回投与における最高血中濃度 ($\mu\text{g/L}$)
		28 日間反復投与 AUC	ラット 28 日間反復投与における血中濃度曲線下面積(($\mu\text{g/L}$)/h)
		28 日間反復投与 Cmax	ラット 28 日間反復投与における最高血中濃度($\mu\text{g/L}$)
	肝臓	単回投与 AUC	ラット単回投与における肝臓中濃度曲線下面積(($\mu\text{g/L}$)/h)
		単回投与 Cmax	ラット単回投与における最高肝臓中濃度 ($\mu\text{g/L}$)
		28 日間反復投与 AUC	ラット 28 日間反復投与における肝臓中濃度曲線下面積(($\mu\text{g/L}$)/h)
		28 日間反復投与 Cmax	ラット 28 日間反復投与における最高肝臓中濃度($\mu\text{g/L}$)
	腎臓	単回投与 AUC	ラット単回投与における腎臓中濃度曲線下面積(($\mu\text{g/L}$)/h)
		単回投与 Cmax	ラット単回投与における最高腎臓中濃度 ($\mu\text{g/L}$)
		28 日間反復投与 AUC	ラット 28 日間反復投与における腎臓中濃度曲線下面積(($\mu\text{g/L}$)/h)
28 日間反復投与 Cmax		ラット 28 日間反復投与における最高腎臓中濃度($\mu\text{g/L}$)	

1.2.3. 類似物質検索

AI-SHIPS プロジェクトで収集した反復投与毒性試験の結果をデータベースとして整備しています。類似物質検索では、予測対象とする化学物質の構造情報を入力値とし、「類似」する物質をデータベースから抽出し、類似物質の毒性予測結果等を比較可能な形式で表示します。「類似」の計り方として、表 1.2-6 に示す複数の手法(アルゴリズム)を用意しています。

ユーザーが保有する毒性試験の結果をデータベースに登録することで、類似検索の範囲を充実させることも可能です。

登録したユーザーデータは、全てのユーザーが閲覧（検索結果として）できる状態となりますので、企業秘密にあたる情報は登録しないでください。

表 1.2-6 類似性を計るアルゴリズム

類似性アルゴリズム名		説明	値の幅と意味
構造類似性	Mordred 記述子	rdkit の mordred 記述子 (304 種) の値での多次元空間における物質間のユークリッド距離を指標とした類似性評価	0~1 の範囲で、0 に近いほど類似性が高くなる。0~0.5 の数値を入力する。
	Fingerprint Topological	rdkit の Topological fingerprint ¹ を用い、その類似性をタニモト係数で評価する類似性評価 Topological fingerprint : 分子内の部分構造パターンを列挙してビット化する	0~1 の範囲で、1 に近いほど類似性が高い。0.5~1 の数値を入力する。
	Fingerprint Morgan	rdkit の Morgan fingerprint ² を用い、その類似性をタニモト係数で評価する類似性評価 Morgan fingerprint : 原子を中心に局所環境を半径で拡張して表現したもの。	0~1 の範囲で、1 に近いほど類似性が高い。0.5~1 の数値を入力する。
インビトロ実験プロファイル類似性		<i>in vitro</i> 試験結果予測値 (211 種) の陽性/陰性のパターンの類似性をタニモト係数で評価する類似性評価	0~1 の範囲で、1 に近いほど類似性が高い。0.5~1 の数値を入力する。
PK プロファイル類似性		体内動態パラメータ(吸収速度、分布容積、肝代謝消失)を用いた三次元空間における物質間のユークリッド距離を指標とした類似性評価	0~1 の範囲で、0 に近いほど類似性が高い。0~0.5 の数値を入力する。
分子量類似性		予測対象物質の分子量との差分を指標とした類似性評価	小さいほど分子量の類似性が高い。1~500 範囲の数値を入力可能。

2. 毒性予測、体内動態予測の方法

2.1. AI-SHIPS を用いた基本的な操作フロー

体内動態予測や毒性予測の基本的なフローは下記の通りです。

まず、予測対象物質を入力します。併せて投与量などの条件を入力します。予測を実行する前に、毒性予測モデルの適用領域に関する確認をします。具体的には、主要分子記述子に関して学習データの最小~最大の範囲内に予測対象物質の値が入っているかの確認や、AI-SHIPS で作成したケミカルスペース（多くの一般化学物質について、その化学構造を多数の構造記述子で表現し、記述子の数と同じ次元数の空間に化学構造をプロットしたものを Generative Topographic Mapping (GTM) 手法で二次元平面に写像した図で、本システムではこのケミカルスペースを略して CS という) で学習データ群と予測対象物質の位置関係を確認します。その後、予測を実行し予測結果を確認します。

本システムでは、毒性予測と体内動態予測は独立したアプリケーションとなっています。体内動態予測と毒性予測は同時計算が可能で、両者の結果が出力されますが、毒性予測結果に体内動態予測結果が考慮されていないことにご留意ください。体内動態予測結果と毒性予測結果の両方を踏まえた総合的な検討、判断が必要です。

毒性予測については、毒性予測の変数として使用されている各種 *in vitro* 試験の結果も表示されます。この情報は、毒性発現の作用機序の解釈などの参考として活用ください。

¹ <https://www.rdkit.org/docs/GettingStartedInPython.html#topological-fingerprints>

² <https://www.rdkit.org/docs/GettingStartedInPython.html#morgan-fingerprints-circular-fingerprints>

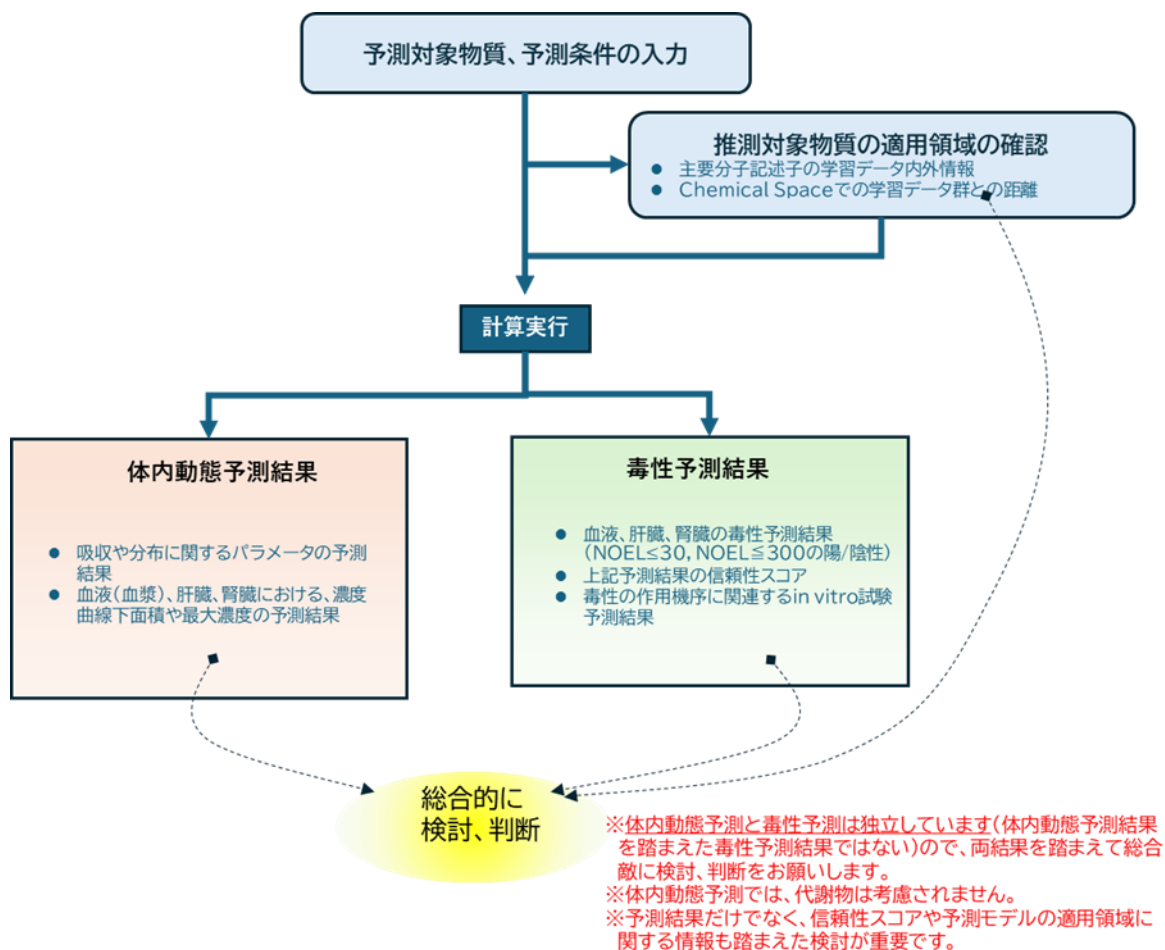


図 2.1-1 体内動態予測、毒性予測の流れ

2.2. 結果の解釈のポイント

結果の解釈のポイントを以下に列挙します。

- 体内動態予測の結果として出力される体内吸収、代謝、蓄積性に関わるパラメータなどから、毒性発現の可能性を検討します。
- 体内動態予測では代謝物の考慮は非常に重要ですが、本モデルでは考慮されていません。実験あるいは別途代謝物予測システムで予測した物質を本システムの入力対象として、代謝物の体内動態を検討することを強く推奨します。代謝候補物質生成が可能なシステムは商用を含めると数多く存在します。無償のものでは、GLORYx³、SyGMA⁴、BioTransformer⁵などがあります。精度や得意領域などを踏まえて利用することを推奨します。
- 毒性予測モデルについて、下記の物質は学習データの対象外としているため、適用範囲の対象外となります。
 - ・ 脱塩処理の後で炭素を含まない物質
 - ・ プロジェクトで実施した *in vitro* 試験の対象物質に含まれていない元素である、B, Al, Si, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr, Zr, Sn, Te, Pt を含む物質

³ <https://nerdd.univie.ac.at/gloryx/>

⁴ <https://github.com/3D-e-Chem/sygma>

⁵ <https://bitbucket.org/djoubou/biotransformerjar/>

- 化審法の対象外の物質
 - 高分子（AI-SHIPS では、入力物質の SMILES として 80 文字まで、分子量は 1000 に制限されている）
- 毒性予測については、まず予測対象が適用範囲と判断できるかを、システムの CS 画面で 2 つの事項を確認します。1 つ目に、主要な mordred 記述子について、予測対象物質の値が AI-SHIPS 毒性予測モデルの学習データの最大値と最小値の間であれば、学習データ群の中にあると言えます、毒性予測結果の信頼性が高いと判断できる材料の 1 つになります。2 つ目に、CS で示される毒性予測モデルの学習データのプロット群と予測対象物質のプロットの位置関係を見ます。CS で近接した位置に図示される物質同士は、一定の構造類似性が認められます。したがって両者の距離が近い（学習データを示すプロット群の中に対象物質のプロットがある）場合は、予測対象物質が学習データ群との構造類似性が高く、予測結果の信頼性が高いと考えられます。逆に学習データのプロット群から外れた位置に予測対象物質のプロットがあれば、学習データとの類似性が低い物質であり、予測結果の信頼性は低いと考えられます。
- 毒性予測については、予測結果（陽性／陰性）とともに出力される信頼性スコアの値を見ます。信頼性スコアが低い場合は、信頼性が低いと考えます。信頼性スコアについては 3.4 を参照ください。また、信頼性スコアの取り扱いについては以下の点にご留意ください。
- 同じモデルでは、物質間の信頼性スコアの比較は可能である。
例えば、「肝毒性/細胞障害・炎症」で予測結果が 1（毒性あり）である 2 種類の物質について、片方が信頼性 0.8、もう片方が信頼性 0.1 の時、前者は毒性ありの可能性が高いが、後者は毒性ありの予測が誤っている可能性も考えられる。
 - 異なるモデル間での信頼性スコアの比較はできない。
例えば、「肝毒性/細胞障害・炎症」の信頼性 0.7 と「血液毒性/凝固/NOEL」の信頼性 0.7 の意味合いは異なる。
- 予測モデルの外部評価において、信頼性スコアが一定の値（閾値）より大きい物質の予測精度は、全体の予測精度より高くなる傾向が見られました。そこで、この閾値より大きい領域を適用範囲（applicability domain; AD）と捉え、最適な閾値を設定しました。具体的には、閾値を大きくすると物質のカバー率（適用範囲に入る物質数）が低下するため、信頼性スコアが 0～0.4 の範囲で、かつカバー率がある程度確保できる範囲で、AD 内の精度が高くなる値を AD の閾値と設定しました。この AD 閾値は、精度評価に用いる物質群によってばらつくため、25 回の試行を行いました。その結果に対して Bootstrap 検証を実施した結果を以下に示します。Mean, Standard deviation, Range は、25 回の試行で得られた 25 個の AD 閾値の平均値とその分散、AD 閾値の幅（最小値と最大値）を示しています。BA(balanced accuracy)はこの閾値を求めた際の各モデルの予測精度を表します。予測結果の信頼性スコアが以下に示す AD 閾値より大きければ AD 内と捉えることができ、その時の精度は下記で示す BA 程度ということです（3.5 参照）。

表 2.2-1 適用範囲（AD）の参考となる信頼性スコア

モデル名	AD 内外の閾値となる信頼性スコア			Mean BA
	Mean	Standard deviation	Range	
EP_BL01_NOEL_300	0.30	0.09	[0.09, 0.40]	0.78
EP_BL02_NOEL_300	0.34	0.07	[0.11, 0.40]	0.77

