

「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）」

評価用資料
（案）

令和元年 1 2 月 2 6 日

経済産業省 製造産業局 化学物質管理課

国立大学法人東京大学、みずほ情報総研株式会社

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、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、

一般財団法人化学物質評価研究機構

プロジェクト名	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）			
行政事業レビューとの関係	平成31年度行政事業レビュー 事業番号0227			
上位施策名	科学技術イノベーション総合戦略 2017 他			
担当課室	製造産業局 化学物質管理課 化学物質リスク評価室			
<u>プロジェクトの目的・概要</u> 蓄電池材料、有機 EL 材料、有機薄膜太陽電池材料といった、次世代省エネ型電子デバイス等に省エネ等革新的機能を付与するイノベーションを促進させるため、機能性化学物質の安全性評価に必要な動物を用いた反復投与毒性試験を AI を活用したコンピュータシミュレーションに代替する高速・高効率な安全性予測手法を開発し、機能性化学物質の開発における安全性評価コスト（費用・期間）を削減する。その結果、材料メーカーの提案力の強化、ユーザーとの摺り合わせ時間の短縮化、開発コストの大幅低減、新製品（省エネ型デバイス）開発の加速化及び低炭素社会の実現が期待される。 本事業は、科学技術イノベーション総合戦略 2017 の「統合型材料開発システム」の中で重点的に取り組むべき課題としても位置づけられている。				
予算額等（ <u>委託</u> or 補助（補助率： ）） （単位：百万円）				
開始年度	終了年度	中間評価時期	終了時評価時期	事業実施主体
平成 29 年度	令和 3 年度	令和元年度	令和 3 年度	国立大学法人東京大学、みずほ情報総研株式会社
H29FY 執行額	H30FY 執行額	H31FY 執行額	総執行額	総予算額
206	400	430	1,036	1,036

I. 研究開発課題（プロジェクト）概要

1. 事業アウトカム

事業アウトカム指標		
動物実験の代替による省エネ効果（原油換算） 開発段階での安全性評価のための動物飼育・実験施設での電気使用量を 264, 000, 000kWh/年と見積り。本事業終了 10 年後には、動物実験数が現在より 90%削減されると予測。CO2 排出係数から、約 9 万 t-CO2 の CO2 削減を見込む。		
指標目標値		
事業開始時（平成 29 年度）	計画：－	実績：－
中間評価時（令和元年度）	計画：－	実績：－
終了時評価時（令和 3 年度）	計画：－	実績：－
目標最終年度(令和 13 年度予定)	計画：6 万 kL	

<設定理由>

本研究開発事業では、蓄電池材料、有機 EL 材料、有機薄膜太陽電池材料といった、次世代省エネ型電子デバイス等に省エネ等革新的機能を付与するイノベーションを促進させるため、機能性化学物質の安全性評価に必要な動物を用いた反復投与毒性試験を AI を活用したコンピュータシミュレーションに代替する高速・高効率な安全性予測手法を開発し、機能性化学物質の開発における安全性評価コスト（費用・期間）を削減する。動物を用いた反復投与毒性試験を代替することにより、動物飼育・実験施設での電気使用量が削減されることから、アウトカム指標は、動物実験の代替による省エネ効果（原油換算）とする。

事業アウトカム指標		
新規化学物質の開発件数（化学物質審査規制法に基づく新規化学物質の届出件数） コンピュータシミュレーションによる毒性予測によって、機能性化学物質の開発の効率化が図られることにより、国内の開発拠点が維持され、新規化学物質の開発力が向上し、本開発テーマ終了 10 年後の平成 43 年度には、新規機能性化学物質の開発件数が現在の約 600 件/年から 1000 件/年程度に増加することを見込む。		
指標目標値		
事業開始時（平成 29 年度）	計画：－	実績：－
中間評価時（令和元年度）	計画：－	実績：－
終了時評価時（令和 3 年度）	計画：－	実績：－
目標最終年度(令和 13 年度予定)	計画：1, 000 件	

