

資料5 補足資料

令和元年12月26日
経済産業省 化学物質管理課

研究開発項目

① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(a) 薬物動態モデル等を活用した化学物質の体内動態評価技術の開発

(b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

- － ア. 薬物代謝酵素
- － イ. 胆汁酸トランスポーター
- － ウ. 核内受容体
- － エ. 肝細胞傷害
- － オ. 細胞小器官
- － カ. 細胞ストレス応答
- － キ. 非実質細胞(マクロファージ細胞)
- － ク. 遺伝子発現

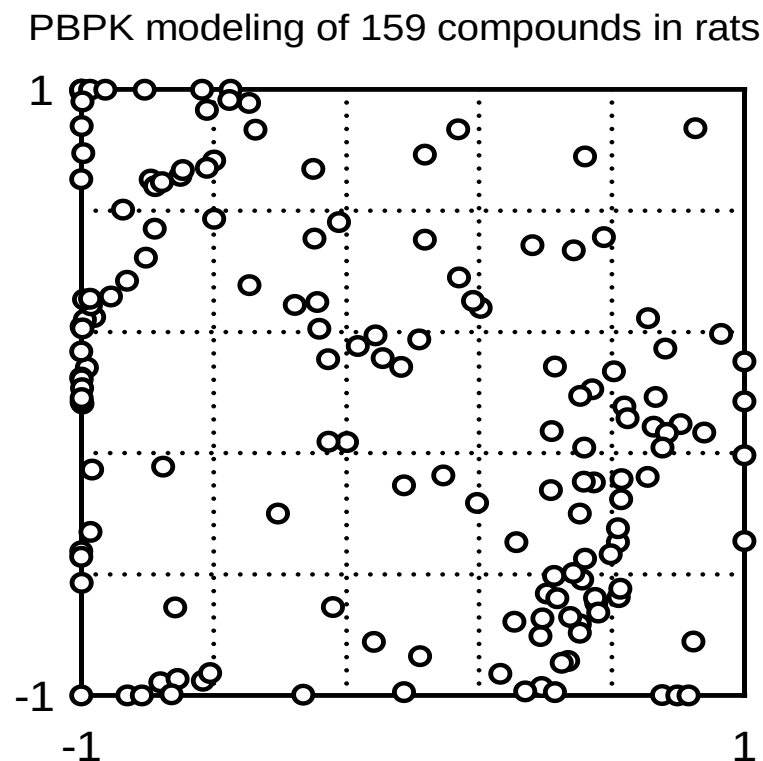
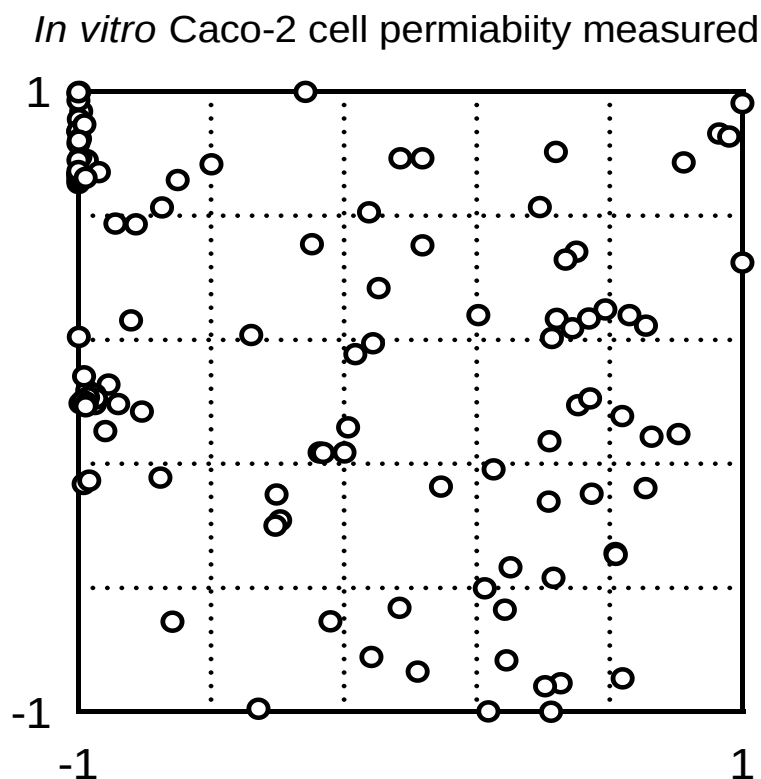
② 人工知能を活用した予測モデルの開発(生体レベルでの毒性評価・予測を実現する情報技術の開発)

- － ア. 肝毒性の6つのエンドポイントを対象としたプロトタイプシステムを構築
- － イ. データマトリクスの構築
- － ウ. インビトロ実験値予測モデルの構築
- － エ. Tox-21活性スコア予測モデルの構築

研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(a) 薬物動態モデル等を活用した化学物質の体内動態評価技術の開発

- (1) 目標 生理学的薬物動態モデルを活用した、化学物質の体内濃度の推定手法の開発
- (2) 内容と成果 予測元となる対象物質のケミカルスペースを、東大院工 船津小寺研究室にて、5万物質の記述子を25区画で2次元可視化し、それらの多様性を確認・・・予測モデル構築に用いた物質がモデル構築に有効である(一般化学物質は多様)

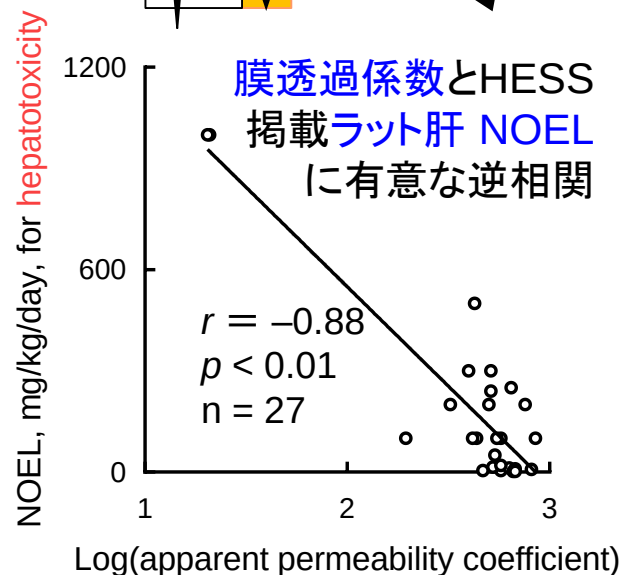
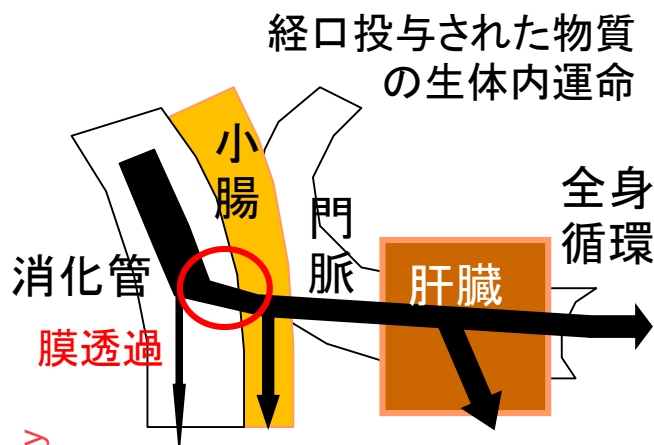


Kamiya, Funatsu, Yamazaki et al. *Chem. Res. Toxicol.* 32:211-218, 2019; Yamazaki & Kamiya, *Toxicol. Res.* 4, 295-301, 2019 と未発表データ

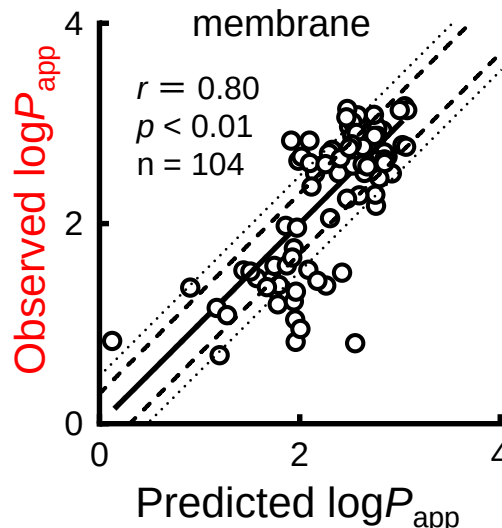
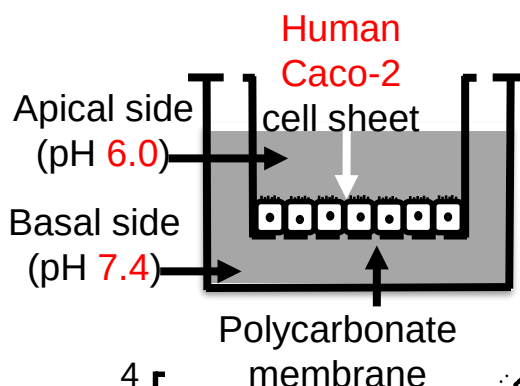
研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(a) 薬物動態モデル等を活用した化学物質の体内動態評価技術の開発