モデル名	AD 内外の閾値となる信頼性スコア			Mean BA
	Mean	Standard deviation	Range	
EP_KD01_NOEL_300	0.33	0.08	[0.04, 0.40]	0.74
EP_LV01_NOEL_300	0.22	0.06	[0.07, 0.30]	0.80
EP_LV02_NOEL_300	0.16	0.06	[0.05, 0.28]	0.77
EP_LV03_NOEL_300	0.32	0.10	[0.04, 0.40]	0.71
EP_LV04_NOEL_300	0.35	0.05	[0.23, 0.40]	0.76
EP_LV05_NOEL_300	0.36	0.05	[0.13, 0.40]	0.84
EP_LV06_NOEL_300	0.36	0.06	[0.14, 0.40]	0.76
EP_BL01_NOEL_30	0.13	0.08	[0.02, 0.27]	0.80
EP_BL02_NOEL_30	0.13	0.13	[0.00, 0.40]	0.77
EP_KD01_NOEL_30	0.15	0.14	[0.01, 0.40]	0.73
EP_LV01_NOEL_30	0.21	0.11	[0.07, 0.38]	0.80
EP_LV02_NOEL_30	0.20	0.12	[0.00, 0.39]	0.77
EP_LV03_NOEL_30	0.06	0.03	[0.00, 0.13]	0.82
EP_LV04_NOEL_30	0.09	0.09	[0.00, 0.34]	0.80
EP_LV05_NOEL_30	0.23	0.10	[0.01, 0.36]	0.82
EP_LV06_NOEL_30	0.24	0.11	[0.01, 0.39]	0.77

- 矛盾する推測結果（NOEL \leq 300mg/kg/day で陰性で NOEL \leq 30mg/kg/day で陽性）が得られた場合は、推測値の信頼性は低いと考えてください。
- 毒性予測とともに類似物質検索を実施すると、AI-SHIPS プロジェクトで収集した物質の有害性試験結果が参照できます。類似性が高い物質の有害性試験結果と予測対象の物質の予測結果が矛盾する場合は、その信頼性スコアを確認し、その値及びその付近の値以下の信頼性スコアの結果は用いるべきではないと考えられます。
- 毒性予測結果とともに、毒性発現の作用機序に関連する各種 *in vitro* 試験の結果が示されます。これらは、毒性発現の作用機序の検討に活用できます。

3. 毒性予測における *in vivo* 毒性予測モデルの説明

3.1. *in vivo* 毒性予測モデルの予測対象

AI-SHIPS プロジェクトでは、ラット 28 日間反復投与試験を予測対象としていますが、具体的には、6つの肝毒性と2つの血液毒性、腎毒性の9つを毒性のエンドポイントとしています（これらを毒性エンドポイントという）。

HESS (ver.4.0) のでは、試験データごとに、反復投与毒性試験結果の詳細情報、すなわち血液生理化学検査、病理組織学的検査等 400 を超える毒性所見についての NOEL 値が記載されています。これら毒性所見を分析し、肝臓、血液、腎臓の各毒性エンドポイントを下記のように定義しました。

分類	モデル名	グループ名	HESSの毒性所見による定義
肝毒性	EP_LV01	細胞傷害・炎症	血中ALT↑、肝細胞壊死、肝細胞浸潤等、HESSの毒性所見の6つの所見のNOELの最低値
	EP_LV02	肝機能低下	血中Alb↓、血中タンパク↓、肝重量↓等、HESSの毒性所見の5つの所見のNOELの最低値
	EP_LV03	肝機能亢進	血中Alb↑、血中タンパク↑、HESSの毒性所見の3つの所見のNOELの最低値
	EP_LV04	胆管障害	総ビリルビン↑、ALP↑、γ-GTP↑等、HESSの毒性所見の5つの所見のNOELの最低値
	EP_LV05	肥大	肝細胞肥大、肝腫大、肝絶対重量↑等、HESSの毒性所見の5つの所見のNOELの最低値
	EP_LV06	脂質代謝異常	血中総Chol↑↓、血中TG↑↓等、肝脂肪変性等、HESSの毒性所見の10つの所見のNOELの最低値
血液毒性	EP_BL01	血液凝固異常	プロトロンビン時間↑、活性化部分トロンボプラスチン時間↑、フィブリノーゲン↓等、HESSの毒性所見の4つの所見のNOELの最低値
	EP_BL02	貧血	赤血球数↓、ヘモグロビン↓、ヘマトクリット値↓、網状赤血球数↑等、HESSの毒性所見の4つの所見のNOELの最低値
腎毒性	EP_KD01	腎機能障害	BUN↑、血中Cre↑、腎細胞浸潤、尿細管萎縮・変性・上皮剥離、腎絶対重量↑等、HESSの毒性所見の28つの所見のNOELの最低値

毒性試験の結果は概ね5つの濃度区分の1つの値をNOELとしたものであることや最大濃度でも影響がないという、「NOEL≥最大濃度」といった結果も多いことなどを考慮し、NOELを定量評価するモデルではなく、NOELがある値以上か、否かという2値判定モデルとしました。2値判定モデルの閾値として、投与量30mg/kg/dayと300mg/kg/dayの2種類としました。この閾値は、化審法における28日間反復投与毒性試験に基づく有害性クラス3及び4の閾値に準じた予測を念頭に設定しました(図3.1-1)。

有害性クラス				
1	2	3	4	クラス外
D-value = 0.0005 NO(A)EL=0.3	D-value = 0.005 NO(A)EL=3	D-value = 0.05 NO(A)EL=30	D-value = 0.5 NO(A)EL=300	

*D値(mg/kg/day):有害性評価値・無毒性量等(NO(A)EL等)を不確実係数積で除した数値で、不確実係数積は、600(試験期間が90日未満(UF=6)、個体差(UF=10)、種差(UF=10)の積)を用いている。

図 3.1-1 化審法のスクリーニング評価(28日間反復投与試験)で用いる有害性クラス

以上より、表3.1-1に示す18のエンドポイントの2値判定モデルを構築しました。

表 3.1-1 *in vivo* 毒性予測モデル一覧

No.	モデル名	エンドポイント
1	EP_LV01_NOEL_300	ラット反復投与毒性試験において肝臓の細胞傷害・炎症のNOELが300(mg/kg/day)以下か否か
2	EP_LV01_NOEL_30	ラット反復投与毒性試験において肝臓の細胞傷害・炎症のNOELが30(mg/kg/day)以下か否か
3	EP_LV02_NOEL_300	ラット反復投与毒性試験において肝臓の肝機能低下のNOELが300(mg/kg/day)以下か否か
4	EP_LV02_NOEL_30	ラット反復投与毒性試験において肝臓の肝機能低下のNOELが30(mg/kg/day)以下か否か
5	EP_LV03_NOEL_300	ラット反復投与毒性試験において肝臓の肝機能亢進のNOELが300(mg/kg/day)以下か否か
6	EP_LV03_NOEL_30	ラット反復投与毒性試験において肝臓の肝機能亢進のNOELが30(mg/kg/day)以下か否か
7	EP_LV04_NOEL_300	ラット反復投与毒性試験において肝臓の胆管障害のNOELが300(mg/kg/day)以下か否か

No.	モデル名	エンドポイント
8	EP_LV04_NOEL_30	ラット反復投与毒性試験において肝臓の胆管障害の NOEL が 30 (mg/kg/day)以下か否か
9	EP_LV05_NOEL_300	ラット反復投与毒性試験において肝臓の肥大の NOEL が 300 (mg/kg/day)以下か否か
10	EP_LV05_NOEL_30	ラット反復投与毒性試験において肝臓の肥大の NOEL が 30 (mg/kg/day)以下か否か
11	EP_LV06_NOEL_300	ラット反復投与毒性試験において肝臓の脂質代謝異常の NOEL が 300 (mg/kg/day)以下か否か
12	EP_LV06_NOEL_30	ラット反復投与毒性試験において肝臓の脂質代謝異常の NOEL が 30 (mg/kg/day)以下か否か
13	EP_BL_01_NOEL_300	ラット反復投与毒性試験における血液の凝固の NOEL が 300 (mg/kg/day)以下か否か
14	EP_BL_01_NOEL_30	ラット反復投与毒性試験における血液の凝固の NOEL が 30 (mg/kg/day)以下か否か
15	EP_BL_02_NOEL_300	ラット反復投与毒性試験における血液の貧血の NOEL が 300 (mg/kg/day)以下か否か
16	EP_BL_02_NOEL_30	ラット反復投与毒性試験における血液の貧血の NOEL が 30 (mg/kg/day)以下か否か
17	EP_KD_01_NOEL_30	ラット反復投与毒性試験における腎臓の腎障害・機能障害の NOEL が 30 (mg/kg/day)以下か否か
18	EP_KD_01_NOEL_300	ラット反復投与毒性試験における腎臓の腎障害・機能障害の NOEL が 300 (mg/kg/day)以下か否か

3.2. 学習データ

予測モデルを構築する際には、学習データが必要になりますが、HESS のほか、REACH 登録情報、ToxRef および化審法新規審査シートを情報源として、下記の条件に合致する 2,000 を超える毒性試験を収集しました。

- ・ OECD TG407（28 日間反復経口投与毒性試験）、OECD TG422（反復投与毒性試験と生殖/発生毒性スクリーニング試験の併合試験）またはこれに相当する毒性試験
- ・ 投与期間が 28 日以上 90 日未満（亜急性毒性に該当する）
- ・ 雄のデータ（ただし、雌雄が不明の場合も採用）

HESS では、試験データごとに、反復投与毒性試験結果の詳細情報、すなわち血液生理化学検査、病理組織学的検査等 400 を超える毒性所見項目についての NOEL 値が記載されています。これらの毒性所見と肝臓、血液、腎臓の各毒性エンドポイントを関連づけ、各毒性エンドポイントの NOEL 値は、関連する毒性所見の NOEL 値の最低値を採用しました（表 3.2-1）。HESS 以外の情報源から収集した毒性情報も HESS と同じ毒性所見項目で整理した上で、各毒性エンドポイントの NOEL 値を決定しました。

さらに、下記の物質は除外し、約 1,900 のデータを AI-SHIPS 毒性データセットとしました。

- ・ 脱塩処理の後で炭素を含まない物質
- ・ プロジェクトで実施した *in vitro* 試験の対象物質に含まれていない元素である、B, Al, Si, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr, Zr, Sn, Te, Pt を含む物質

- ・ 化審法の対象外の物質
 - ・ 高分子（AI-SHIPS では、入力物質の SMILES として 80 文字まで、分子量は 1000 に制限されている）
- 毒性エンドポイントの NOEL 値を 2 値化した際の陽性率を表 3.2-2 示しました。閾値=30mg/kg/day では陽性率が低くなっています。

表 3.2-1 毒性エンドポイントに關与する HESS の *in vivo* の毒性所見

毒性エンドポイント	HESS の <i>in vivo</i> の毒性所見 *
肝毒性：細胞傷害・炎症 (EP_LV01)	Blood chemical examination-Blood serum (Enzyme)-<>-ALT(GPT) ↑
	Histopathological findings-Liver-<>-Cell infiltration/Infiltration
	Histopathological findings-Liver-<>-Cell infiltration/Inflammation
	Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Necrosis hepatocyte (Centrilobular)
	Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Necrosis hepatocyte (Other)
	Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Necrosis hepatocyte (Periportal)
肝毒性：肝機能低下(EP_LV02)	Blood chemical examination-Blood serum (Enzyme)-<>-A/G ↓
	Blood chemical examination-Blood serum (Enzyme)-<>-Alb ↓
	Blood chemical examination-Blood serum (Enzyme)-<>-T. protein ↓
	Organ weights-Liver-<>-Absolute organ weight ↓
	Organ weights-Liver-<>-Relative organ weight ↓
肝毒性：肝機能亢進 (EP_LV03)	Blood chemical examination-Blood serum (Enzyme)-<>-A/G ↑
	Blood chemical examination-Blood serum (Enzyme)-<>-Alb ↑
	Blood chemical examination-Blood serum (Enzyme)-<>-T. protein ↑
肝毒性：胆管障害 (EP_LV04)	Blood chemical examination-Blood serum (Bilirubin)-<>-T. bilirubin ↑
	Blood chemical examination-Blood serum (Enzyme)-<>-ALP ↑
	Blood chemical examination-Blood serum (Enzyme)-<>-γ-GTP ↑
	Histopathological findings-Liver-Bile duct-Bile thrombus
	Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Necrosis hepatocyte (Periportal)
肝毒性：肥大 (EP_LV05)	Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Centrilobular)
	Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Other)
	Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Periportal)
	Necropsy-Liver-<>-Enlarged (Necropsy)
	Organ weights-Liver-<>-Absolute organ weight ↑
肝毒性：脂質代謝異常 (EP_LV06)	Blood chemical examination-Blood serum (Lipid)-<>-T. cholesterol ↑
	Blood chemical examination-Blood serum (Lipid)-<>-T. cholesterol ↓
	Blood chemical examination-Blood serum (Lipid)-<>-Triglyceride ↑
	Blood chemical examination-Blood serum (Lipid)-<>-Triglyceride ↓
	Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Fatty change/Vacuolization ↑ (Centrilobular)
	Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Fatty change/Vacuolization ↑ (Other)
	Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Fatty change/Vacuolization ↑ (Periportal)
	Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Fatty change/Vacuolization ↓ (Centrilobular)
	Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Fatty change/Vacuolization ↓ (Other)
Histopathological findings-Liver-Hepatocyte-Fatty change/Vacuolization ↓ (Periportal)	
血液毒性：凝固 (EP_BL01)	Hematological examination-Blood cell (Coagulation)-<>-APTT ↑
	Hematological examination-Blood cell (Coagulation)-<>-CT ↑