<設定理由>

本研究開発事業により、材料メーカーの提案力の強化、ユーザーとの摺り合わせ時間の短縮化、開発コストの大幅低減、新製品（省エネ型デバイス）開発の加速化が進むことが想定される。よって、アウトカム指標は、新規機能性化学物質の開発件数の増加とする。

2. 研究開発内容及び事業アウトプット

(1) 研究開発内容

蓄電池材料、有機 EL 材料、有機薄膜太陽電池材料といった、次世代省エネ型電子デバイス等に省エネ等革新的機能を付与するイノベーションを促進させるため、機能性化学物質の安全性評価に必要な動物を用いた反復投与毒性試験を AI を活用したコンピュータシミュレーションに代替する高速・高効率な安全性予測手法が求められている。そこで、本事業では、人工知能技術や毒性学等の研究成果及びこれらの応用に関するノウハウや知財を有する研究機関・大学等と毒性試験データを保有する企業等を結集し、民間だけでは成し得ない産業界の共通基盤として運用可能な次世代の有害性予測手法を開発する。本事業の全体像を図 1 に示す。

具体的には、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（以下、「化審法」という。）に基づく審査のために必要となる「哺乳類を用いる 28 日間反復投与毒性試験」（OECD テストガイドライン TG407）を予測するシステムとして、生理学的薬物動態（PBPK）および肝毒性予測モデルを骨格とする肝毒性をプロトタイプ構築する。

上記本事業の研究開発目標を達成するため、以下の研究開発項目について研究開発計画に基づき実施した。

- 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
- 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）