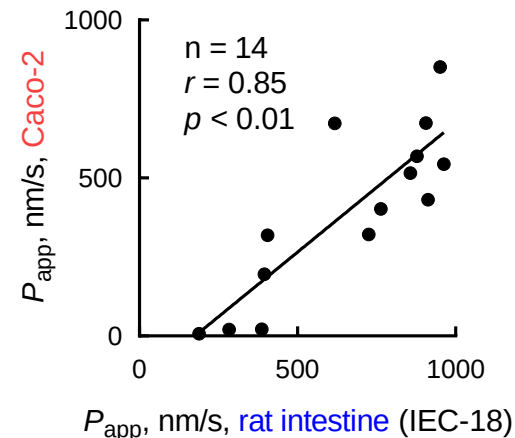
- (1) 目標 化学物質の体内濃度の推定手法の開発・・・消化管吸収の予測が極めて重要。さらに標的臓器での蓄積性の予測が毒性発現に重要な要素
- (2) 内容および成果 多様性を確保した化合物のin vitro生体膜透過係数を実測し、物性値から予測



腸管の pH 勾配を模倣した培養細胞系を利用



ヒトとラット由来細胞系での物質の膜透過係数は概ね比例



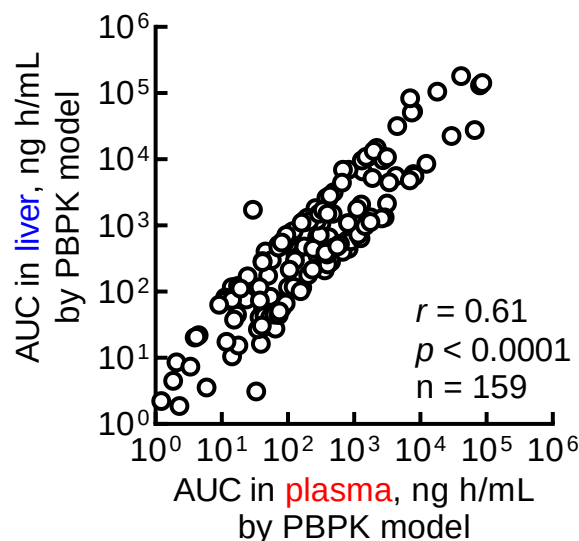
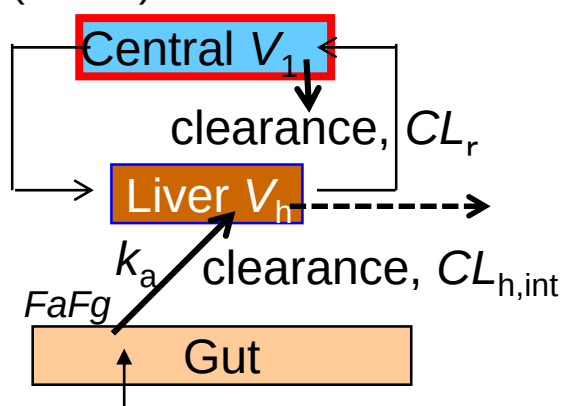
対象物質の分子量、 $\log D_{apical}$ および $\log D_{basal}$ を説明変数として用いることで、化合物の in vitro 膜透過係数を高精度かつ簡便に予測可能

研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(a) 薬物動態モデル等を活用した化学物質の体内動態評価技術の開発

- (1) 目標 生理学的薬物動態モデルを活用した、化学物質の体内濃度(血中、肝臓等)の推定手法の開発
 (2) 内容および成果 多様な159化合物のPBPKモデルパラメータを決定し、肝中濃度と毒性の関係精査

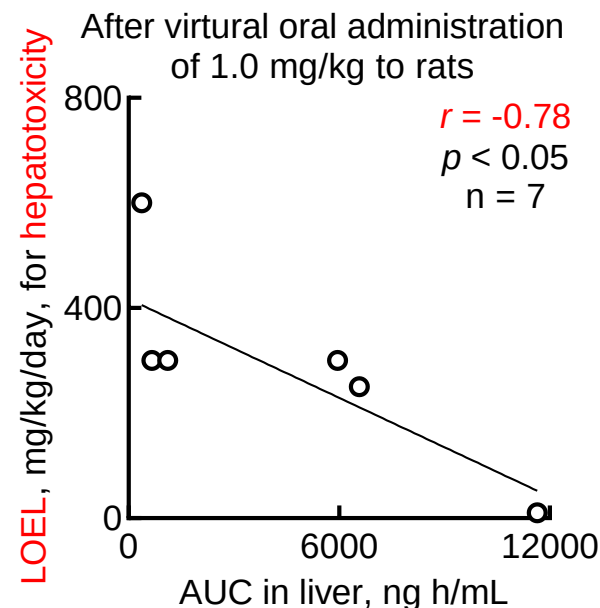
生理学的薬物動態
(PBPK)モデル概念図



仮想投与(1 mg/kg)後肝中濃度面積
AUCと血中AUCの相関係数は低い

調べた範囲において、単回投与時の1
日肝中濃度時間曲線下面積 (AUC) と
最小作用量 (LOEL) は有意な逆相関

化合物	CAS No.	PBPK parameters			PBPK modeling results			
		K_a , 1/h	V_1 , L	$CL_{h,int}$, L/h	C_{max} , ng/mL	AUC, ng h/mL	Liver C_{max} , ng/mL	Liver AUC, ng h/mL
2-Mercaptobenzimidazole	583-39-1	1.9	1.6	0.1	172	2500	2550	11600
4-Nonylphenol	84852-15-3	1.4	1.2	48.4	203	1350	2440	6570
Paraacetaldehyde	123-63-7	2.9	0.2	0.1	1070	7930	840	5960
1,2,3-Trimethylbenzene	526-73-8	1.4	1.6	7.3	30	180	630	1130
1,2,4-Trimethylbenzene	95-63-6	1.5	1.7	7.6	29	175	683	1110
m-Cresol	108-39-4	2.9	0.1	2.0	459	421	913	668
Bisphenol A	80-05-7	3.5	2.6	62.4	14	66	1070	373