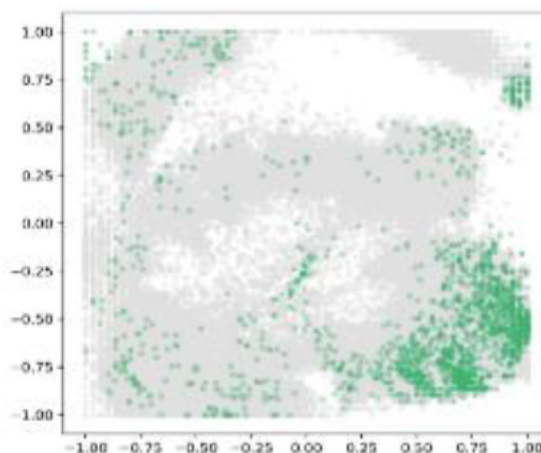
毒性エンドポイント	HESS の <i>in vivo</i> の毒性所見 *
	Hematological examination-Blood cell (Coagulation)-<>-Fibrinogen ↓
	Hematological examination-Blood cell (Coagulation)-<>-PT ↑
血液毒性：貧血 (EP_BL02)	Hematological examination-Blood cell (Erythrocyte)-<>-HCT ↓
	Hematological examination-Blood cell (Erythrocyte)-<>-HGB ↓
	Hematological examination-Blood cell (Erythrocyte)-<>-RBC ↓
	Hematological examination-Blood cell (Erythrocyte)-<>-Reticulocyte ↑
腎毒性：腎障害・ 機能障害 (EP_KD01)	Blood chemical examination-Blood serum (Nitrogen compound)-<>-BUN ↑
	Blood chemical examination-Blood serum (Nitrogen compound)-<>-Creatinine ↑
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Distal/Collecting duct)-Atrophy
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Other)-Atrophy
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Proximal)-Atrophy
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Distal/Collecting duct)-Basophilic change/Regeneration/Degeneration
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Other)-Basophilic change/Regeneration/Degeneration
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Proximal)-Basophilic change/Regeneration/Degeneration
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Distal/Collecting duct)-Casts
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Other)-Casts
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Proximal)-Casts
	Histopathological findings-Kidney-<>-Cell infiltration/Infiltration
	Histopathological findings-Kidney-<>-Cell infiltration/Inflammation
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Distal/Collecting duct)-Desquamation tubular epithelium cell
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Other)-Desquamation tubular epithelium cell
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Proximal)-Desquamation tubular epithelium cell
	Histopathological findings-Kidney-Pelvis/Papilla-Enlarged
	Histopathological findings-Kidney-Pelvis/Papilla-Hyperplasia epithelium
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Distal/Collecting duct)-Hypertrophy epithelium
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Other)-Hypertrophy epithelium
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Proximal)-Hypertrophy epithelium
	Histopathological findings-Kidney-Pelvis/Papilla-Necrosis
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Distal/Collecting duct)-Necrosis
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Other)-Necrosis
	Histopathological findings-Kidney-Renal tubule (Proximal)-Necrosis
	Histopathological findings-Kidney-<>-Nephropathy
	Necropsy-Kidney-<>-Enlarged (Necropsy)
Organ weights-Kidney-<>-Absolute organ weight ↑	

* HESS の毒性試験結果の詳細は、「Examination items」、「Organ(Tissue)」、「Tissue」、「Effect」の項目で構成されているため、これらの文字列を連結させて1つの文字列を作ると483個のユニークな毒性所見が得られた（ここでは、「Examination items」、「Organ(Tissue)」、「Tissue」、「Effect」をハイフン「-」で連結して示している。空欄の場合は該当項目を「<>」としている）。このうち、肝臓、血液、腎臓の各毒性エンドポイントと関連のある毒性所見を抽出した。

表 3.2-2 AI-SHIPS 毒性データセットのエンドポイント毎の陽性率

毒性エンドポイント	物質数	閾値=300 mg/kg/day		閾値=30mg/kg/day	
		陽性物質数	陽性率	陽性物質数	陽性率
EP_LV01_NOEL	1917	794	41.40%	141	7.40%
EP_LV02_NOEL	1922	722	37.60%	124	6.50%
EP_LV03_NOEL	1921	764	39.80%	141	7.30%
EP_LV04_NOEL	1922	777	40.40%	159	8.30%
EP_LV05_NOEL	1911	1028	53.80%	315	16.50%
EP_LV06_NOEL	1918	862	44.90%	242	12.60%
EP_BL01_NOEL	1922	674	35.10%	117	6.10%
EP_BL02_NOEL	1920	778	40.50%	184	9.60%
EP_KD01_NOEL	1919	941	49.00%	221	11.50%

PubChem(アメリカ NIH 傘下の NCBI が運営する化学物質のデータベース) より無作為に抽出した約 10 万の化学物質について、866 種の mordred 記述子を算出し、確率モデルを用いて二次元平面に写像したケミカルスペース(以後、毒性予測 CS という) 上の学習データの広がりの様子を図 3.2-1 に示します。学習データが密な領域については、予測が得意であるとみることができます。



灰色：CSを構成した際の10万件の物質

図 3.2-1 *in vivo* 毒性予測モデルの学習データ(緑)の毒性予測CSにおける広がり

3.3. モデル構築方法と hold-out の予測精度

in vivo 毒性予測モデルの構築プロセスの概要を図 3.3-1 に示します。AI-SHIPS 毒性データセット中の約 10%の物質を外部評価用とし、約 72%を学習用、約 18%を hold-out の評価用としました。

Random forest、XGBoost、LightGBM の 3 つの機械学習アルゴリズムを用い、学習データ(72%データ)を使って 3-fold Cross Validation でハイパーパラメータを選択しました。予測モデルの評価指標は、ROC 曲線(Receiver Operating Characteristic curve, 偽陽性率に対する陽性率)の AUC(Area Under the Curve, 曲線下面積)とし、hold-out 評価データ(18%データ)にて、高い ROC-AUC が得られたアルゴリズムを採用しました。

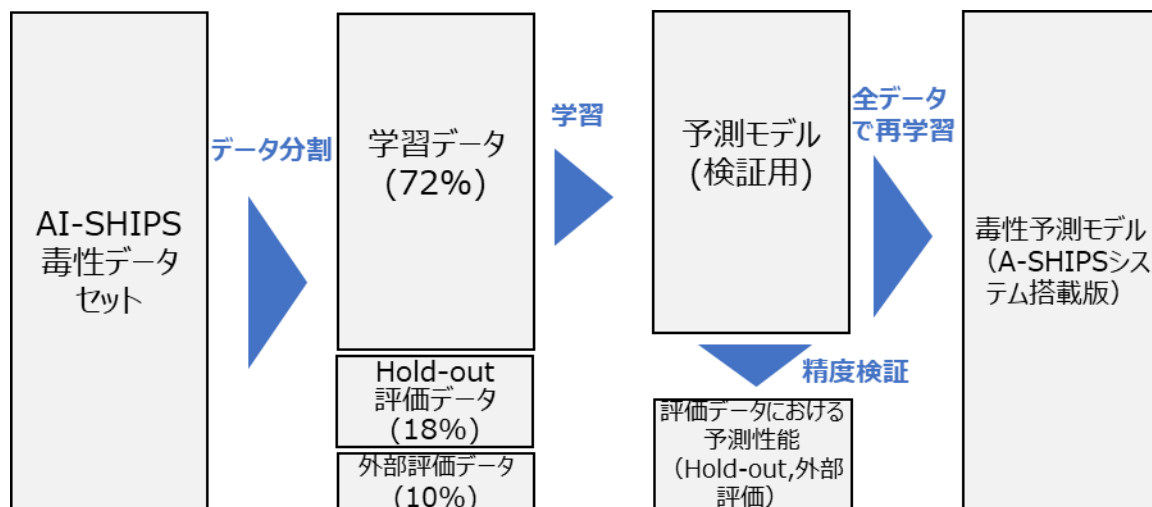


図 3.3-1 モデルのトレーニング方法の概要

本モデルで用いられている記述子は下記の 4 種類です。NOEL \leq 300 モデルでは、1)~3)の 211 個の説明変数を、NOEL \leq 30 モデルでは、1)~4)の 212 個の説明変数を使用しました。なお、hold-out 評価において精度が低かった EP_BL01、EP_BL02、EP_LV01、EP_LV02、EP_LV03 の 5 つの *in vivo* 毒性予測モデルについては、記述子の重要度に基づいた変数選択を実施しました。

1)mordred 記述子 15 種

1,825 種の mordred v1.1.2 記述子から化学物質の物性と構造的特徴を示す記述子として選定した 15 種記述子。

2)AI-SHIPS *in vitro* 試験結果 95 個 (予測値)

プロジェクトで実施した種々の *in vitro* 試験について構築した 103 の予測モデルのうち、hold-out 評価で balanced accuracy \geq 0.65 を満たした 95 モデルから算出される予測値。予測値は 0~1 の範囲の予測確率で表される (試験の内容やその予測モデルについては、6 を参照)。

3)AI-SHIPS Tox21 *in vitro* 試験結果 101 個 (予測値)

TOX21 の *in vitro* 試験に関して構築した 118 の予測モデルのうち、hold-out 評価で balanced accuracy \geq 0.65 を満たした 101 モデルから算出される予測値。予測値は 0~1 の範囲の予測確率で表される (試験の内容やその予測モデルについては、5 を参照)。

4)NOEL \leq 300 モデルの予測値 (NOEL \leq 30 モデルのみ)

NOEL \leq 30 モデルと NOEL \leq 300 モデルで矛盾した予測値となることを回避する目的で、NOEL \leq 30 モデルで NOEL \leq 300 モデルの予測値を説明変数とする。

表 3.3-1 モデル毎の採用した記述子数

モデル名 *印：変数選択を行ったモデル	1.mordred 記述子	2.AI-SHIPS <i>in vitro</i> 試験結果	3. AI-SHIPS Tox21 <i>in vitro</i> 試験結果	4.NOEL \leq 300 モデルの予測値
EP_LV01_NOEL_300*	10	33	27	-
EP_LV01_NOEL_30*	6	24	40	1
EP_LV02_NOEL_300*	10	33	27	-
EP_LV02_NOEL_30*	6	22	15	1
EP_LV03_NOEL_300*	13	78	101	-
EP_LV03_NOEL_30*	5	26	42	1
EP_LV04_NOEL_300	15	95	101	-
EP_LV04_NOEL_30	15	95	101	1
EP_LV05_NOEL_300	15	95	101	-
EP_LV05_NOEL_30	15	95	101	1
EP_LV06_NOEL_300	15	95	101	-
EP_LV06_NOEL_30	15	95	101	1
EP_BL01_NOEL_300*	14	77	101	-
EP_BL01_NOEL_30*	8	27	35	1
EP_BL02_NOEL_300	15	95	101	-
EP_BL02_NOEL_30*	12	76	98	1
EP_KD_01_NOEL_300	15	95	101	-
EP_KD_01_NOEL_30	15	95	101	1

学習データセットの 72%を用いて学習し、hold-out した 18%のデータで評価した際の精度指標とその値を表 3.3-2 に示しました。tp、fp、fn、tn はそれぞれ真陽性(True Positive)、偽陽性(False Positive)、偽陰性(False Negative)、真陰性(True Negative)のデータ数です。BA はバランス精度(Balanced Accuracy)であり、感度(Sensitivity, $tp / (tp + fn)$)と特異度(Specificity, $tn / (tn + fp)$)の平均です。

表 3.3-2 hold-out 評価結果

モデル名	BA	ROC-AUC	Sensitivity	Specificity	tp	fp	fn	tn
EP_LV01_NOEL_300	0.768	0.805	0.708	0.827	17	56	7	268
EP_LV01_NOEL_30	0.738	0.784	0.726	0.749	85	58	32	173
EP_LV02_NOEL_300	0.706	0.716	0.667	0.746	14	83	7	244
EP_LV02_NOEL_30	0.716	0.748	0.669	0.762	81	54	40	173
EP_LV03_NOEL_300	0.738	0.799	0.833	0.642	20	116	4	208
EP_LV03_NOEL_30	0.755	0.807	0.800	0.710	88	69	22	169
EP_LV04_NOEL_300	0.733	0.785	0.556	0.910	15	29	12	292
EP_LV04_NOEL_30	0.720	0.754	0.714	0.725	90	61	36	161

モデル名	BA	ROC-AUC	Sensitivity	Specificity	tp	fp	fn	tn
EP_LV05_NOEL_300	0.705	0.771	0.786	0.623	44	110	12	182
EP_LV05_NOEL_30	0.727	0.766	0.746	0.708	132	50	45	121
EP_LV06_NOEL_300	0.777	0.788	0.854	0.700	35	92	6	215
EP_LV06_NOEL_30	0.730	0.780	0.730	0.730	111	53	41	143
EP_BL01_NOEL_300	0.718	0.763	0.947	0.489	18	168	1	161
EP_BL01_NOEL_30	0.729	0.801	0.817	0.640	103	80	23	142
EP_BL02_NOEL_300	0.791	0.824	0.742	0.839	23	51	8	266
EP_BL02_NOEL_30	0.734	0.793	0.802	0.667	101	74	25	148
EP_KD_01_NOEL_300	0.701	0.715	0.595	0.807	22	60	15	251
EP_KD_01_NOEL_30	0.698	0.759	0.692	0.704	110	56	49	133