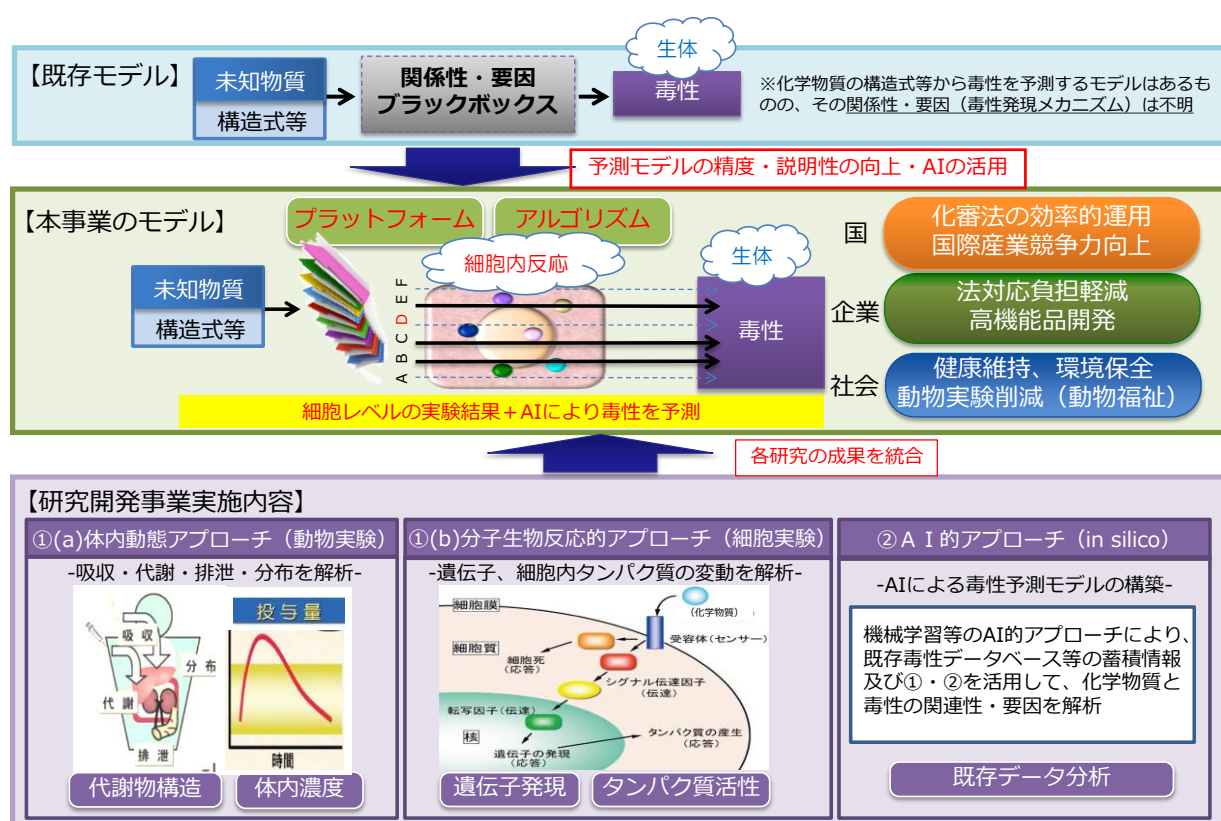


図 1 本事業の全体像

背景と戦略

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た。しかし、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、細胞等を用いたインビトロ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る。

我が国でも、平成 19～23 年度実施の「構造活性相関手法による有害性評価手法開発」プロジェクトにより、化学物質の構造から反復投与毒性の類推による評価を支援するシステムである有害性評価支援システム統合プラットフォーム（HESS）が開発された。しかし、こうした構造活性相関手法は、変異原性など、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、製品開発の現場や法制度への受け入れは進んでいるとはいえないのが現状である。

また、近年欧米では、毒性に関連する可能性があるタンパク質と化学物質の反応性等を評価するハイスループット試験系を構築し、多数の化学物質について多様なインビトロ試験を実施し、ヒトでの有害性をインビトロ試験結果から評価することを目指した取り組みが行われている。しかし、インビトロの試験結果を得た多数の被験物質について、必ずしも生体（インビボ）での毒性影響が明らかではないことに課題がある（図 2）。近年活用が進む AI 技術等を用いて毒性を予測するためには、正解に相当する学習データが必要であるが、化学物質の構造情報とインビトロ試験結果があっても、それに対応するインビボの毒性影響が不明な場合は、反復投与毒性のような生体での毒性予測モデルを構築することは困難である。

そこで本事業では、生体での毒性試験データが存在する物質に対応するインビトロ試験のデータを取得・収集し、化学構造、体内動態及びインビトロ試験データと、インビボでの影響との組み合わせを学習データとすることにより、毒性発現機序情報を提示可能なインビボ毒性予測モデルを構築する（、図 3）。

これまでの取り組み

- ・ インビボ毒性試験データベースの構築 (HESS等)
- ・ 構造活性相関手法等により、化学構造とインビボ毒性の関連性に基づいた毒性予測

課題・問題点

- ・ 変異原性など、一定の化学構造との関連が明らかな毒性以外は、どのような理由・機序で毒性が発現するか不明
→ 製品開発(研究者)や規制当局に受け入れられない。

近年の欧米での取り組み

- ・ 毒性に関連する可能性があるタンパク質と化学物質の反応性を評価可能なハイスループット試験系を構築 (Tox21/ToxCast)
- ・ 大型予算により、大量の化学物質を、多数のインビトロ試験で評価
- ・ ヒトでの有害性をインビトロ試験結果から評価することが目標

課題・問題点

- ・ 被験物質のインビボ毒性が不明
→ 「正解」がないため、AI技術等を用いてもインビボ毒性予測モデルの構築が困難

- 実用化には、毒性発現機序情報を提示可能な予測モデルが必要
- 我が国が有する毒性試験データ、AI技術を活用し、コンピュータ(インシリコ)モデル化

- 毒性発現に關与する細胞内イベントのインビトロ試験データ(Tox21データの活用、プロジェクトで実測)から、細胞内イベント予測モデルを構築
- 化学構造情報だけでなく、毒性発現関連細胞内イベント情報を利用したインビボ毒性予測モデルを構築