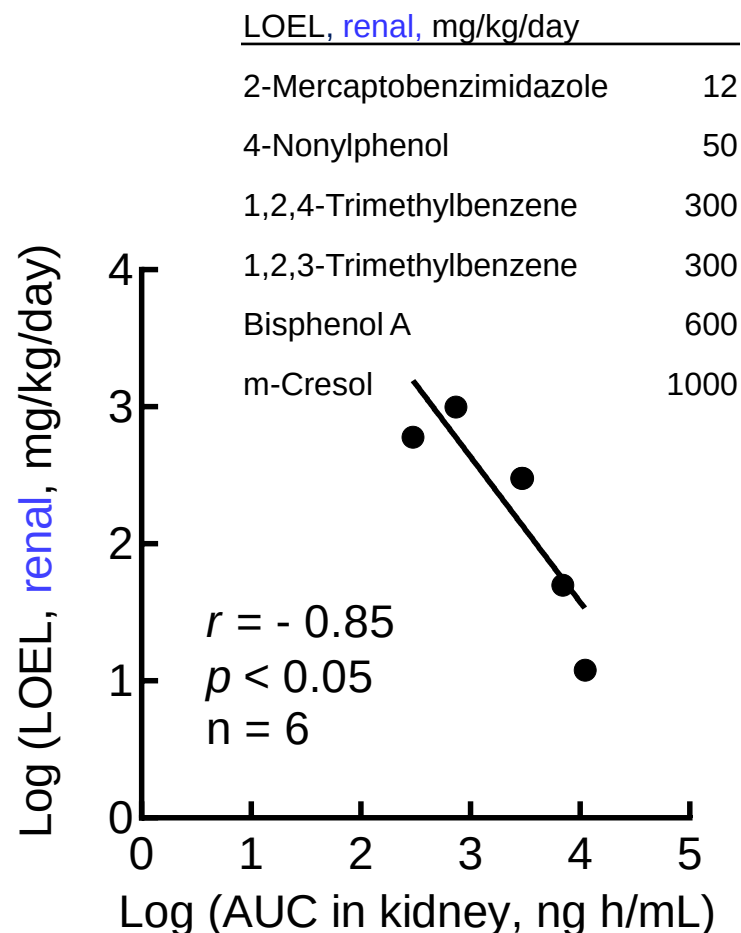
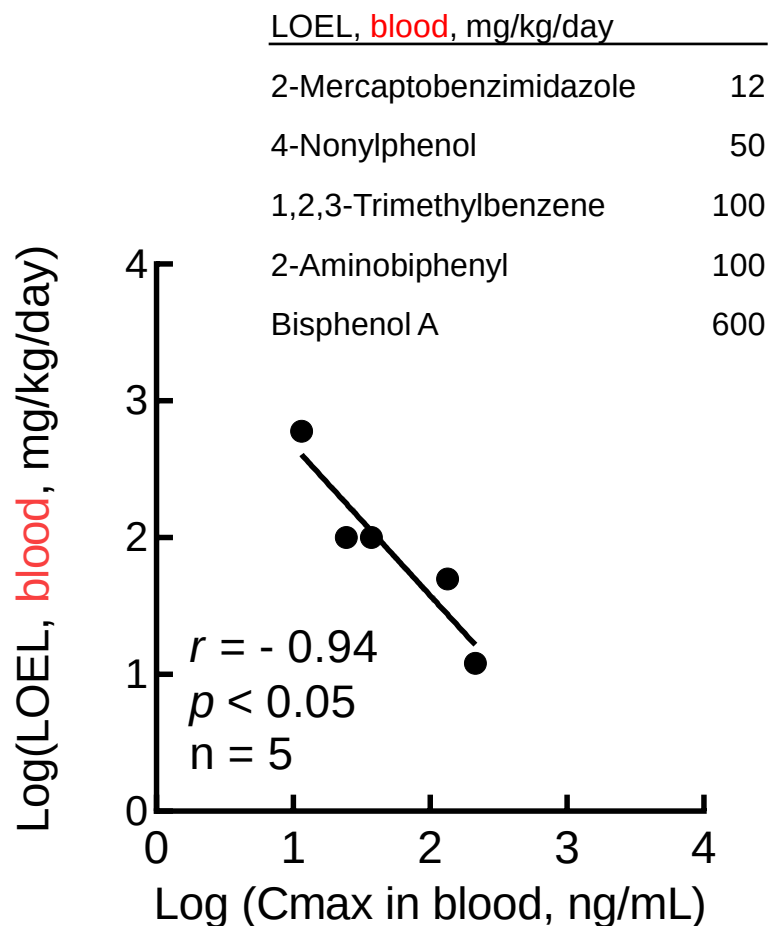


研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(a) 薬物動態モデル等を活用した化学物質の体内動態評価技術の開発

(1) 目標 生理学的薬物動態モデルを活用した、化学物質の体内濃度の推定手法の開発

(2) 内容および成果 化合物のPBPKモデルパラメータを決定し、血中(血液毒性)や腎中(腎毒性)濃度と毒性リスクの関係精査中 ……一定の逆相関性を確認。生体内濃度と毒性発現との関連性を示唆



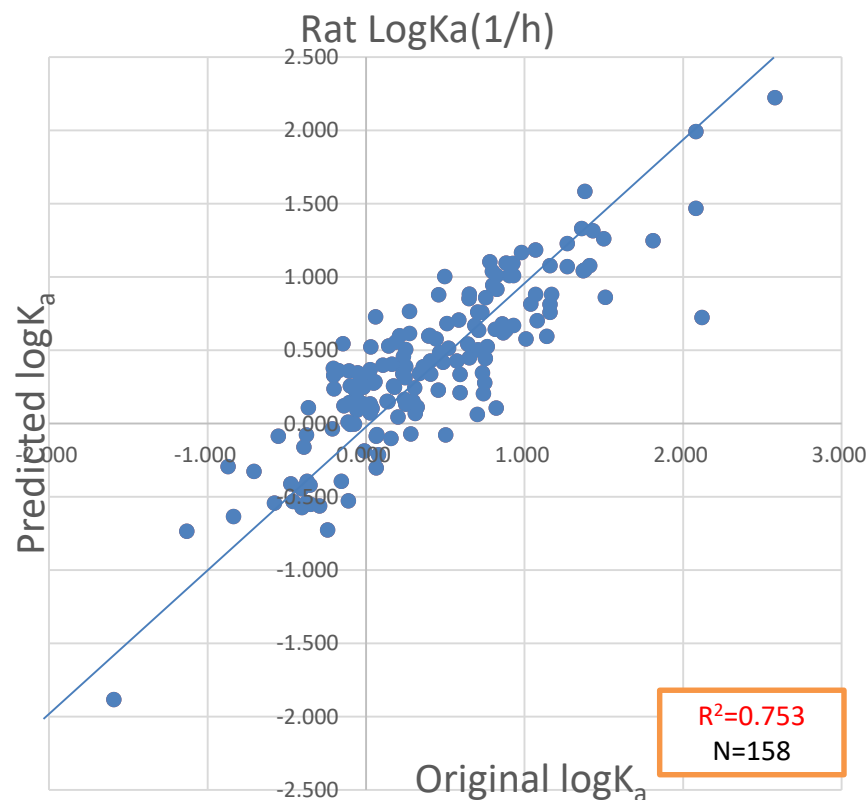
研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(a) 薬物動態モデル等を活用した化学物質の体内動態評価技術の開発

- (1) 目標 生理学的薬物動態モデルを活用した、化学物質の体内濃度の推定手法の開発
 (2) 内容および成果 PBPKモデル入力値を個別物性値や記述子にIn Vitro予測値を加え予測精度向上
 (3) 今後の展開 メカニズムを考慮したさらに高精度の予測システム構築を検討中

	Descriptor	説明
1	Predicted_logPapp	Predicted logPapp(<i>in vitro</i> 膜透過係数)
2	ClogP	ClogP
3	fun_pH6.0	fun(分子型分率) pH6.0 橙地: In Vitro予測値
4	fun_pH7.4	fun(分子型分率) pH7.4 青地: 物性値
5	logD_pH6.0	logD pH6.0
6	nHBDon	number of hydrogen bond donor
7	MATS1dv	moran coefficient of lag 1 weighted by valence electrons
8	AATS2d	averaged moreau-broto autocorrelation of lag 2 weighted by sigma electrons
9	ATSC1se	centered moreau-broto autocorrelation of lag 1 weighted by sanderson EN
10	AATSC1dv	averaged and centered moreau-broto autocorrelation of lag 1 weighted by valence electrons
11	ATSC1are	centered moreau-broto autocorrelation of lag 1 weighted by allred-rocow EN
12	Mi	mean of constitutional weighted by ionization potential
13	MID_N	molecular ID on N atoms
14	BIC3	3-ordered bonding information content
15	ATSC6d	centered moreau-broto autocorrelation of lag 6 weighted by sigma electrons
16	BIC2	2-ordered bonding information content
17	SlogP_VSA2	MOE logP VSA Descriptor 2 (-0.40 ≤ x < -0.20)
18	JGI7	7-ordered mean topological charge
19	AATSC2s	averaged and centered moreau-broto autocorrelation of lag 2 weighted by intrinsic state
20	nFAHRing	aromatic fused hetero ring count

白地: 物理化学パラメータ以外の
mordred記述子(パラメータ)



記述子に、In Vitro膜透過予測値を加えることで、
 $R^2=0.654 \Rightarrow R^2=0.753$ へ精度向上

研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

本事業におけるインビトロ試験

HESSのラット反復投与毒性試験データベースから28日間試験対象物質を中心に220物質を選択。下記のインビトロ試験系を確立し、被験物質の試験を実施

項目		内容
ア.	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
イ.	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
ウ.	核内受容体	肝の異物代謝、エネルギー代謝等に関わる受容体への影響を評価
エ.	肝細胞傷害	ラット肝細胞に対する傷害作用を評価
オ.	細胞小器官	肝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
カ.	細胞ストレス応答	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
キ.	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
ク.	遺伝子発現	マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現量評価