3.4. 信頼性スコア

適用領域に係る指標として、信頼性スコア(reliability score)を使用しています。信頼性スコアは、予測値の予測確度を示し、0~1の数値で1に近いほど予測確度が高くなります。

信頼性スコアの算出方法は次の通りです。モデルの出力として得られる0~1の範囲の予測確率(probability)からYouden法で最適化したカットオフ値を算出し、式1を用いて補正することによってカットオフ値が0.5となる補正済予測確率を算出しました。式2を用いてこの補正済予測確率と0.5の差の絶対値の2倍(区間[0,1])に変換するため)を信頼性スコアとしています(図3.4-1)。

各モデルの予測確率が0(negative)もしくは1(positive)であれば、信頼性スコアは1.0となります。また、補正済予測確率が0.5であれば、信頼性スコアは0となります。

$$corrected\ probability = probability^{\frac{\log_2}{\log cutoff}} \tag{式1}$$

(probability: モデルの出力した予測確率 cutoff: 2 値化の閾値)

$$reliability\ score = 2 \times |corrected\ probability - 0.5| \tag{式2}$$

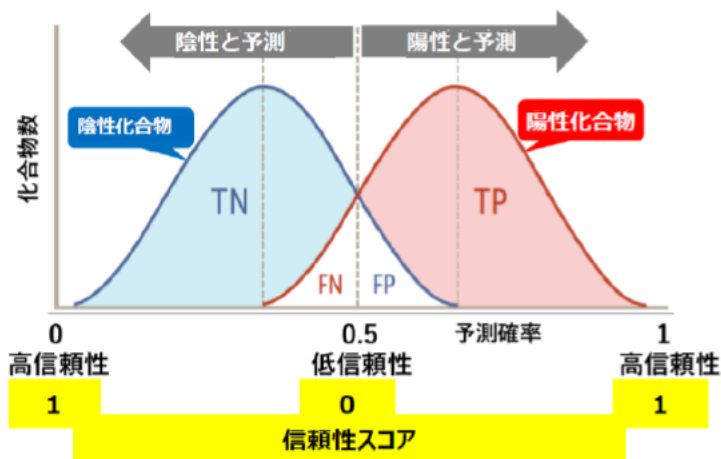


図 3.4-1 信頼性スコア

3.5. 信頼性スコアによる AD の考え方

毒性データセットの 10%を用いて実施した外部評価では、BA は hold-out 評価と比べて低下しました。外部検証に使用した物質の中に、予測の信頼度の低い物質が含まれている可能性があり、予測の信頼性スコアを applicability domain(AD)を適用することで予測性能が改善されることが期待されました。信頼性スコアで AD の閾値を設定すると、閾値を大きくするにしたがって、AD 内の BA が高くなる傾向が見られました。一方で、閾値を大きくすると物質のカバー率が低下します。そこで、信頼性スコア 0~0.4 の範囲で、カバー率がある程度高く(AD 内に 50 物質以上存在する)、外部評価の BA が最も高くなる値を AD の閾値と設定しました (表 3.5-1)。AD を適用することで hold-out 評価と同等の汎化性能を持つことが示唆されました。すなわち、予測対象物質の信頼性スコアが AD の閾値より大きければ AD 内と考えることができ、その際の予測性能は、hold-out 評価における BA 程度 (表 3.3-2) です。

表 3.5-1 外部評価結果 (AD 適用後)

モデル名	AD の閾値	AD 内の評価結果				AD 内の物質カバー率
		BA	ROC-AUC	Sensitivity	Specificity	
EP_LV01_NOEL_300	0.33	0.721	0.757	0.771	0.672	63.20%
EP_LV01_NOEL_30	0.37	0.749	0.759	0.667	0.831	47.30%
EP_LV02_NOEL_300	0.29	0.756	0.754	0.765	0.746	57.70%
EP_LV02_NOEL_30	0.37	0.912	0.947	1.000	0.825	31.90%
EP_LV03_NOEL_300	0.37	0.726	0.744	0.826	0.625	60.40%
EP_LV03_NOEL_30	0.049	0.727	0.682	1.000	0.455	40.10%
EP_LV04_NOEL_300	0.39	0.761	0.824	0.773	0.750	57.10%
EP_LV04_NOEL_30	0.224	0.671	0.713	0.385	0.957	71.40%
EP_LV05_NOEL_300	0.35	0.821	0.801	0.921	0.720	34.60%
EP_LV05_NOEL_30	0.224	0.671	0.713	0.385	0.957	71.40%
EP_LV06_NOEL_300	0.39	0.741	0.770	0.837	0.644	48.40%
EP_LV06_NOEL_30	0.247	0.824	0.880	1.000	0.648	44.50%
EP_BL01_NOEL_300	0.36	0.735	0.739	0.970	0.500	40.10%
EP_BL01_NOEL_30	0.078	0.637	0.670	1.000	0.274	50.50%
EP_BL02_NOEL_300	0.09	0.691	0.730	0.844	0.538	85.20%
EP_BL02_NOEL_30	0.243	0.706	0.753	0.571	0.841	76.90%
EP_KD_01_NOEL_300	0.4	0.711	0.789	0.724	0.698	61.00%
EP_KD_01_NOEL_30	0.396	0.733	0.599	0.500	0.966	35.70%

表 3.5-1 に示した AD の閾値は、hold-out したデータの内容によってばらつき可能性があるため、hold-out の内容を変えて 25 回試行した結果をもとに Bootstrap 検証を実施し、最終的な AD 閾値を決定しました。表 3.5-2 に示します。Mean、Standard deviation、Range は、25 回の試行で得られた 25 個の AD 閾値の平均値とそ

の分散、AD 閾値の幅（最小値と最大値）を示しています。BA はこの閾値を求めた際の各モデルの予測精度を表します。

表 3.5-2 AI-SHIPS *in vivo* 毒性モデルの AD 閾値と閾値内の平均 BA

モデル名	AD 内外の閾値となる信頼性スコア			Mean BA
	Mean	Standard deviation	Range	
EP_BL01_NOEL_300	0.30	0.09	[0.09, 0.40]	0.78
EP_BL02_NOEL_300	0.34	0.07	[0.11, 0.40]	0.77
EP_KD01_NOEL_300	0.33	0.08	[0.04, 0.40]	0.74
EP_LV01_NOEL_300	0.22	0.06	[0.07, 0.30]	0.80
EP_LV02_NOEL_300	0.16	0.06	[0.05, 0.28]	0.77
EP_LV03_NOEL_300	0.32	0.10	[0.04, 0.40]	0.71
EP_LV04_NOEL_300	0.35	0.05	[0.23, 0.40]	0.76
EP_LV05_NOEL_300	0.36	0.05	[0.13, 0.40]	0.84
EP_LV06_NOEL_300	0.36	0.06	[0.14, 0.40]	0.76
EP_BL01_NOEL_30	0.13	0.08	[0.02, 0.27]	0.80
EP_BL02_NOEL_30	0.13	0.13	[0.00, 0.40]	0.77
EP_KD01_NOEL_30	0.15	0.14	[0.01, 0.40]	0.73
EP_LV01_NOEL_30	0.21	0.11	[0.07, 0.38]	0.80
EP_LV02_NOEL_30	0.20	0.12	[0.00, 0.39]	0.77
EP_LV03_NOEL_30	0.06	0.03	[0.00, 0.13]	0.82
EP_LV04_NOEL_30	0.09	0.09	[0.00, 0.34]	0.80
EP_LV05_NOEL_30	0.23	0.10	[0.01, 0.36]	0.82
EP_LV06_NOEL_30	0.24	0.11	[0.01, 0.39]	0.77

3.6. 矛盾した予測結果 (NOEL \leq 300 で陰性で NOEL \leq 30 で陽性) が出るケースについて

エンドポイントについて、NOEL \leq 300 で陰性で NOEL \leq 30 で陽性という矛盾した予測結果が出るケースがあります。hold-out データにおける矛盾する予測結果の割合は、表 3.6-1 の通りであり、EP_LV03_NOEL や EP_BL01_NOEL で割合が高い傾向にありました。なお、モデルの精度との関係性は見られませんでした。矛盾した予測結果が得られた場合、予測値の信頼性は低いと考えます。

表 3.6-1 hold-out データについて矛盾した予測結果を算出した割合

エンドポイント	矛盾した予測結果の割合
EP_LV01_NOEL	0.86%
EP_LV02_NOEL	1.44%
EP_LV03_NOEL	8.33%

エンドポイント	矛盾した予測結果の割合
EP_LV04_NOEL	0.00%
EP_LV05_NOEL	1.15%
EP_LV06_NOEL	2.01%
EP_BL01_NOEL	13.51%
EP_BL02_NOEL	0.00%
EP_KD01_NOEL	0.00%

4. 体内動態予測モデルの説明

4.1. 化学物質の消化管利用率 F_aF_g 、吸収速度定数 k_a 、分布容積 V_1 および肝代謝固有クリアランス $CL_{h,int}$ の予測モデル

ラット経口投与後の化学物質の体内動態予測に必要となる 4 種のパラメータ（経口投与された化学物質が消化管から血流に移行する化学物質量の割合を示す消化管利用率 F_aF_g 、消化管膜を透過し血流に移行する速度指標である吸収速度定数 k_a 、化学物質の全身循環血から組織への移行の程度を示す分布容積 V_1 、化学物質の肝臓での代謝消失を示す肝代謝固有クリアランス $CL_{h,int}$ ）について機械学習手法による予測モデルを構築しました。

薬物動態試験ガイドライン（平成 3(1991)年 11 月 29 日 薬新薬第 6 号）や OECD TG417 等に基づき実施され、成果が公開された文献等から、372 の化学物質について 4 種のパラメータ値を収集し、これを学習データとしました。収集した 372 の化学物質は、5 万のランダムな化学物質で作成したケミカルスペース（体内動態の CS という）を 5×5 に分割した 25 区画の全てに分布することを確認し、多様性を確保しました（図 4.1-1）。

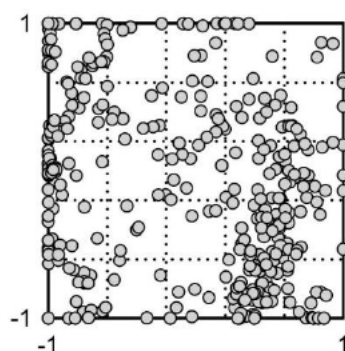


図 4.1-1 学習データとして収集した化学物質のケミカルスペース上での分布
(点線は 5×5 に分割した 25 区画を示す)

各化学物質について化学構造式（SMILES）を入力し、RDKit、Mordred 等のソフトウェアを使用し、各種物理化学記述子を算出しました。約 1,800 の記述子について SFS（Sequential Forward Selection）の手法を用い、 R^2 （決定係数：Coefficient of Determination）を指標として記述子の選択を行い、16～26 の記述子を抽出し、LightGBM を用いた nested cross-validation を実施し予測モデルを構築しました。

いずれのパラメータについても、予測値と実測値の高い相関係数を示しました(表 4.1-1)。

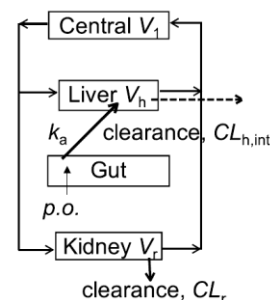
表 4.1-1 各予測モデルの 予測値と実測値の相関

パラメータ	相関係数 r ($n = 372$)	絶対平均予測誤差 AAFE
消化管利用率 F_aF_g 予測モデル	0.86	2.06
吸収速度定数 k_a 予測モデル	0.79	1.65
分布容積 V_1 予測モデル	0.82	1.60
肝代謝固有クリアランス $CL_{h,int}$ 予測モデル	0.97	1.27

4.2. 体内動態 (PBPK) シミュレータ

4 種パラメータ($FaFg$, k_a , V_1 , $CL_{h,int}$)は、下記の数式に代入され、微分方程式演算で 肝臓、血液、腎臓における経時的濃度変化、AUC および C_{max} が算出されます。

$$\begin{aligned} \frac{dX_g}{dt} &= -k_a \cdot X_g \quad \frac{dX_g(t)}{dt} = -k_a \cdot X_g(t) \text{ when at } t = 0, X_g(0) = FaFg \cdot \text{dose} \leftarrow \\ V_h \frac{dC_h}{dt} &= k_a \cdot X_g - \frac{Q_h \cdot C_h \cdot R_b}{K_{p,h}} - CL_{h,int} \cdot \frac{C_h}{K_{p,h}} \cdot f_{u,p} + Q_h \cdot C_b \quad \leftarrow \\ V_1 \frac{dC_b}{dt} &= -(Q_h + Q_r) \cdot C_b + \frac{Q_h \cdot C_h \cdot R_b}{K_{p,h}} + \frac{Q_r \cdot C_r \cdot R_b}{K_{p,r}} \leftarrow \\ V_r \frac{dC_r}{dt} &= Q_r \cdot C_b - \frac{Q_r \cdot C_r \cdot R_b}{K_{p,r}} - CL_r \cdot \frac{C_r}{K_{p,r}} \cdot f_{u,p} \leftarrow \end{aligned}$$



where X_g , Q_h , Q_r , V_h , V_r , C_h , C_r , and C_b are the amount of drug in the gut; the hepatic and renal blood flow rates; the liver and kidney volumes, and the hepatic, renal and blood substrate concentrations, respectively ($V_h=8.5\text{mL}$, $V_r=3.7\text{mL}$, $Q_h = Q_r=0.853\text{L}$). Liver-to-plasma concentration ratio ($K_{p,h}$) and blood-to-plasma concentration ratio (R_b) were calculated from $f_{u,p}$ and $\log P$ values as follows: \leftarrow

$$K_{p,h} = \frac{0.02289 \cdot P + 0.72621}{0.001719 \cdot P + 0.960581} \times \frac{1 - f_{u,p}}{2} \leftarrow$$

where P is the water-octanol partition ratio that was estimated from the computer-calculated $\log P$ as neutral (clogP). \leftarrow

$$R_b = 0.617 \cdot \log \left(\frac{1 - f_{u,p}}{f_{u,p}} \right) + 0.208 \leftarrow$$