世界初・日本独自の毒性発現機序関連情報を提示可能なインビボ毒性予測システムを構築

図 2 本事業の背景と戦略

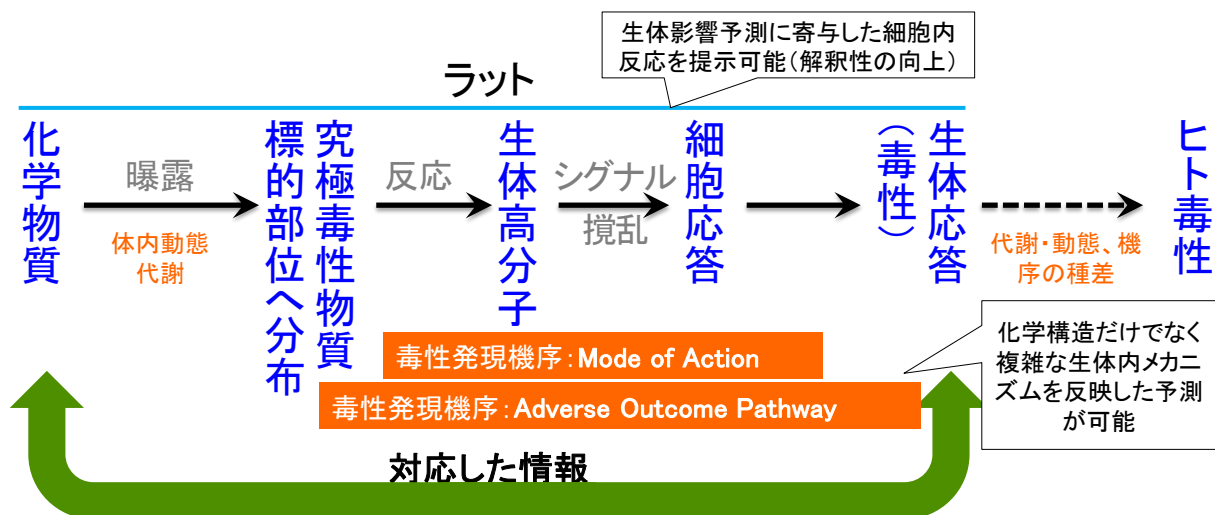


図 3 毒性発現機序を考慮したインビボ毒性予測

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) テーマの背景

化学物質による毒性の臓器選択性と毒性の強さは、標的臓器への化学物質の移行とその曝露時間、代謝さらには排泄およびその速度によって決定される。また、毒性は代謝物によって引き起こされることも多い。したがって、化学物質の薬物代謝及び体内動態の予測は、それらの毒性発現予測に欠くことができない。しかし、「定量的構造活性相関手法による有害性評価手法開発」プロジェクトで開発された HESS などのラットインビボ毒性試験の詳細な試験結果が搭載されたデータベースは毒性発現予測に有用と思われるが、これらにはラットの薬物代謝以外の体内動態情報がまったくない。また、ラット等の齧歯類とヒトの間にはしばしば薬物代謝や体内動態に種差が認められるため、ヒト毒性予測にはこれらのギャップをつなぐ技術の開発も必要である。

2) 目標

本研究では、ラットとヒトにおける薬物代謝や体内動態の種差に関する研究、ならびにヒト肝移植マウス等を利用したヒトの生理学的薬物動態 (PBPK) モデルの構築等を行う。これらの解析と研究開発項目②により、既存のラット毒性試験情報を有効活用し、ラットにおける毒性予測のヒトへの外挿手法ならびに化学物質のヒト薬物動態の予測手法の確立を目指す。

平成 30 年度の間目標としては、様々な生理学的薬物動態 (PBPK) モデルから導かれるデータが人工知能に学習させることができるかどうかを検証し、実用化に向け適切と判断できる生理学的薬物動態 (PBPK) モデル及びインビトロ試験系を選択することとした。

また平成 31 年度の間目標として、インビボ肝毒性情報がある学習用化学物質について、ラット及びヒト肝代謝酵素による代謝安定性試験を実施し、ラット及びヒトの薬物代謝の種差情報を取得する。ヒトの体内動態を予測可能な生理学的薬物動態 (PBPK) モデルのプロトタイプを開発することとしている。

3) 実施内容

ア. 実用化にむけた生理学的薬物動態モデルおよびインビトロ試験系 (Caco-2) の選択と妥当性の検証 (毒性との関連性)