研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

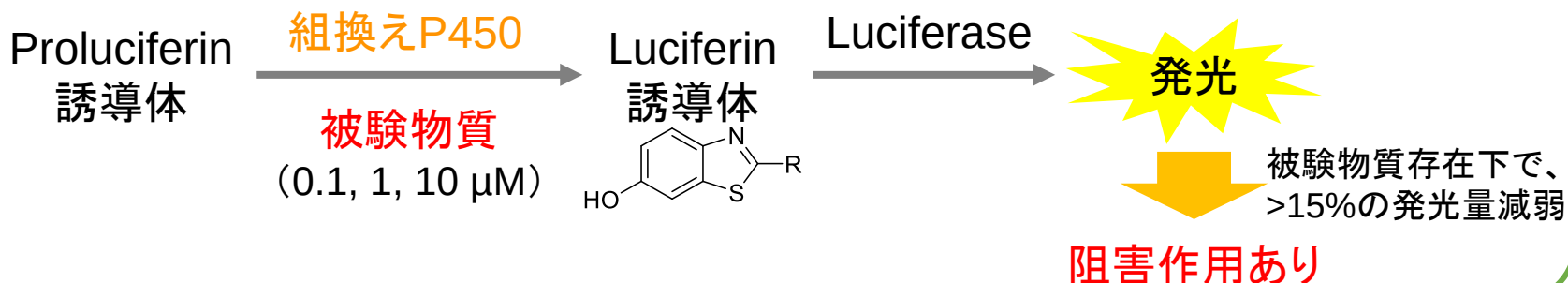
(b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

具体的成果

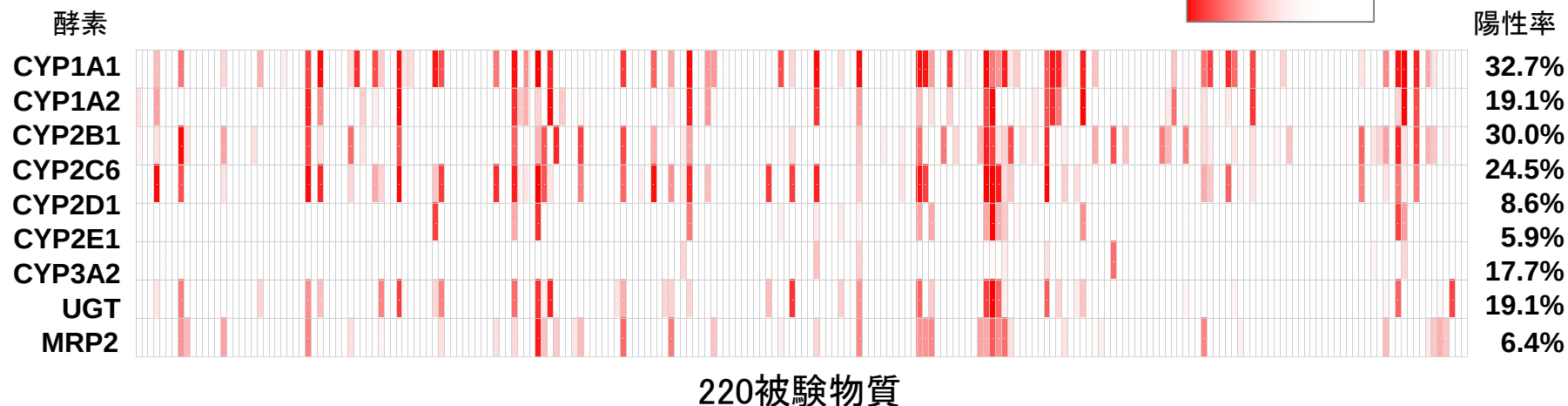
ア. 薬物代謝酵素 / イ. 胆汁酸トランスポーター

7種のラットシトクロムP450(CYP)及びUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ(UGT)に対する被験物質の阻害活性を、組換え酵素及び発光基質を用いた実験系で評価した。

測定方法の概略(P450の例)



残存活性値



研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

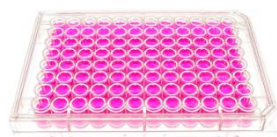
具体的成果

ウ. 核内受容体

核内受容体発現プラスミド(PXR/PPAR α の場合)、核内受容体応答配列を含むレポータープラスミドを培養細胞にトランスフェクションし、被験物質処置に伴うレポーター活性(転写活性)の変化を発光プレートリーダーで測定した。

測定方法の概略

HepG2細胞等



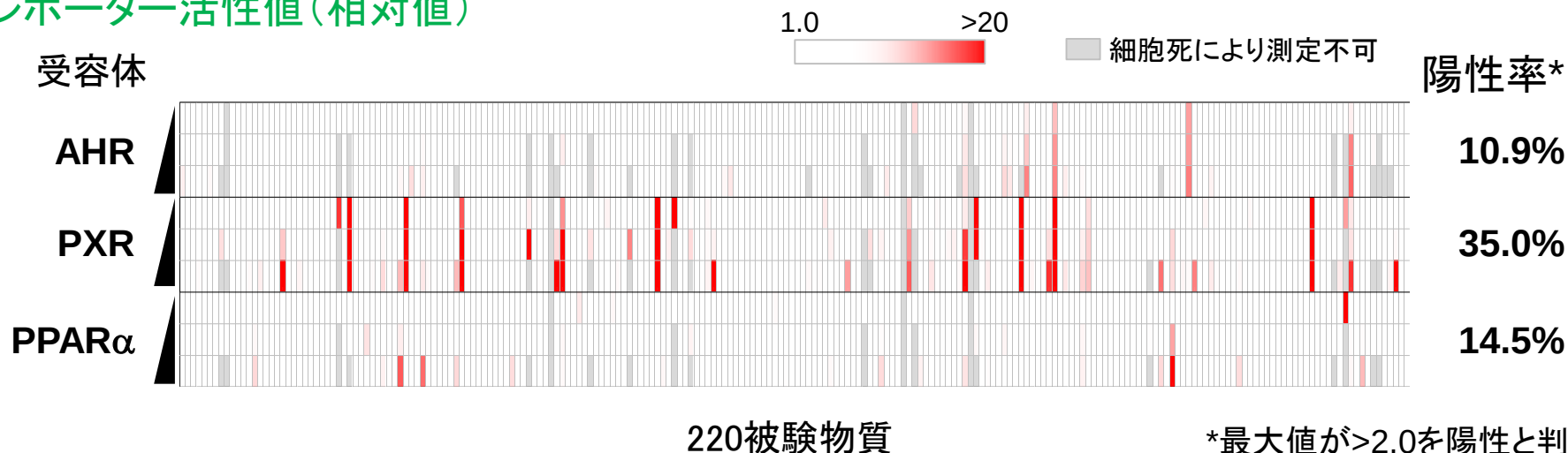
発現プラスミド
レポータープラスミド

被験物質
(10, 30, 100 μ M)

Luciferase
活性(発光)
の測定



レポーター活性値(相対値)



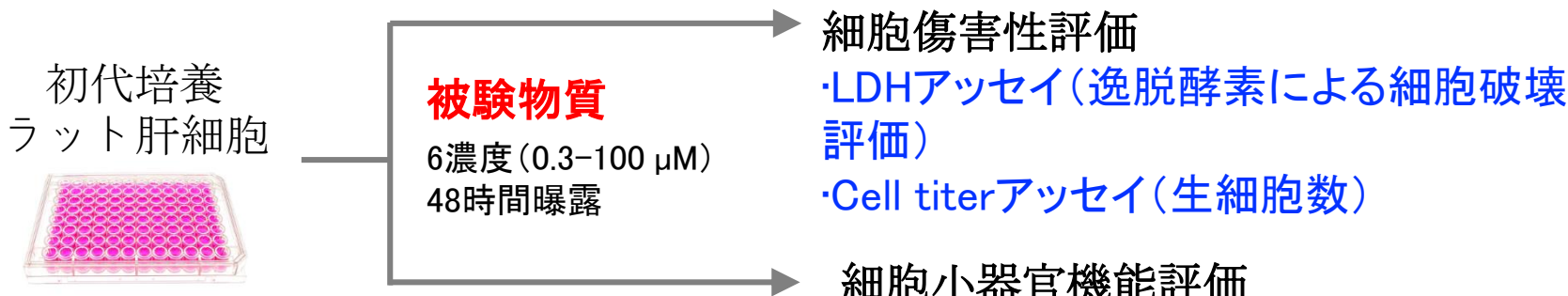
研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

具体的成果

エ. 肝細胞障害 / オ. 細胞小器官

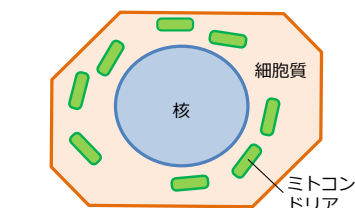
初代培養ラット肝細胞に被験物質(6濃度)を曝露し、48時間後に細胞傷害性及び細胞小器官機能を評価した。