The kidney-to-plasma concentration ratios ($K_{p,r}$) were assumed to be the same as the $K_{p,h}$ values. \leftarrow

4.3. 参考資料

- 1) Ke, G.; Meng, Q.; Wang, T.; Chen, W.; Ma, W.; Liu, T.-Y. LightGBM: A Highly Efficient Gradient Boosting Decision Tree. *Adv. Neural Inf. Process. Syst.* **2017**, *30*, 3149
- 2) Zhang, J., Mucs, D., Norinder, U., and Svensson, F. (2019) LightGBM: An Effective and Scalable Algorithm for Prediction of Chemical Toxicity-Application to the Tox21 and Mutagenicity Data Sets. *J. Chem. Inf. Model.* **59**, 4150–4158
- 3) K.Adachi, K. Ohyama, Y.Tanaka, N. Murayama, M. Shimizu, Y. Saito, and H.Yamazaki *Biol. Pharm. Bull.* **47**, 1028–1032 (2024) Regular Article <https://doi.org/10.1248/bpb.b24-00145> Modeled Hepatic/Plasma Exposures of Omeprazole Prescribed Alone in Cytochrome P450 2C19 Poor Metabolizers Are Likely Associated with Hepatic Toxicity Reported in a Japanese Adverse Event Database
- 4) K.Adachi, M.Utsumi, T.Sato, H.Nakano, M.Shimizu, and H. Yamazaki *Biol. Pharm. Bull.* **46**, 1316–1323 (2023) Vol. 46, No. 9 Regular Article Modeled Rat Hepatic and Plasma Concentrations of Chemicals after Virtual Administrations Using Two Sets of in Silico Liver-to-Plasma Partition Coefficients

5. AI-SHIPS *in vitro* 試験とその予測モデル構築

5.1. AI-SHIPS *in vitro* 試験

AI-SHIPS プロジェクトでは、これまでのブラックボックス的な毒性予測からの脱却を目指し、毒性発現の作用機序に関連する様々な化学物質の影響評価試験を行い、これを踏まえた *in vivo* 毒性予測をしています (図 5.1-1)。ここでは、AI-SHIPS プロジェクトで実施した *in vitro* 試験について説明します。

まず肝毒性を対象として、既知の肝毒性情報に基づき肝毒性評価に広く利用されている試験のうち、スループット性が高い試験を選択して、それらを網羅的に実施しました。腎臓に特異的な細胞毒性を評価するために、ラット腎上皮細胞の NRK-52E 細胞を利用した *in vitro* 試験を実施しました。血液毒性に関しては、代謝活性化や酸化ストレスが毒性発現に主に関与していることから、肝毒性の評価のために設定した *in vitro* 試験を利用できると考えました。

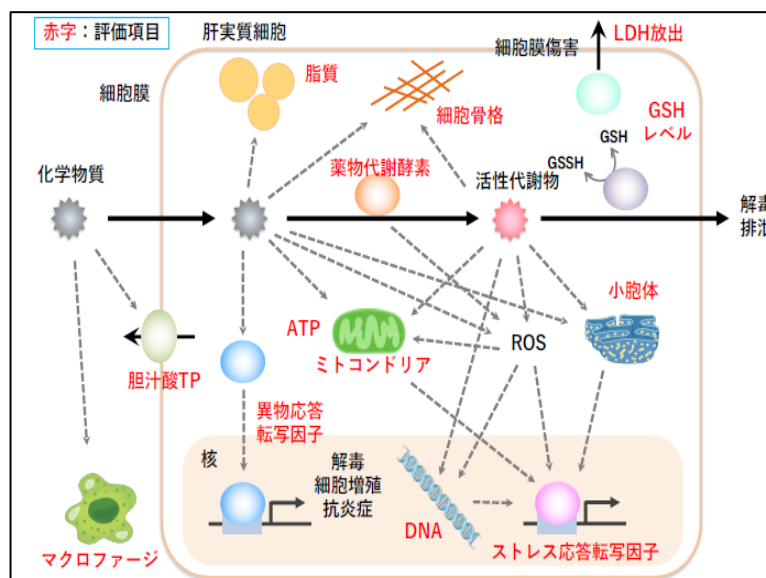


図 5.1-1 AI-SHIPS 統合的毒性予測システムにおける *in vitro* 試験の位置づけ

実施した実験の一覧を表 5.1-1 に示します (再掲)。

表 5.1-1 AI-SHIPS プロジェクトで実施した in vitro 試験一覧 (再掲)

	評価項目	内容	分子・項目	方法の概要
MIE 関連	1 薬物代謝酵素	異物の解毒、代謝活性化に関わる酵素との反応性を評価	● ラットP450 (7分子) ● ヒトP450 (11分子種) ● UGTs (総活性)	組換え酵素と発光基質(P450-Glo/UGT-Gloシステム)を利用した阻害試験 (3濃度)
	2 酸化還元	細胞に対する酸化還元に関する傷害作用を評価	細胞内GSH含量	初代培養ラット肝細胞、HepG2細胞、ラット腎由来NRK-52E細胞を利用した細胞内GSHレベル測定試験 (3濃度)
	3 タンパク質反応性	化学物質の反応性評価	Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)	システイン、リジン誘導体との反応性評価 (1濃度)
	4 胆汁酸トランスポーター	肝毒性発現に関わる胆汁うっ滞影響を評価	● ラットMRP2 ● ラットBSEP	蛍光基質とベンクルを利用した阻害試験 (1濃度)
	5 核内受容体	異物代謝、エネルギー代謝等に関わる受容体への影響を評価	● ラットAHR ● ラット核内受容体 (PPARα, PXR, RXRα, LXRα, FXR)	レポーターアッセイ又は1-ハイブリッドアッセイ (3濃度)
	6 酵素誘導	酵素誘導に関わる誘導体CARへの影響を評価	● ラットCYP2B1, CYP3A1, CYP4A1	初代培養ラット肝細胞mRNAレベル測定 (1濃度)
Key Event 関連	7 細胞小器官	毒性発現に重要なミトコンドリア等の細胞小器官への影響を評価	● 核 ● 細胞質 (F-actin) ● ミトコンドリア ● 中性脂肪 (TG) 蓄積 ● リン脂質 (PL) 蓄積	初代培養ラット肝細胞、HepG2細胞、ラット腎由来NRK-52E細胞を利用した蛍光イメージング (HCA) 解析: 総蛍光強度・面積、平均蛍光強度・面積、スポット数等 (6濃度)
	8 細胞傷害	細胞に対する傷害作用を評価	● LDHアッセイ (細胞死) ● Cell-titerアッセイ (生細胞数)	初代培養ラット肝細胞、HepG2細胞、ラット腎由来NRK-52E細胞を利用した曝露試験 (6濃度)
	9-1 酸化ストレス	細胞ホメオスタシスに関わるストレス応答系への作用を評価	Nrf2	多色発光レポーター導入HepG2細胞を用いた経時的 (72h) 活性評価 (6濃度)
	9-2 炎症ストレス		NF-kB	
	9-3 小胞体ストレス		ATF6	
	9-4 DNA損傷ストレス		p53	
	9-5 低酸素ストレス		HIF1	
	10 非実質細胞 (マクロファージ細胞)	細胞間クロストークによる間接的な肝障害作用・炎症制御を評価	● AP-1/NF-kB転写活性 ● 細胞障害性 (WSTアッセイ)	マウスRAW264.7細胞 (レポーター安定発現細胞) を用いたレポーターアッセイ並びに、傷害性評価 (6濃度)

1 例として、細胞小器官影響評価と、多色リアルタイム発光測定によるストレス応答シグナル伝達解析を紹介します。

初代培養ラット肝細胞、HepG2細胞、ラット腎上皮細胞のNRK-52E細胞を用いて、細胞小器官影響を蛍光イメージング技術に基づくハイコンテンツ解析 (HCA解析) を利用して評価した。この評価では、被験物質暴露後に対象とする細胞小器官と特異的に結合する蛍光色素で細胞を処理し、その蛍光を蛍光顕微鏡プレートリーダーであるCellInsight™ CX5 High-Content Screening (HCS) Platform (Thermo Fisher Scientific) で定量することで、各細胞小器官のサイズや含量の変化を評価する。

本事業では、細胞ごとに確定したプロトコルに従って核をHoechst33342、細胞質 (F-アクチン) をAlexa Fluor 488 Phalloidin、ミトコンドリアをMitoTracker Orange (いずれもThermo Fisher Scientific) で染色し、HCA装置での測定ではチャンネル1 (Ch1) : 核 (波長: 386 nm付近)、チャンネル2 (Ch2) : ミトコンドリア (波長: 549 nm付近)、チャンネル3 (Ch3) : 細胞質 (波長: 485 nm付近) に設定して撮影を行った。

脂質蓄積評価 (中性脂肪、リン脂質) については、細胞ごとに確定したプロトコルに従ってHoechst・LipidTox_neutral混合溶液で染色し、HCA装置での測定ではCh1: 核 (波長: 386 nm付近)、Ch2: 中性脂肪 (波長: 549 nm付近)、Ch3: リン脂質 (波長: 485 nm付近) の設定にて撮影を行った。いずれも、被験物質の濃度は、0、0.3、1.0、3.0、10、30、100 μMとした。

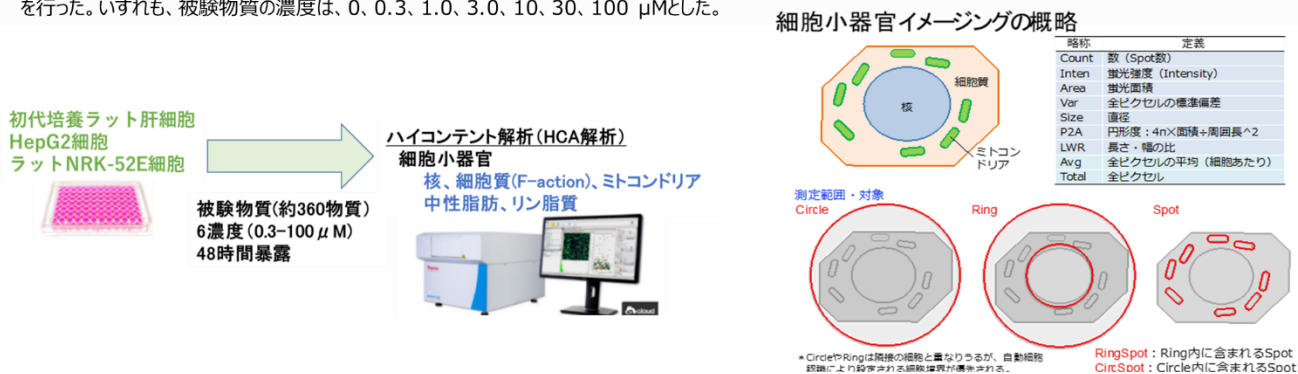


図 5.1-2 細胞小器官影響評価

多色発光レポーター導入HepG2細胞を用い、化学物質が酸化ストレス応答(Nrf2-ARE)、炎症ストレス応答(NF-κB)、小胞体ストレス応答(ATF6-ERSE)、DNA損傷ストレス応答(p53)及び低酸素ストレス応答(H1F1a)のシグナル伝達経路に与える影響をリアルタイム発光測定により解析した。確定したプロトコルに従い、96ウェルプレートにHepG2細胞を播種したのち、陽性対照物質、陰性対照物質、所定濃度(公比1.2~2の6濃度)の化合物に交換し、R62ロングパスフィルター存在下(F2値)および非存在下(F0値)で1ウェルあたり5秒間、約30分間隔で72時間測定した。SLR3およびELucの発光強度はF0およびF2値から右の式により算出した。

算出したELucおよびSLR3の発光値からフーリエ変換解析により装置ノイズを除去した後(図、上段)、溶媒対照の各測定ポイントでの発光強度を100%として補正した被験物質暴露区の相対発光強度を算出した(図、下段)。

ストレス応答経路に及ぼす影響の評価は、被験物質を暴露したHepG2細胞のELucの相対発光強度の積算値(area under the curve、AUC)を細胞生存率とし、溶媒対照および被験物質暴露区のSLR3およびELucの値を用い、次式で算出したfold change値のAUCをストレス応答経路への影響(活性化或いは不活性化)として数値化した(図)。