PBPK モデル構築の学習用化学物質の選択において対象化合物の多様性の確認のため、ランダム 50,000 物質 196 種の化学構造記述子を計算し、二次元平面の 25 区画のケミカルスペース上に可視化した。この結果から学習用物質の選択と妥当性を検証した。

以下の AI-SHIPS における PBPK モデルスキーム (図 4) においてヒトおよびラット腸由来細胞を用いて種々化学物質の膜透過係数を比較し、ヒトとラットの腸膜透過性予測と亜急性毒性との関連や種差を検討した。具体的には前述のケミカルスペースを網羅する化合物について、生理的 pH 勾配を再現したヒト Caco-2 およびラット IEC-18 細胞を用いて、膜透過係数を実測し、分子量、消化管と血液 pH を規定した分配係数を用いた重回帰分析による膜透過係数計算値と実測値を比較した。

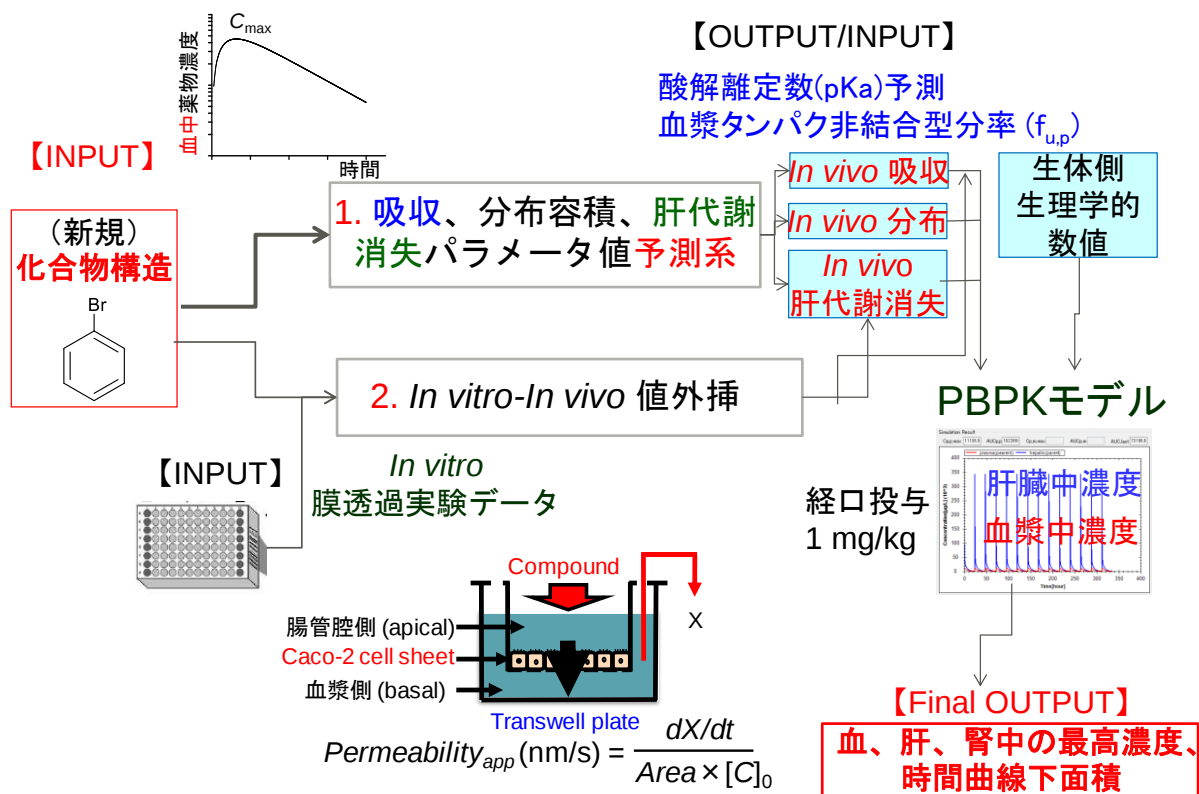


図 4 PBPK モデルスキーム

この結果、14 種化合物のヒト Caco-2 細胞膜透過係数実測値は、ラット腸細胞でのそれらと良好に相関した ($r=0.90$, 図 5)。一方でラットおよびヒト由来の両細胞における膜透過係数と肝 NOEL 値との間には、それぞれ有意な相関関係が認められた。多様性を考慮して選出した一般化学物質の膜透過係数実測値は、分子量、消化管と血液 pH を規定した分配係数を用いた重回帰分析による膜透過係数計算値と比較的良好に相関した ($r=0.69$)。