ハイコンテンツイメージング解析

・核、細胞質(F-actin)、ミトコンドリア

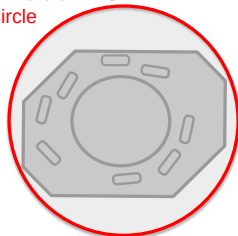
細胞小器官イメージングの概略



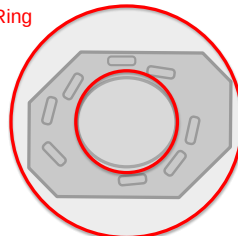
略称	定義
Count	数 (Spot数)
Inten	蛍光強度 (Intensity)
Area	蛍光面積
Var	全ピクセルの標準偏差
Size	直径
P2A	円形度: $4\pi \times \text{面積} \div \text{周囲長}^2$
LWR	長さ・幅の比
Avg	全ピクセルの平均 (細胞あたり)
Total	全ピクセル

測定範囲・対象

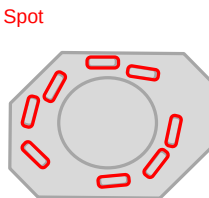
Circle



Ring



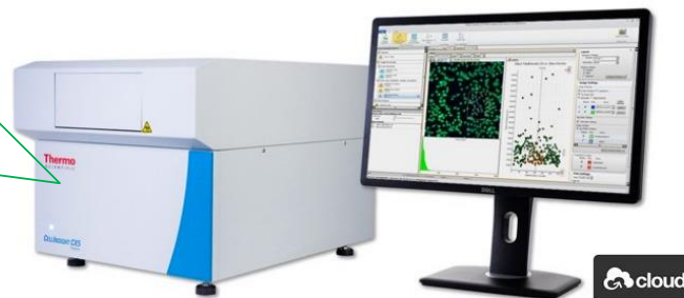
Spot



* CircleやRingは隣接の細胞と重なりうるが、自動細胞認識により設定される細胞境界が優先される。

RingSpot: Ring内に含まれるSpot

CircSpot: Circle内に含まれるSpot



研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

具体的成果

オ. 細胞小器官(続き)

①各細胞小器官に由来する蛍光強度を下記のHCAパラメーターとして数値化

#	Parameters	
1	ValidObjectCount	核
2	SelectedObjectCount	
3	SelectedObjectCountPerValidField	
4	ObjectAreaCh1	
5	ObjectShapeP2ACh1	
6	ObjectShapeLWRCh1	
7	ObjectTotalIntenCh1	
8	ObjectAvgIntenCh1	
9	ObjectVarIntenCh1	
10	ObjectSizeCh1	
11	RingTotalIntenCh2	ミトコンドリア
12	RingAvgIntenCh2	
13	CircTotalIntenCh2	
14	CircAvgIntenCh2	
15	CircRingAvgIntenDiffCh2	
16	CircRingAvgIntenRatioCh2	
17	RingSpotTotalIntenCh2	
18	RingSpotAvgIntenCh2	
19	RingSpotTotalAreaCh2	
20	RingSpotAvgAreaCh2	
21	RingSpotCountCh2	
22	CircSpotTotalIntenCh2	
23	CircSpotAvgIntenCh2	
24	CircSpotTotalAreaCh2	
25	CircSpotAvgAreaCh2	
26	CircSpotCountCh2	

#	Parameters	
27	RingTotalIntenCh3	細胞質 (F-アクチン)
28	RingAvgIntenCh3	
29	CircTotalIntenCh3	
30	CircAvgIntenCh3	
31	CircRingAvgIntenDiffCh3	
32	CircRingAvgIntenRatioCh3	
33	RingSpotTotalIntenCh3	
34	RingSpotAvgIntenCh3	
35	RingSpotTotalAreaCh3	
36	RingSpotAvgAreaCh3	
37	RingSpotCountCh3	
38	CircSpotTotalIntenCh3	
39	CircSpotAvgIntenCh3	
40	CircSpotTotalAreaCh3	
41	CircSpotAvgAreaCh3	
42	CircSpotCountCh3	

②上記42のHCAパラメーターについて、6点濃度の測定値を利用して、最大値、最小値、積算値、絶対積算値、無影響濃度の5指標を算出

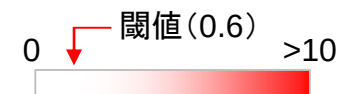
研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

3) 具体的成果

オ. 細胞小器官(続き)

蛍光強度(6濃度の積算値:AUCabs)



核

(10パラメーター)

ミトコンドリア

(16パラメーター)

細胞質

(16パラメーター)



被験物質

研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

具体的成果

力. 細胞ストレス応答

- 酸化ストレス (Nrf2)
- 炎症応答 (NF- κ B, AP-1)
- 小胞体ストレス (ATF6, XBP-1)
- DNA損傷 (p53)
- 低酸素 (HIF1 α)
- 熱ショック (HSF)
- サイトカイン応答 (STAT3)