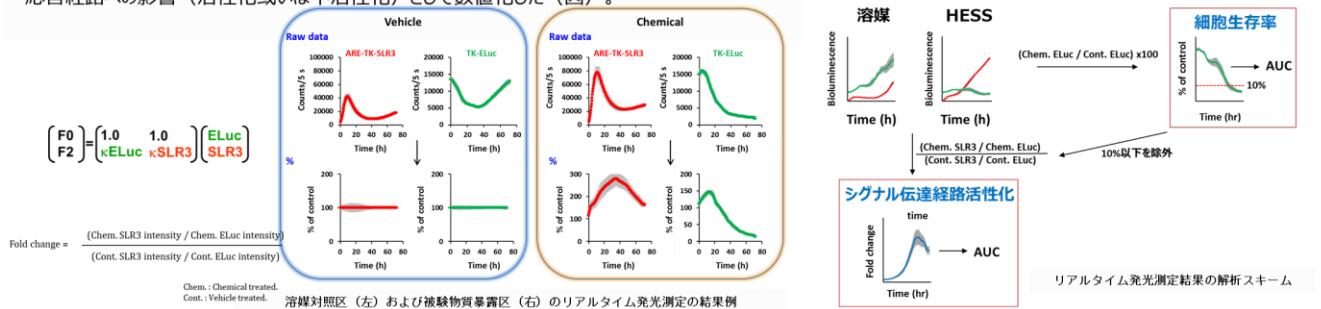
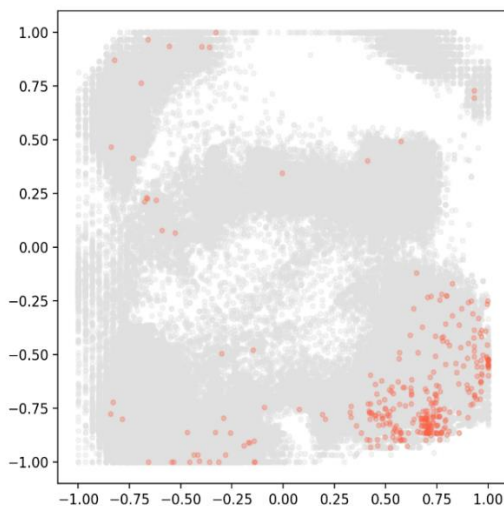


図 5.1-3 多色リアルタイム発光測定によるストレス応答シグナル伝達解析

被験物質は、HESS に収載されているラット 28 日間反復投与毒性試験結果を有する物質の中から、物質の多様性、試薬の入手可能性、実験の実施可能性などを踏まえて 326 物質を選定しました。選定した 326 物質の毒性予測 CS 上における広がりを図 5.1-4 に示します。



灰色：CSを構成した際の10万件の物質

図 5.1-4 AI-SHIPS *in vitro* 試験の被験物質として選択した 326 物質 (赤) の毒性予測 CS における広がり

5.2. 予測モデル化対象の決定

1 つの実験から得られる測定値は複数あります。例えば、ラットのシトクロム P450 の評価 (分子種：CYP1A1) では、ラット P450 分子種 CYP1A1 に対する化学物質の阻害作用を、組換え酵素と発光基質を利用した評価システ

ムを用いて *in vitro* で評価しています。各被験物質の阻害作用は、溶媒対照群の酵素活性を 100%としたときの被験物質存在下における残存活性(%)として算出し、各濃度(0.1、1.0 及び 10 μM の 3 濃度)における阻害作用%を得ました。測定値として、表 5.2-1 に示すように各濃度での阻害作用%が得られましたが、これらの全ての実験値の予測モデルを構築することは現実的ではないため、本評価系については、「各濃度における阻害作用の最大値」を予測モデルの目的関数として採用し、15%以上を陽性として 2 値化したものを学習データとしました。なお、AI-SHIPS では、表 5.2-1 に示す全結果がデータベース化されています。

表 5.2-1 シトクロム P450 阻害の分子種 CYP1A1 についての実験結果項目

項目	説明
P450_r1A1_0.1	ラット CYP1A1 に対する阻害作用% (最大 100、最低 0) (0.1 μM)
P450_r1A1_1	ラット CYP1A1 に対する阻害作用% (最大 100、最低 0) (1.0 μM)
P450_r1A1_10	ラット CYP1A1 に対する阻害作用% (最大 100、最低 0) (10 μM)
P450_r1A1_MAX	ラット CYP1A1 に対する阻害作用% (最大 100、最低 0) (3 濃度の最大値 : MAX 関数で算出)
P450_r1A1_AUC	ラット CYP1A1 に対する阻害作用% (最大 100、最低 0) (3 濃度の積算値 : SUM 関数を使用 : SUM 関数を使用)

核、ミトコンドリア、細胞骨格を対象とした HCA 評価では、核、ミトコンドリア、細胞骨格のサイズ、面積、蛍光強度など 38 の測定項目について、6 濃度での測定値(38×6 の測定結果)が得られていましたが、NOEC 値 (影響の出なかった最大の濃度)を算出し、陽性 (NOEC 値 < 100)、陰性 (NOEC 値 = 100) の分布と器官のバランスを考慮しつつ独立性の高い 15 個を選定しました。

以上のように、各 *in vitro* 実験からは複数の測定結果が得られますが、測定結果の本質を損なわない範囲でパラメータ数を絞り込み、最終的に、表 5.2-2 に示す 95 のパラメータについて、予測モデルを構築しました。

表 5.2-2 AI-SHIPS *in vitro* 予測モデルのモデル名と予測対象

No.	モデル名	予測対象
1	rCYP1A1-A1	ラットのシトクロム P450(分子種 : CYP1A1)に対する化学物質の阻害作用
2	rCYP1A2-A1	ラットのシトクロム P450(分子種 : CYP1A2)に対する化学物質の阻害作用
3	rCYP2B1-A1	ラットのシトクロム P450(分子種 : CYP2B1)に対する化学物質の阻害作用
4	rCYP2C6-A1	ラットのシトクロム P450(分子種 : CYP2C6)に対する化学物質の阻害作用
5	rCYP2D1-A1	ラットのシトクロム P450(分子種 : CYP2D1)に対する化学物質の阻害作用
6	rCYP2E1-A1	ラットのシトクロム P450(分子種 : CYP2E1)に対する化学物質の阻害作用
7	rCYP3A2-A1	ラットのシトクロム P450(分子種 : CYP3A2)に対する化学物質の阻害作用
8	rUGT-A1	ラットのグルクロン酸転移酵素に対する化学物質の阻害作用
9	rMRP2-A1	ラット MRP2 に対する化学物質の阻害作用
10	rBSEP-A1	ラット BSEP に対する化学物質の阻害作用
11	ADRA-A1	タンパク質と化学物質の結合反応を評価する Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA : アミノ酸誘導体結合性試験)
12	rAHR-A1	核内受容体 (ラット AHR) 活性化作用
13	rPXR-A1	核内受容体 (ラット FXR) 活性化作用

No.	モデル名	予測対象
14	rPPARA-A1	核内受容体 (ラット LXRα) 活性化作用
15	rRXRA-A1	核内受容体 (ラット PPARα) 活性化作用
16	rLXRA-A1	核内受容体 (ラット PXR) 活性化作用
17	rFXR-A1	核内受容体 (ラット PXRα) 活性化作用
18	CYP2B1mRNA-A1	核内受容体 CAR 活性化作用評価のための CAR 標的遺伝子の mRNA 発現レベル (CYP2B1)
19	CYP3A1mRNA-A1	核内受容体 CAR 活性化作用評価のための CAR 標的遺伝子の mRNA 発現レベル (CYP3A1)
20	CYP4A1mRNA-A1	核内受容体 CAR 活性化作用評価のための CAR 標的遺伝子の mRNA 発現レベル (CYP4A1)
21	2B1_3A1_ratio-A1	核内受容体 CAR 活性化作用評価のための CAR 標的遺伝子の mRNA 発現レベル (CYP2B1 相対発現レベル(1))
22	2B1_3A1_4A1_ratio-A1	核内受容体 CAR 活性化作用評価のための CAR 標的遺伝子の mRNA 発現レベル (CYP2B1 相対発現レベル(2))
23	HCArkFact-A1	HCA(細胞骨格：細胞質内総蛍光強度) (ラット初代培養肝細胞)
24	HCArkFact-A2	HCA(細胞骨格：細胞内総蛍光強度)(ラット初代培養肝細胞)
25	HCArkMit-A1	HCA(ミトコンドリア：細胞質内平均蛍光強度)(ラット NRK-52E 細胞)
26	HCArkMit-A2	HCA(ミトコンドリア：細胞内平均蛍光強度)(ラット NRK-52E 細胞)
27	HCArkNuc-A1	HCA(核：核の面積)(ラット NRK-52E 細胞)
28	HCArkNuc-A2	HCA(核：核の直径)(ラット NRK-52E 細胞)
29	HCAPL-A1	HCA(リン脂質：細胞内総蛍光強度)(HepG2 細胞)
30	HCAPL-A2	HCA(リン脂質：細胞質内総蛍光強度)(HepG2 細胞)
31	HCAPL-A3	HCA(リン脂質：細胞内総蛍光強度)(ラット初代培養肝細胞)
32	HCAPL-A4	HCA(リン脂質：細胞質内総蛍光強度)(ラット初代培養肝細胞)
33	HCATG-A1	HCA(中性脂肪：細胞内総蛍光強度)(HepG2 細胞)
34	HCATG-A2	HCA(中性脂肪：細胞質内総蛍光強度)(HepG2 細胞)
35	kLDH-A1	LDH アッセイを用いた細胞障害性 (ラット NRK-52E 細胞)
36	kATP-A1	CellTiter アッセイを用いた細胞障害性 (ラット NRK-52E 細胞)
37	GSH-A1	GSH 含量変化(HepG2 細胞)
38	GSH-A2	GSH 含量変化(ラット初代培養肝細胞)
39	GSH-A3	GSH 含量変化(ラット NRK-52E 細胞)
40	HCAhFact-A1	HCA(細胞骨格：細胞質内総蛍光強度) (HepG2 細胞)
41	HCAhFact-A2	HCA(細胞骨格：細胞質内平均蛍光強度) (HepG2 細胞)
42	HCAhFact-A3	HCA(細胞骨格：細胞質内スポットの数) (HepG2 細胞)
43	HCAhFact-A4	HCA(細胞骨格：細胞質内スポットの平均面積) (HepG2 細胞)
44	HCArFact-A1	HCA(細胞骨格：細胞内総蛍光強度) (ラット初代培養肝細胞)
45	HCArFact-A2	HCA(細胞骨格：細胞質内スポットの平均蛍光強度) (ラット初代培養肝細胞)
46	HCArFact-A3	HCA(細胞骨格：細胞質内スポットの総面積) (ラット初代培養肝細胞)
47	HCArFact-A4	HCA(細胞骨格：細胞質内スポットの数) (ラット初代培養肝細胞)
48	HCArFact-A5	HCA(細胞骨格：細胞内スポットの総蛍光強度) (ラット初代培養肝細胞)
49	HCArFact-A6	HCA(細胞骨格：細胞内スポットの総面積) (ラット初代培養肝細胞)
50	HCArFact-A7	HCA(細胞骨格：細胞内スポットの平均面積) (ラット初代培養肝細胞)

No.	モデル名	予測対象
51	HCArFact-A8	HCA(細胞骨格:細胞質内スポットの平均面積)(ラット初代培養肝細胞)
52	HCAhMit-A1	HCA(ミトコンドリア:細胞質内総蛍光強度)(HepG2 細胞)
53	HCAhMit-A2	HCA(ミトコンドリア:細胞質内平均蛍光強度)(HepG2 細胞)
54	HCAhMit-A4	HCA(ミトコンドリア:細胞質内スポットの総面積)(HepG2 細胞)
55	HCAhMit-A5	HCA(ミトコンドリア:細胞質内スポットの数)(HepG2 細胞)
56	HCAhMit-A6	HCA(ミトコンドリア:細胞内スポットの平均面積)(HepG2 細胞)
57	HCArMit-A1	HCA(ミトコンドリア:細胞内総蛍光強度)(ラット初代培養肝細胞)
58	HCArMit-A2	HCA(ミトコンドリア:細胞質内スポットの総蛍光強度)(ラット初代培養肝細胞)
59	HCArMit-A3	HCA(ミトコンドリア:細胞内スポットの平均面積)(ラット初代培養肝細胞)
60	HCArMit-A4	HCA(ミトコンドリア:細胞内スポットの数)(ラット初代培養肝細胞)
61	HCAhNuc-A1	HCA(核:核の数)(HepG2 細胞)
62	HCAhNuc-A2	HCA(核:核の蛍光強度の標準偏差)(HepG2 細胞)
63	HCAhNuc-A3	HCA(核:核の面積)(HepG2 細胞)
64	HCArNuc-A1	HCA(核:核の数)(ラット初代培養肝細胞)
65	HCArNuc-A2	HCA(核:核の面積)(ラット初代培養肝細胞)
66	HCArNuc-A3	HCA(核:核の総蛍光強度)(ラット初代培養肝細胞)
67	hLDH-A1	LDH アッセイを用いた細胞障害性(HepG2 細胞)
68	rLDH-A1	LDH アッセイを用いた細胞障害性(ラット初代培養肝細胞)
69	hATP-A1	CellTiter アッセイを用いた細胞障害性(HepG2 細胞)
70	rATP-A1	CellTiter アッセイを用いた細胞障害性(ラット初代培養肝細胞)
71	NRF2-A1	Keap1-Nrf2 経路の酸化ストレス応答(1)
72	NRF2-A2	Keap1-Nrf2 経路の酸化ストレス応答(2)
73	NRF2-A4	Keap1-Nrf2 経路の酸化ストレス応答(3)
74	TP53-A1	DNA 損傷応答経路(p53 経路)に対する影響(1)
75	TP53-A2	DNA 損傷応答経路(p53 経路)に対する影響(2)
76	TP53-A4	DNA 損傷応答経路(p53 経路)に対する影響(1)
77	NFKB-A1	炎症応答シグナル伝達(nuclear factor- κ B(NF- κ B)経路)に対する影響(1)
78	NFKB-A2	炎症応答シグナル伝達(nuclear factor- κ B(NF- κ B)経路)に対する影響(2)
79	NFKB-A4	炎症応答シグナル伝達(nuclear factor- κ B(NF- κ B)経路)に対する影響(3)
80	ATF6-A1	小胞体ストレス応答経路(activating transcription factor 6(ATF6)-endoplasmic reticulum stress element(ERSE)経路)に対する影響(1)
81	ATF6-A2	小胞体ストレス応答経路(activating transcription factor 6(ATF6)-endoplasmic reticulum stress element(ERSE)経路)に対する影響(2)
82	ATF6-A4	小胞体ストレス応答経路(activating transcription factor 6(ATF6)-endoplasmic reticulum stress element(ERSE)経路)に対する影響(3)
83	HIF-A1	低酸素ストレス応答シグナル伝達(hypoxia-inducible factor1(HIF1)経路)に対する影響(1)
84	HIF-A2	低酸素ストレス応答シグナル伝達(hypoxia-inducible factor1(HIF1)経路)に対する影響(2)
85	HIF-A3	低酸素ストレス応答シグナル伝達(hypoxia-inducible factor1(HIF1)経路)に対する影響(3)
86	HIF-A4	低酸素ストレス応答シグナル伝達(hypoxia-inducible factor1(HIF1)経路)に対する影響(4)
87	ELUCatf6-A1	細胞毒性(1)
88	ELUCatf6-A2	細胞毒性(2)
89	ELUCatf6-A3	細胞毒性(3)