以上より、PBPK 予測モデル構築のためのインビトロ試験 (Caco-2) と膜透過の予測モデルの妥当性が確認された。またヒト由来の Caco-2 細胞を用いた膜透過係数は、ラット腸細胞の透過性を反映可能であり、さらに一般化学物質の経口投与後の消化管吸収性は、肝への毒性影響を担う主要な因子の一つであることが示唆された。

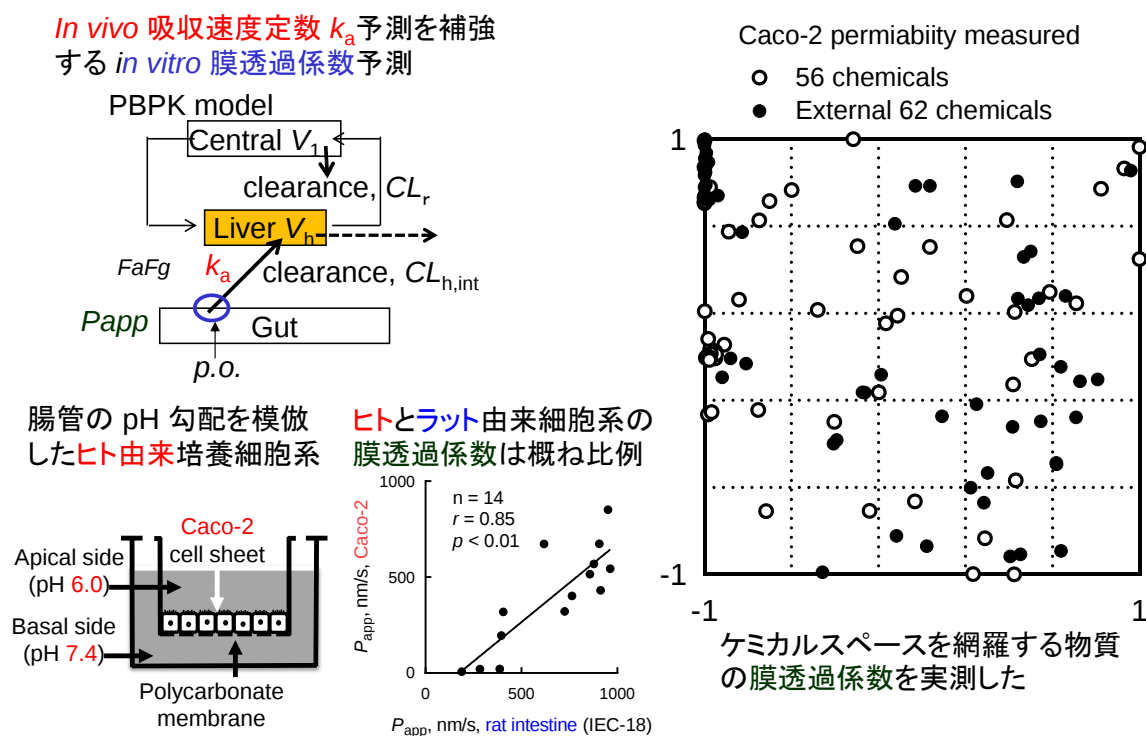


図 5 生理学的薬物動態モデルのインビボ吸収速度定数 k_a 予測に関連するインビトロ膜透過係数 P_{app} の実測

イ. 生理学的薬物モデル (PBPK) プロトタイプ構築と検証および代謝予測について

選択された化学物質についてその化学構造や物性値等から当面、未知の一般化学物質のラット血中あるいは組織中濃度を推定する PBPK のプロトタイプモデルを構築し、計算値を算出してこれらの値と臓器毒性との関連を検討した。並行して、モデルのさらなる精度向上に向けて実測値を取得するため、追加対象物質のラットへの投与、血液と尿試料の採材および濃度解析を実施した。一方で、ヒトの PBPK モデル構築を想定してヒト肝細胞キメラマウスにおける動態データも解析した。スチレンとフタル酸エステル類のヒトでの経口投与時の体内動態を動物データに基づき予測し、PBPK モデルの精緻化にはヒト肝移植マウスからのデータの外挿が有効であることが示唆された。