転写
因子

各種の細胞ストレスが惹起されると活性化する転写因子

応答配列

TK pro

赤色ルシフェラーゼ

パスウェイ

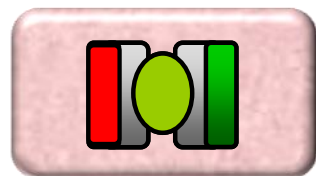
TK pro

緑色ルシフェラーゼ

細胞生存率

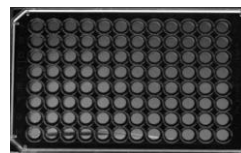


人工染色体ベクター

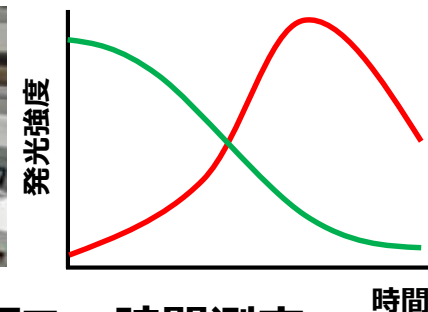


ヒト肝癌由来HepG2細胞

96ウェルプレート



- ✓ 9種類のストレス応答評価用細胞の作製に成功
- ✓ ストレス応答および細胞毒性の時系列変化を同時に評価する測定系を確立



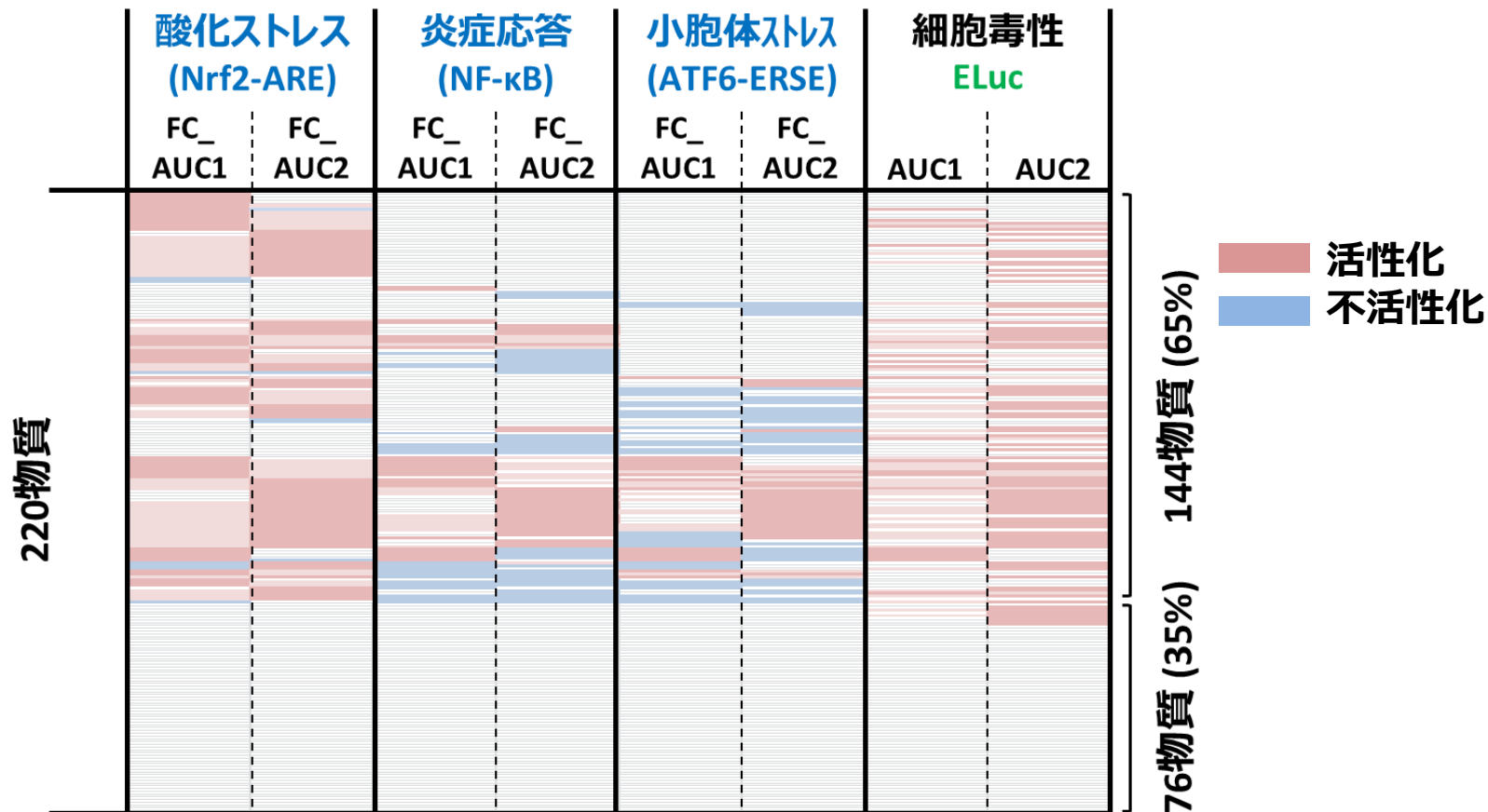
約30分間隔で72時間測定

研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

具体的成果

カ. 細胞ストレス応答



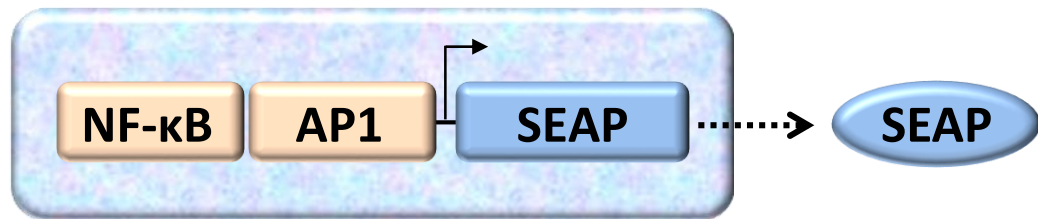
- ✓ 3種類のストレス応答に対する220物質の影響について解析
- ✓ ストレス応答パスウェイおよび細胞毒性に関する合計10パラメーターを抽出

研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

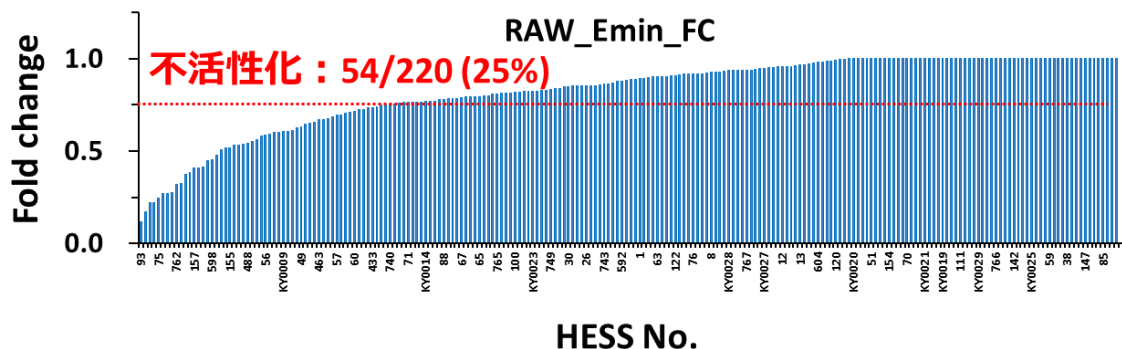
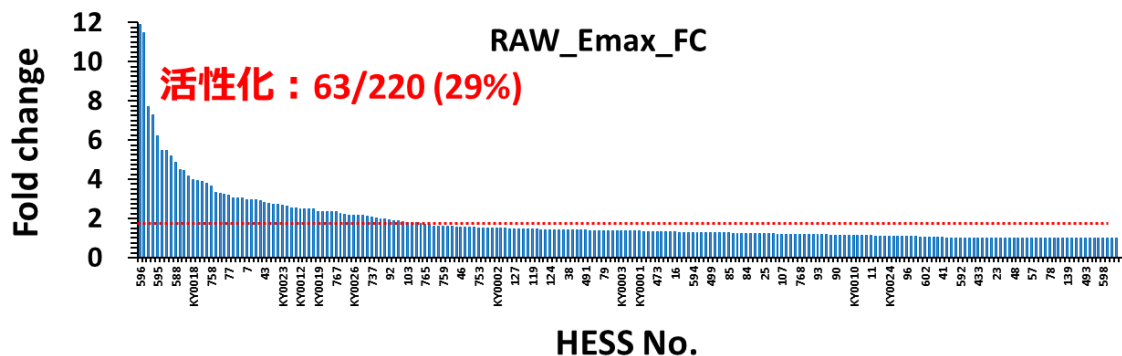
具体的成果

キ. 非実質細胞(マクロファージ細胞)



RAW264.7細胞

炎症応答に関与するNF-κBとAP-1の活性化に伴いSEAPレポーターが発現



- ✓ 220物質の評価を実施
- ✓ パスウェイおよび細胞毒性に関する合計10パラメーターを抽出

In vivo予測のためのin vitro試験パラメーターの最適化への取り組み

大量のデータ(数万件)



Deep learning等の技術でeffectively in vitroモデル相当の中間ネットワークが作られるだろう

数百程度のデータ数



実験研究者、情報解析技術者によるパラメーターの創出と最適化

- A) In vitro実験結果からの抽出情報
 - AUC等の統計量
 - Emax、Emin
 - 曲線の傾き
- B) NOELとLOEL毎の最適化
 - NOEC (Non observed effect concentration)
 - 活性化/非活性化
- C) In vitro実験情報の組み合わせ解析
 - AOPとして解釈可能性

インビトロ試験結果と肝臓のグループEPとの関連性

- 各アッセイに閾値を設定して陽性・陰性の2値とし、各エンドポイントの有無との関連性をχ²乗検定で解析した

EP_LV01 (細胞傷害・炎症)	CYP2B1	0.007
	CircSpotAvgIntenCh2	0.045
	CYP2C6	0.078
	CircSpotTotalIntenCh2	0.090
EP_LV02 (肝機能低下)	CYP3A2	0.000
	CYP2C6	0.000
	CircSpotAvgIntenCh2	0.001
	CircAvgIntenCh2	0.004
	CircTotalIntenCh2	0.016
	CYP2B1	0.019
	ObjectTotalIntenCh1	0.027
	ObjectAvgIntenCh1	0.033
	CYP1A1	0.036
	CircSpotTotalIntenCh2	0.036
EP_LV03 (肝機能亢進)	CYP1A2	0.074
	LDH	0.074
	PPAR	0.015
	CYP2B1	0.025
	CYP2C6	0.039
	ObjectAvgIntenCh1	0.054
	CircSpotCountCh3	0.054
	CYP1A2	0.058