No.	モデル名	予測対象
90	ELUCatf6-A4	細胞毒性(4)
91	NFKBAP1-A2	炎症シグナルの活性化評価(1)
92	NFKBAP1-A4	炎症シグナルの活性化評価(2)
93	NFKBAP1-A3	炎症シグナルの活性化評価(3)
94	mWST-A1	細胞毒性(1)
95	mWST-A2	細胞毒性(2)

5.3. 予測モデルの構築と精度評価結果

95 のパラメータについて、2 値分類モデルを構築しました。概要を表 5.3-1 に、構築したモデルの精度評価結果を図 5.3-1 に示します。詳細は、QMRf（モデルの説明書、7 参照）を参照ください。

AI-SHIPS *in vivo* 毒性予測モデルでは、これらのモデルで算出された予測値を記述子として用いています。

表 5.3-1 AI-SHIPS *in vitro* 予測モデルのモデル構築の概要

予測対象	<i>in vitro</i> 実験パラメータ (95 パラメータ) ※構築数は 103 であるが、このうち BA>0.65 を満たした 95 モデルを AI-SHIPS <i>in vivo</i> 毒性予測モデル構築に使用
モデル種	2 値分類モデル 2 値化の閾値は、試験系ごとに評価内容ならびに陽性/陰性のデータ数のバランスを踏まえて決定した。
説明変数	MIE 関連の <i>in vitro</i> 実験予測モデル： Mordred 記述子 KE 関連の <i>in vitro</i> 実験予測モデル： Mordred 記述子と Tox21 の MIE 予測値 (一部のモデルは、MorganFingerPrint も使用)
学習データ	<i>in vitro</i> 実験値が取得できた 326 データ (最終モデルは、外部評価のための 32 物質も含めた 358 データで学習したもの)
モデル手法	XGBoost、Random forest、LightGBM など (モデル毎に異なる。複数の手法で試し最も精度が良かった手法を採用したモデルもある)

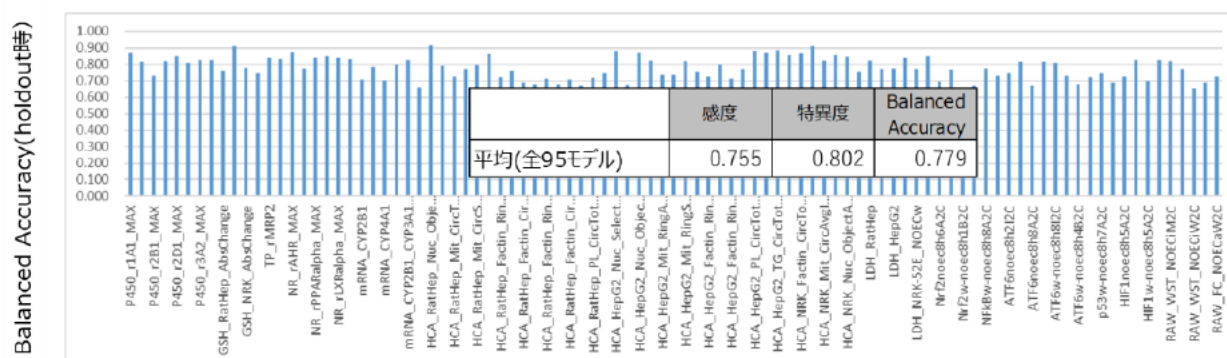


図 5.3-1 AI-SHIPS *in vitro* 予測モデルの精度評価結果

6. AI-SHIPS Tox21 *in vitro* 試験とその予測モデル構築

6.1. 予測対象

前章に示した AI-SHIPS *in vitro* 試験と同様に、毒性発現の作用機序に関連する様々な化学物質の影響評価試験の結果を踏まえた毒性予測を行う目的で、Tox21 プロジェクトで実施された 59 種の化学物質の影響を評価する *in vitro* 試験を利用しました。

Tox21 の *in vitro* 試験の一覧を表 6.1-1 に示します。1 つの Tox21 の *in vitro* 試験に対して、閾値の異なる 2 種の判別モデルを構築しました。モデル名の末尾が“L”のモデルは、活性化スコアが 1 以上を陽性として 2 値化、モデル名の末尾が“H”のモデルは、活性化スコアが 40 以上を陽性として 2 値化しています。

表 6.1-1 AI-SHIPS TOX21 *in vitro* 試験一覧

予測対象	判別閾値	モデル名	備考
ヒト HEK293T 細胞での ATAD5 安定化作用（遺伝毒性）評価（PubChem AID 720516）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	ATAD5-T1L	
	（判別閾値=40）	ATAD5-T1H	
ヒト結腸腺癌由来 HCT-116 細胞を用いたレポーターアッセイでのヒト p53 活性化（PubChem AID 720552）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	TP53-T1L	
	（判別閾値=40）	TP53-T1H	
HepG2 細胞と Mito-MPS 色素を用いたミトコンドリア膜電位障害評価（PubChem AID 720637）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	MMP-T1L	
	（判別閾値=40）	MMP-T1H	
HeLa 細胞とグルココルチコイド応答配列レポーターを用いた GR アゴニスト作用（PubChem AID 720719）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	GR-T1L	
	（判別閾値=40）	GR-T1H	
HeLa 細胞とグルココルチコイド応答配列レポーターを用いた GR アンタゴニスト作用（PubChem AID 720725）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	GR-T2L	
	（判別閾値=40）	GR-T2H	
ラット AR リガンド結合領域の one-hybrid アッセイでのラット AR アゴニスト作用（PubChem AID 743053）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	AR-T2L	
	（判別閾値=40）	AR-T2H	
MDA-kb2 細胞と MMTV レポーターを用いた、アゴニスト R1881 存在下でのヒト AR アンタゴニスト作用（PubChem AID 743054）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	AR-T3L	
	（判別閾値=40）	AR-T3H	
ラット AR リガンド結合領域の one-hybrid アッセイでのアゴニスト R1881 存在下でのラット AR アンタゴニスト作用（PubChem AID 743063）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	AR-T4L	
	（判別閾値=40）	AR-T4H	
TR 応答配列支配下ルシフェラーゼを安定的に発現するラット下垂体腫瘍由来 GH3 細胞を用いたレポーターアッセイにおけるラット TR アゴニスト作用（PubChem AID 743067）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	THR-T1L	
	（判別閾値=40）	THR-T1H	*
ヒト ERα リガンド結合領域の one-hybrid アッセイでのヒト ERα アゴニスト作用（PubChem AID 743077）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	ERA-T2L	
	（判別閾値=40）	ERA-T2H	
ヒト ERα リガンド結合領域の one-hybrid アッセイを用いた 17β-E2 存在下でのヒト ERα アンタゴニスト作用（PubChem AID 743078）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	ERA-T4L	
	（判別閾値=40）	ERA-T4H	
内因性ヒト ERα を発現する BG1 細胞とエストロゲン応答レポーター遺伝子を用いた、17β-E2 存在下でのヒト ERα アンタゴニスト作用（PubChem AID 743091）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	ERA-T3L	
	（判別閾値=40）	ERA-T3H	*
HepG2 細胞を用いたレポーターアッセイによるヒト AHR 活性化作用（PubChem AID 743122）のアッセイの活性化スコア	（判別閾値=1）	hAHR-T1L	
	（判別閾値=40）	hAHR-T1H	

予測対象	判別閾値	モデル名	備考
ER 応答配列支配下ルシフェラーゼ遺伝子を安定的に発現するヒト乳がん由来 MCF-7 細胞株を用いたレポーターアッセイにおける 0.5 nM testosterone 存在下での間接的な CYP19 活性阻害評価 (PubChem AID 743139) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	CYP19-T1L	
	(判別閾値=40)	CYP19-T1H	
ヒト PPAR γ リガンド結合領域の HEK293H 細胞における one-hybrid アッセイでのヒト PPAR γ 活性化 (PubChem AID 743140) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	PPARG-T1L	
	(判別閾値=40)	PPARG-T1H	
ヒト PPAR γ リガンド結合領域の HEK293H 細胞における one-hybrid アッセイでのヒト PPAR γ アンタゴニスト作用 (PubChem AID 743199) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	PPARG-T2L	
	(判別閾値=40)	PPARG-T2H	*
抗酸化物質応答配列支配下にある β ラクタマーゼレポーター遺伝子を安定的に発現する HepG2 細胞を用いたレポーターアッセイによるヒト Nrf2 活性化 (PubChem AID 743219) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	NRF2-T1L	
	(判別閾値=40)	NRF2-T1H	*
ヒト PPAR δ リガンド結合領域の HEK293H 細胞を用いた one-hybrid アッセイでのヒト PPAR δ アンタゴニスト作用 (PubChem AID 743226) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	PPARD-T2L	
	(判別閾値=40)	PPARD-T2H	*
ヒト PPAR δ リガンド結合領域の HEK293H 細胞を用いた one-hybrid アッセイでのヒト PPAR δ 活性化 (PubChem AID 743227) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	PPARD-T1L	
	(判別閾値=40)	PPARD-T1H	*
HeLa 細胞と熱ショック応答配列を用いたレポーターアッセイでの転写活性 (熱ショックストレスシグナル活性化作用) (PubChem AID 743228) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	HSR-T1L	
	(判別閾値=40)	HSR-T1H	
ヒト FXR リガンド結合領域の HEK293T 細胞を用いた one-hybrid アッセイでのヒト FXR 活性化 (PubChem AID 743239) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	hFXR-T1L	
	(判別閾値=40)	hFXR-T1H	
ヒト FXR リガンド結合領域の HEK293T 細胞を用いた one-hybrid アッセイでのヒト FXR アンタゴニスト作用 (PubChem AID 743240) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	hFXR-T2L	
	(判別閾値=40)	hFXR-T2H	*
ヒト VDR リガンド結合領域と GAL4-DNA 結合領域の融合タンパク質を用いた HEK293T 細胞における one-hybrid アッセイにおける 3 nM 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 存在下でのヒト VDR アンタゴニスト作用 (PubChem AID 743241) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	VDR-T1L	
	(判別閾値=40)	VDR-T1H	
ヒト VDR リガンド結合領域と GAL4-DNA 結合領域の融合タンパク質を用いた HEK293T 細胞における one-hybrid アッセイにおけるヒト VDR アゴニスト作用 (PubChem AID 743242) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	VDR-T2L	
	(判別閾値=40)	VDR-T2H	*
ME-180 細胞細胞を用いたレポーターアッセイでの NF-kB 活性化 (PubChem AID 1159518) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	NFKB-T1L	
	(判別閾値=40)	NFKB-T1H	*
ヒト子宮頸がん HeLa 細胞における小胞体ストレス応答配列支配下の β -ラクタマーゼ遺伝子のレポーターアッセイによる小胞体ストレスの評価 (PubChem AID 1159519) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	ESRE-T1L	
	(判別閾値=40)	ESRE-T1H	
Tet-on システムにより ROR γ を発現する CHO-1 細胞と ROR 応答配列支配下のルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイにおける ROR γ 活性化作用 (PubChem AID 1159523) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	RORG-T1L	
	(判別閾値=40)	RORG-T1H	*
ME-180 細胞細胞を用いたレポーターアッセイでの AP-1 活性化 (PubChem AID 1159528) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	AP1-T1L	
	(判別閾値=40)	AP1-T1H	
ヒト RXR α のリガンド結合領域を用いた one-hybrid assay でのヒト RXR α 活性化 (PubChem AID 1159531) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	hRXRA-T1L	
	(判別閾値=40)	hRXRA-T1H	*