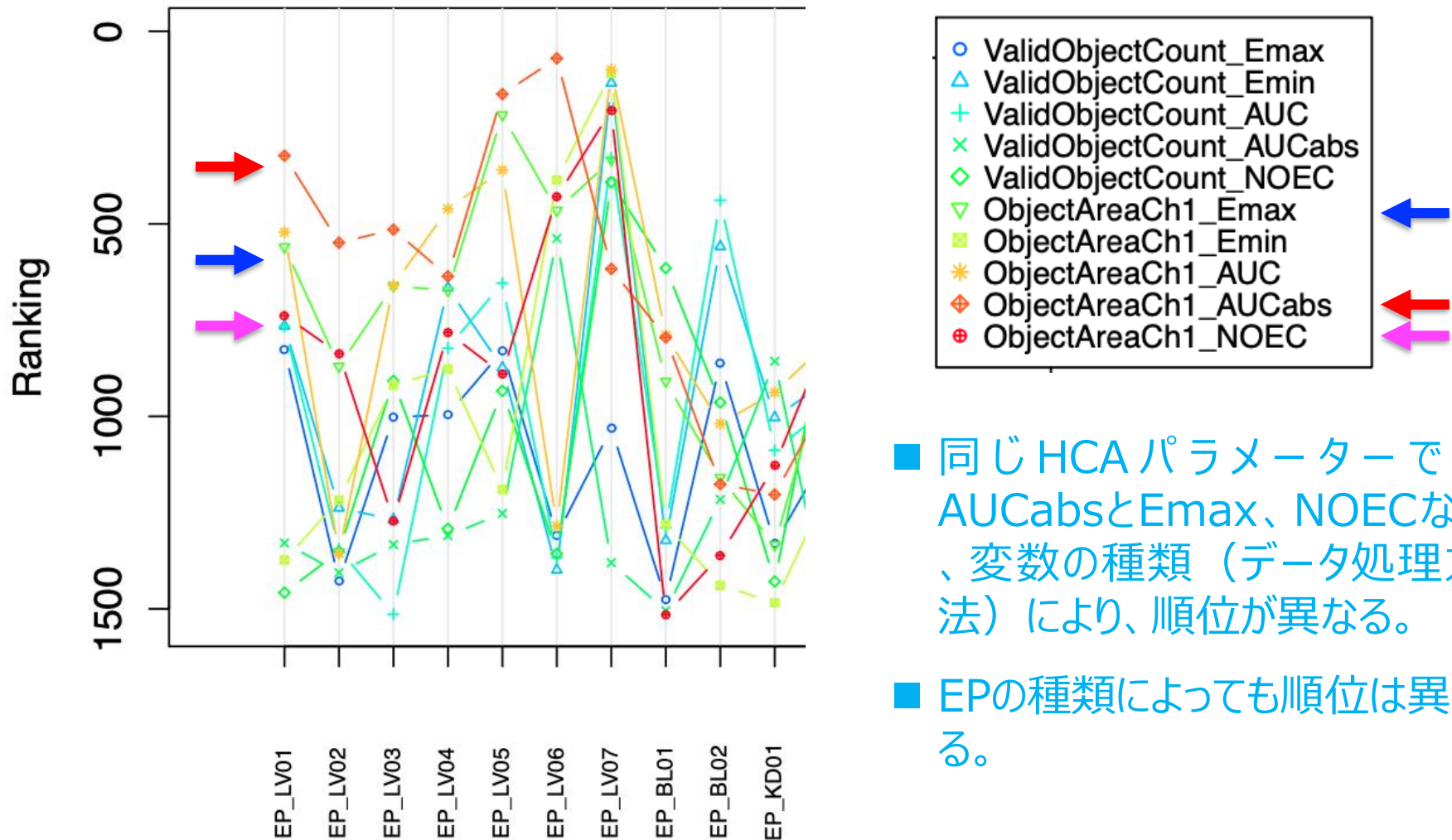
EP_LV04 (胆管障害)	CircSpotAvgIntenCh2	0.064
	CYP2B1	0.072
	CircSpotTotalIntenCh2	0.083
EP_LV05 (肥大)	CYP2B1	0.000
	CYP2C6	0.002
	ObjectAvgIntenCh1	0.010
	PPAR	0.013
	CYP1A1	0.024
	CYP1A2	0.024
	RingAvgIntenCh2	0.027
	RingSpotTotalIntenCh2	0.031
EP_LV06 (脂質代謝異常)	RingTotalIntenCh2	0.051
	PXR	0.094
	CYP2B1	0.001
	AHR	0.004
	CircSpotAvgIntenCh2	0.033
	ObjectAvgIntenCh1	0.042
	CYP2D1	0.045
	RingSpotAvgIntenCh2	0.061
	RingSpotTotalIntenCh2	0.088

Brown: P450 Blue: Nucleus
 Purple: Nuclear receptor Green: Mitochondria
 Cyan: Cytotoxicity Orange: F-actin/cytoplasm

In vivo予測のためのin vitro試験パラメーターの最適化の取り組み例

Mordred記述子(約1500パラメーター)と、NOEL値及びLOEL値の関連性について、Spearmanの順位相関解析を実施し、ランキングを確認

■ ラット肝細胞HCA (核) vs. LOEL



■ 同じHCAパラメーターでもAUCabsとEmax、NOECなど、変数の種類（データ処理方法）により、順位が異なる。

■ EPの種類によっても順位は異なる。

肝臓関連個別EP

NOECが多くのエンドポイントで上位にランキング

研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発 (b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

具体的成果

ク. マイクロアレイ

細胞におけるマイクロアレイによる遺伝子発現量データ取得のためのプロトコルの構築 及び
遺伝子発現量データ等に基づく毒性メカニズム解析

ヒト由来細胞及びラット由来細胞における遺伝子発現量データ取得のためのプロトコル構築

1) 目標

ヒト由来細胞及びラット由来細胞における遺伝子発現量データ取得のためのプロトコルを構築する

2) 実施内容

- ・ ヒト由来肝細胞HepaRG®及びラット初代培養肝細胞を用いて、細胞播種数、暴露時間、結果の再現性等に関する検討を実施し、マイクロアレイによる遺伝子発現量データ取得のためのプロトコルを構築した。
- ・ HepaRG®では10物質、ラット初代培養肝細胞では72物質の遺伝子発現量データを取得した。

3) 具体的成果

- ・ ヒト由来細胞(HepaRG®)及びラット初代培養肝細胞における遺伝子発現量データ取得のためのプロトコルを構築した。
- ・ LDHアッセイの結果に基づくデータ受け入れ基準を策定し、再現性のある遺伝子発現量データが取得できるようになった。

4) 今後の展開

- ・ 取得したデータは、SDラットの肝臓における遺伝子発現量データ等との比較解析に活用する。

研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

具体的成果 ク. マイクロアレイ(つづき)

本PJで取得した*in vitro*データ等を活用した毒性メカニズム解析に関する検討

1) 目標

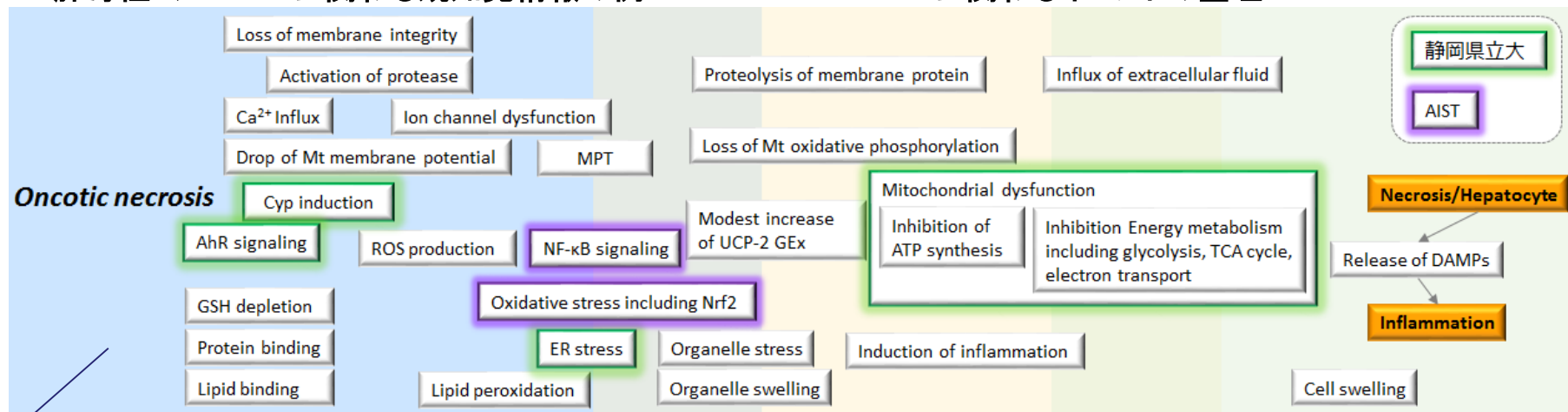
既存の知見、動物試験データ、本PJで取得された*in vitro*データ等に基づく解析により、毒性発現に関わるイベントや毒性メカニズムを明らかにし、予測結果の信頼性を向上させる。

2) 実施内容

- 肝毒性メカニズムに関わる既知見情報を整理している。
- 経済産業省Tox-Omicsプロジェクト及びToxicogenomics Project (TGP)で取得された雄ラットの肝臓における28日間までの経時的な遺伝子発現量データと、ヒトまたはラットの細胞における遺伝子発現量データの比較解析等を実施している。

3) 具体的成果

■ 肝毒性メカニズムに関わる既知見情報の例：Oncotic necrosisに関わるイベントの整理



AI-SHIPSの*in vitro*試験系で段階的なイベントをカバー

研究開発項目① 毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発

(b) 細胞の化学物質応答性評価を基盤とする毒性評価技術の開発

具体的成果 ク. マイクロアレイ(つづき)

②本PJで取得した*in vitro*データ等を活用した毒性メカニズム解析に関する検討

3) 具体的成果

■ 毒性試験データと各種*in vitro*データ等の比較解析例：

4,4'-dichlorodiphenyl sulfone (DCDPs)