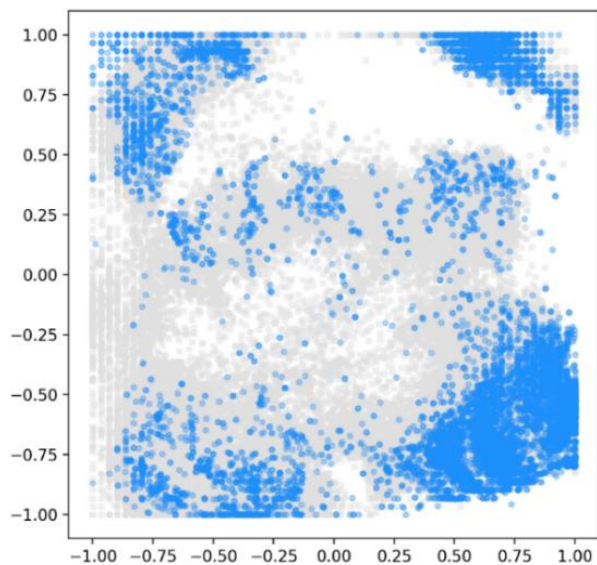
予測対象	判別閾値	モデル名	備考
RAR 応答配列下ルシフェラーゼを安定発現する C3RL4 細胞を用いたレポーターアッセイにおける 1 μ M retinol 存在下での RAR アゴニスト作用 (PubChem AID 1159555) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	RAR-T1L	*
	(判別閾値=40)	RAR-T1H	
ヒト CAR と CAR 応答配列レポーターを発現する HepG2 細胞でのヒト CAR 活性化 (PubChem AID 1224892) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	hCAR-T1L	
	(判別閾値=40)	hCAR-T1H	
ヒト CAR と CAR 応答配列レポーターを発現する HepG2 細胞でのヒト CAR 抑制作用 (PubChem AID 1224893) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	hCAR-T2L	
	(判別閾値=40)	hCAR-T2H	
ヒト子宮頸がん ME-180 細胞と低酸素応答配列を用いたレポーターアッセイでの転写活性 (HIF-1 活性化作用) (PubChem AID 1224894) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	HIF1-T1L	
	(判別閾値=40)	HIF1-T1H	
ヒト TSHR 発現 HEK293 細胞の細胞内 cAMP レベル測定による TSHR アゴニスト作用 (activity score 値) (PubChem AID 1224895) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	TSHR-T1L	
	(判別閾値=40)	TSHR-T1H	*
CHO-K1 細胞でのヒストンバリアント H2AX の Ser139 のリン酸化評価 (DNA 損傷評価) (PubChem AID 1224896) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	H2AX-T1L	
	(判別閾値=40)	H2AX-T1H	
MDA-kb2 細胞と MMTV レポーターを用いた AR アゴニスト R1881 存在下におけるヒト AR アンタゴニスト作用 (PubChem AID 1259247) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	AR-T5L	
	(判別閾値=40)	AR-T5H	
内因性ヒト ER α を発現する BG1 細胞とエストロゲン応答レポーター遺伝子を用いた、17 β -E2 (0.1 nM) 存在下でのヒト ER α アンタゴニスト作用 (PubChem AID 1259248) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	ERA-T5L	
	(判別閾値=40)	ERA-T5H	
MMTV プロモーター支配下のルシフェラーゼ遺伝子を安定発現する MDA-kb2 細胞を用いたレポーターアッセイにおけるアンタゴニスト Nilutamide (3 μ M) 存在下でのヒト AR アゴニスト作用 (PubChem AID 1259387) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	AR-T1L	
	(判別閾値=40)	AR-T1H	
ヒト結腸腺癌由来 HCT-116 細胞における HDAC 阻害 (PubChem AID 1259388) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	HDAC-T1L	
	(判別閾値=40)	HDAC-T1H	
GLI1 応答配列用いたレポーターアッセイでの SHH/GLI1 シグナル活性化 (PubChem AID 1259390) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	SHH-T1L	
	(判別閾値=40)	SHH-T1H	*
エストロゲン応答レポーター遺伝子を安定発現する BG1 細胞を用いた、アンタゴニスト ICI-182,780 (10 nM) 存在下でのヒト ER α アゴニスト作用 (PubChem AID 1259391) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	ERA-T1L	
	(判別閾値=40)	ERA-T1H	
GLI1 応答配列用いたレポーターアッセイでの SHH/GLI1 シグナル不活性化 (PubChem AID 1259392) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	SHH-T2L	
	(判別閾値=40)	SHH-T2H	
HEK293 細胞の細胞内 cAMP レベル変動 (PubChem AID 1259393) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	TSHR-T2L	
	(判別閾値=40)	TSHR-T2H	
ヒト ER β のリガンド結合領域と GAL4-DNA 結合領域の融合タンパク質を用いた HEK293T 細胞における one-hybrid アッセイでのヒト ER β アゴニスト作用 (PubChem AID 1259394) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	ERB-T1L	
	(判別閾値=40)	ERB-T1H	
ヒト TSHR 発現 HEK293 細胞の細胞内 cAMP レベル測定による TSHR アンタゴニスト作用 (PubChem AID 1259395) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	TSHR-T3L	
	(判別閾値=40)	TSHR-T3H	*
ヒト ER β のリガンド結合領域と GAL4-DNA 結合領域の融合タンパク質を用いた HEK293T 細胞における one-hybrid アッセイにおける 1 nM E2 存在下での ER β アンタゴニスト作用 (PubChem AID 1259396) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	ERB-T2L	
	(判別閾値=40)	ERB-T2H	

予測対象	判別閾値	モデル名	備考
内因性ヒト ERRα と外来性 PGC-1α を発現する細胞と ERR 応答配列レポーターを用いたヒト ERRα 抑制作用 (PubChem AID 1259401) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	ERR-T4L	
	(判別閾値=40)	ERR-T4H	*
内因性ヒト ERRα と外来性 PGC-1α を発現する細胞と ERR 応答配列レポーターを用いたヒト ERRα 活性化作用 (PubChem AID 1259402) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	ERR-T3L	
	(判別閾値=40)	ERR-T3H	
内因性ヒト ERRα を発現する細胞と ERR 応答配列レポーターを用いたヒト ERRα 抑制作用 (PubChem AID 1259403) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	ERR-T2L	
	(判別閾値=40)	ERR-T2H	*
内因性ヒト ERRα を発現する細胞と ERR 応答配列レポーターを用いたヒト ERRα 活性化作用 (PubChem AID 1259404) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	ERR-T1L	
	(判別閾値=40)	ERR-T1H	
ヒト TRHR 発現細胞の細胞内 Ca ²⁺ レベル測定による TRHR アゴニスト作用 (PubChem AID 1347030) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	TRHR-T1L	
	(判別閾値=40)	TRHR-T1H	
ヒト PR リガンド結合領域の one-hybrid アッセイでの 1nM promegestone (R5020) 存在下でのヒト PR アンタゴニスト作用 (PubChem AID 1347031) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	PR-T2L	
	(判別閾値=40)	PR-T2H	
Smad 応答配列を用いたレポーターアッセイでの TGFβ シグナル不活性化 (PubChem AID 1347032) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	TGFB-T2L	
	(判別閾値=40)	TGFB-T2H	
HepG2 細胞と CYP3A4 応答配列を用いたレポーターアッセイでのヒト PXR 活性化 (PubChem AID 1347033) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	hPXR-T1L	
	(判別閾値=40)	hPXR-T1H	
HepG2 細胞でのアポトーシス誘導評価 (caspase 3/7 活性化) (PubChem AID 1347034) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	CASP-T1L	
	(判別閾値=40)	CASP-T1H	
Smad 応答配列を用いたレポーターアッセイでの TGFβ シグナル活性化 (PubChem AID 1347035) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	TGFB-T1L	
	(判別閾値=40)	TGFB-T1H	
ヒト PR リガンド結合領域の one-hybrid アッセイでのヒト PR アゴニスト作用 (PubChem AID 1347036) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	PR-T1L	
	(判別閾値=40)	PR-T1H	
CHOK1 細胞でのアポトーシス誘導評価 (caspase 3/7 活性化) (PubChem AID 1347037) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	CASP-T2L	
	(判別閾値=40)	CASP-T2H	
ヒト TRHR 発現細胞の細胞内 Ca ²⁺ レベル測定による TRHR アンタゴニスト作用 (PubChem AID 1347038) のアッセイの活性化スコア	(判別閾値=1)	TRHR-T2L	
	(判別閾値=40)	TRHR-T2H	

備考に「*」を記載しているモデルは、*in vivo* 毒性予測モデルの記述子に用いていない (AI-SHIPS *in vitro* 試験予測モデルの記述子には使用)。

6.2. 学習データとモデル化手法

学習データは、TOX21 から提供されている約 10,000 化学物質の MIE 活性スコアです。これらの物質の毒性予測 CS における広がりの様子を図 6.2-1 に示します。



灰色：CSを構成した際の10万件の物質

図 6.2-1 Tox21 *in vitro* 試験予測モデルの学習データとした約 10,000 物質（青）の毒性予測 CS における広がり

エンドポイント毎に、約 10,000 化学物質のデータをモデル構築のための学習用データとモデル性能評価のための検証用データに分け（7:3 の割合）、Random forest 及び勾配ブースティングでモデル化を行い、hold-out 評価の高いモデルを選択しました。記述子は、mordred 記述子 1,825 種類(2D 記述子が 1613 種、3D 記述子が 212 種)のうち、モデル構築に利用し得ない記述子を除外して用いました。Hold-outした物質の精度は、平均 AUC として 0.826(閾値 1)、0.867(閾値 40)を達成しました(図 6.2-2)。詳細は QMRF (モデルの説明書、7 参照)を参照ください。

AI-SHIPS *in vivo* 毒性予測モデルでは、これらのモデルで算出された予測値を記述子として用いています。

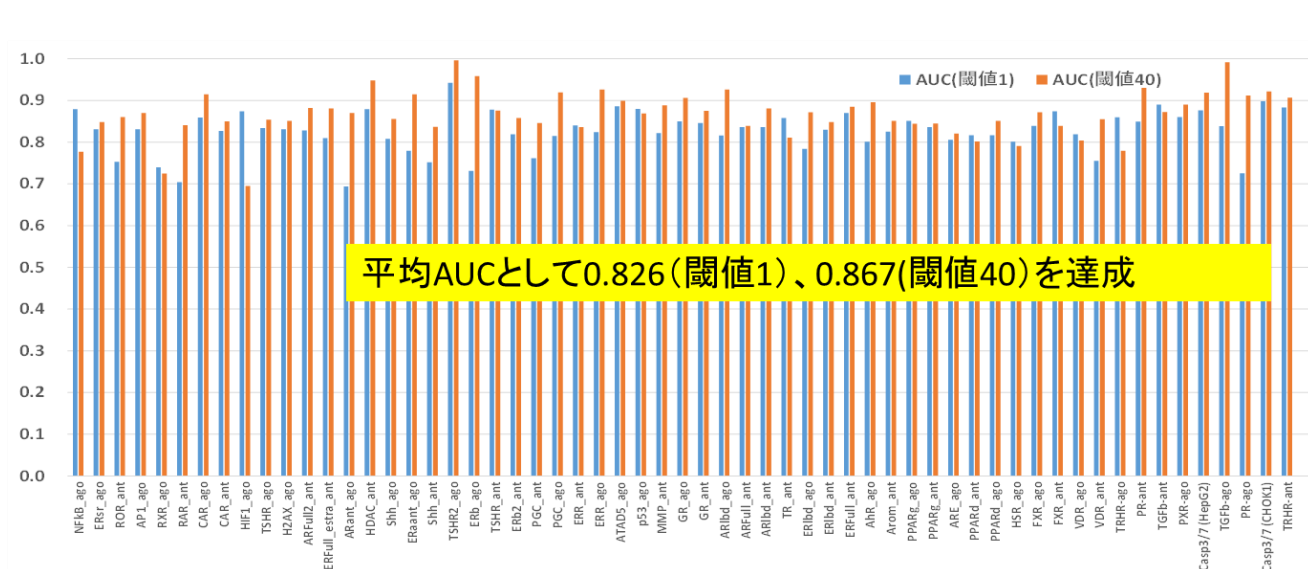


図 6.2-2 Tox21 *in vitro* 試験予測モデルの精度評価結果

7. その他の情報

各予測モデルの QMRF（定量的構造活性相関モデル報告形式にしたがって記載したモデルの説明書）は経済産業省 Web サイトにて順次公開いたします。各 QMRF に付属のエクセルファイルには全学習データや記述子、重要度、ハイパーパラメータの値などが記載されていますのでご参照ください。

8. おわりに

AI-SHIPS 統合的毒性予測システムは、2017 年度から 5 年間をかけて実施された経済産業省の委託事業の中で開発されました。

委託元	経済産業省
事業名	省エネ型電子デバイス材料の評価技術の開発事業（機能性材料の社会実装を支える高速・高効率な安全性評価技術の開発）
実施期間	2017 年度～2021 年度
実施体制	国立大学法人 東京大学(2021 年度から奈良先端科学技術大学院大学) (プロジェクトリーダー：船津 公人) みずほ情報総研株式会社 (2021 年度からみずほリサーチ&テクノロジーズ株式会社) 学校法人 昭和薬科大学 静岡県公立大学法人 静岡県立大学 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 学校法人 明治薬科大学 一般財団法人 化学物質評価研究機構 公立大学法人 名古屋市立大学 株式会社 システム計画研究所