SDラットへの28日までの経口反復投与試験：**7日以降、50 mg/kg/day以上で限局性肝細胞壊死**

Tox-Omicsプロジェクトのデータ

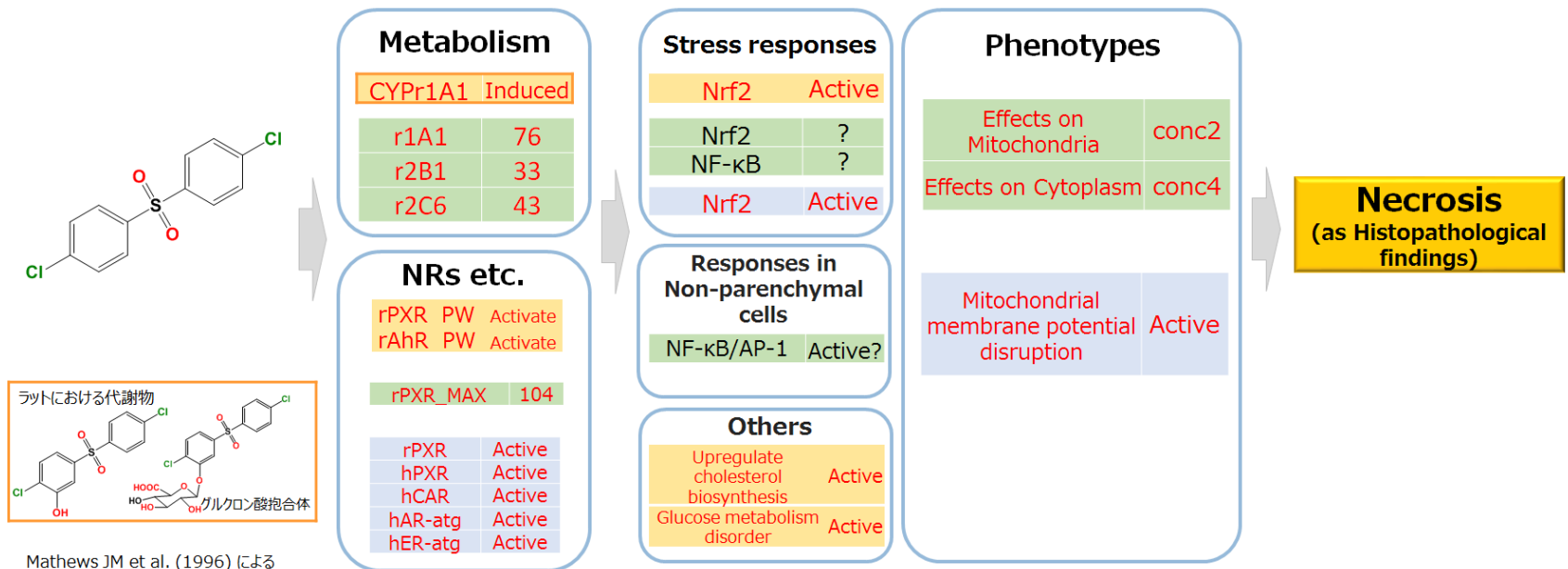
赤字：応答あり
黒字：応答なし

オレンジ枠：Literature

in vivo(Rat Liver) Gex

AI-SHIPS assay

Tox21 assay



DCDPsの肝細胞の壊死(Necrosis)の要因: Oncotic necrosisに類似した経路の可能性

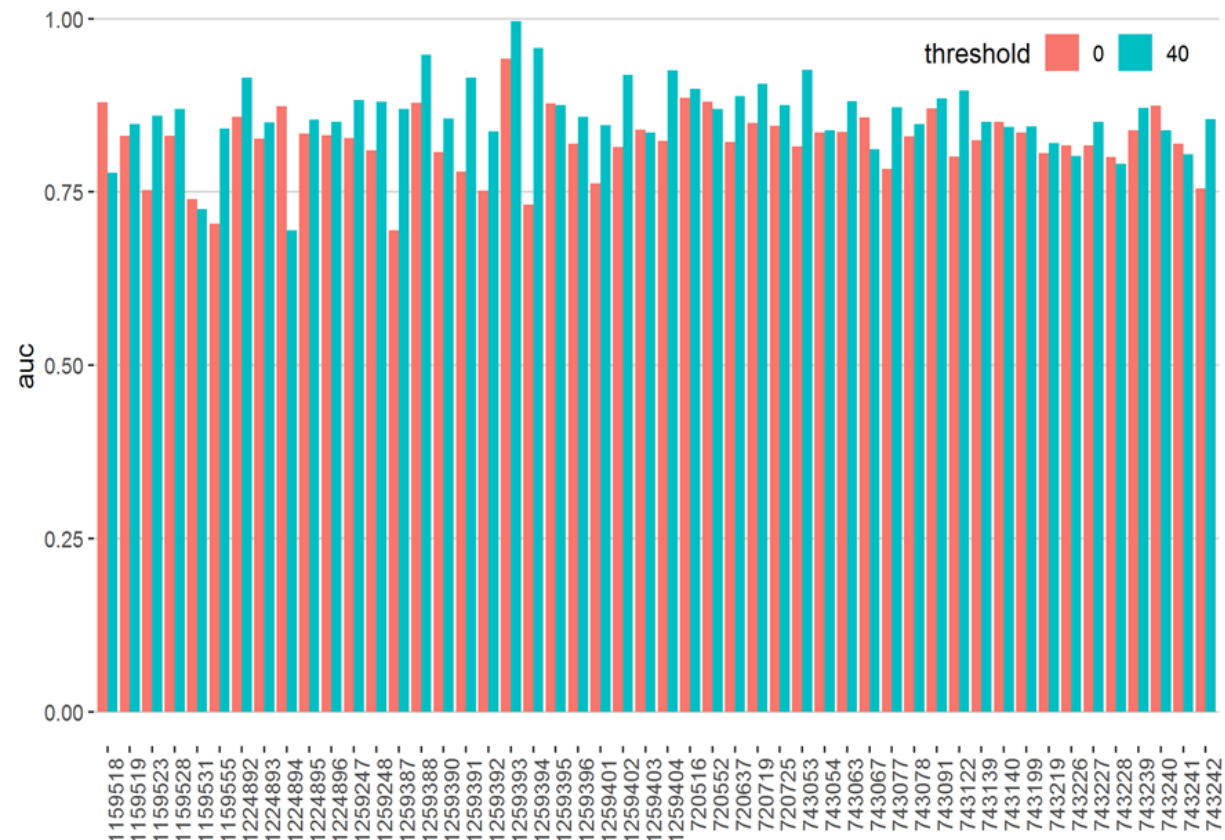
エ. Tox-21によるMIE50種の予測モデルを構築

1-(1) 化学構造記述子法

50種類のMIEに対して2種類の陽性基準を適用し、総計**100種類**の予測モデルを構築
機械学習アルゴリズムの試行を行い、良好な手法を探索

最終アルゴリズム:
・ランダムフォレスト
・勾配ブースティング採用

予測性能の外部検証
ROC曲線下面積(AUC):
総平均0.842



- ・NIH主催Tox21 data challenge 2014におけるwinnersの成績に匹敵
- ・予測するMIE数において国内外に比肩する研究例は存在しない

人工能を活用した予測モデルの開発(生体レベルでの毒性評価・予測を実現する情報技術の開発)

エ. DeepSnapに基づく深層学習とリガンドータンパク質間相互作用エネルギースコアを使用したMIE予測ドッキングシミュレーション(myPresto)

1-(2) 3D分子画像入力システム(DeepSnap)に基づく深層学習

DeepSnapを用いてTox21-MIEに対する予測モデル構築実験を施行

予測性能の検証

外部検証時ROC曲線下面積(AUC): 平均0.876

→従来法の成績をさらに上回る良好な予測性能

さらに、計算コストの大幅に減少に成功

・Matsuzaka Y and Uesawa Y., *Front Bioeng Biotechnol.* 2019,28;7:65

・Matsuzaka Y and Uesawa Y., *Int J Mol Sci.* 2019,30;20

分子画像入力法は新規性が高く、国内外に類似した研究例は存在しない

1-(3) リガンドータンパク質間相互作用エネルギースコアを使用したMIE予測ドッキングシミュレーション(myPresto)

↓
Tox21化合物とCARの結合親和性関連パラメーター

↓
CARアゴニスト活性予測モデル
(ドッキングスコア、吸着エネルギー等8種類のみを記述子として使用)

↓
予測性能の検証

外部検証時ROC曲線下面積(AUC): 0.833

リガンドータンパク質間相互作用エネルギースコアは良好な記述子として機能することが判明

相互作用エネルギースコアをMIE予測に用いる方法は新規性が高く、国内外に類似した研究例は存在しない