ラット PBPK 予測の学習用化合物についてはオクタノール/水分配係数、酸解離定数、タンパク非結合率、肝移行率等を計算により求めた。ア. と同様に、学習用化合物の多様性を確認し、ラット血中濃度推移情報を得た 159 物質（うち実測 16 物質）から経口投与後の吸収、分布、代謝消失を規定するパラメータ値をあてはめ、計算手法によって決定した。すなわち物性値あるいは ADME 文献値をを活用し、部分的最小二乗回帰分析により、物質の吸収速度定数、分布容積、及び肝代謝消失速度を予測するモデルを構築した。これらを入力値として、対象物質の血中と臓器中の最大濃度 C_{max} と血中濃度下面積 AUC を算出し、肝、および腎最小毒性量 LOEL 報告値と比較した。この結果、8 種の肝毒性化合物の肝中 AUC 値と肝最小作用量 LOEL 値の間には有意な逆相関が認められた ($r=0.75$)。このことから、化学物質の肝毒性発現には、それらの肝移行性が関与することが示唆された。加えて 6 物質の腎 LOEL 値は、単回仮想投与時の 1 日あたりの推定腎中 AUC と有意な逆相関を示した ($r=-0.81$)。上述の PBPK モデルにア. の対象化学物質のヒ

ト腸由来 Caco-2 細胞膜透過実測値から外挿した吸収率を加味した改良モデル出力値は、文献報告値とより近似する傾向が認められた。以上、物性値等から計算科学的に一般化学物質のラットおよびヒト体内動態を規定する指標値を推定する本手法構築において、化合物の膜透過実測値を加えることにより、生体内動態をさらに精度よく予測しうるものと示唆された。

前述の PBPK 予測モデルについてその精度を検証した。この結果、59 種化合物の PBPK モデル出力値である 1mg/kg 投与後のラット血中 AUC 値および C_{max} 値は、米国環境庁 EPA が推奨する、PBPK モデルを介さないコンパートメントモデル出力値とそれぞれ有意な相関が認められ ($r=0.96-0.98$)、今回構築されたモデルがプロトタイプとして妥当であることが確認された。分子量、 $\log D_{apical}$ 、 $\log D_{basal}$ および溶解度を説明変数として用いることで、化合物のインビトロ膜透過係数を高精度かつ簡便に予測可能となった。

4) 結論と今後の展開

物性値等から計算科学的に一般化学物質のラットおよびヒト体内動態を規定する指標値を推定する本手法は、化合物の膜透過実測値を加えることにより、生体内動態を精度よく予測しうるものと推察された。現在、PBPK モデル用入力値として個別物性値や記述子を利用し、さらに高精度の予測システム構築を検討中である。今後も、これら化学物質が吸収された後の生体内動態と化学物質由来の臓器毒性との関連をさらに検討する計画である。

一方で化学物質の代謝予測については予測手法構築のため一部調査に着手しておりラット及びヒト肝代謝酵素による代謝安定性試験のための代謝安定性試験は静岡県大で取得している。これらの情報を基にラット及びヒトの薬物代謝予測手法の開発を検討する予定である。

(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

1) テーマの背景

化学物質の毒性は、究極的にはその化学構造から決定されるにも関わらず、肝毒性をはじめとする全身毒性を、化学物質の部分化学構造や物理化学的性状等から予測する手法は確立されていない。これは、予測に用いるための現在の化学物質プロファイリングが不完全であるためと考えられる。そこで本事業では、化学物質の生体分子反応性や細胞応答性を評価してそれらを新たなプロファイルとすることで、現在のインシリコ手法の弱点を補い、将来的に化学構造からの毒性予測を可能とする基盤を構築する。

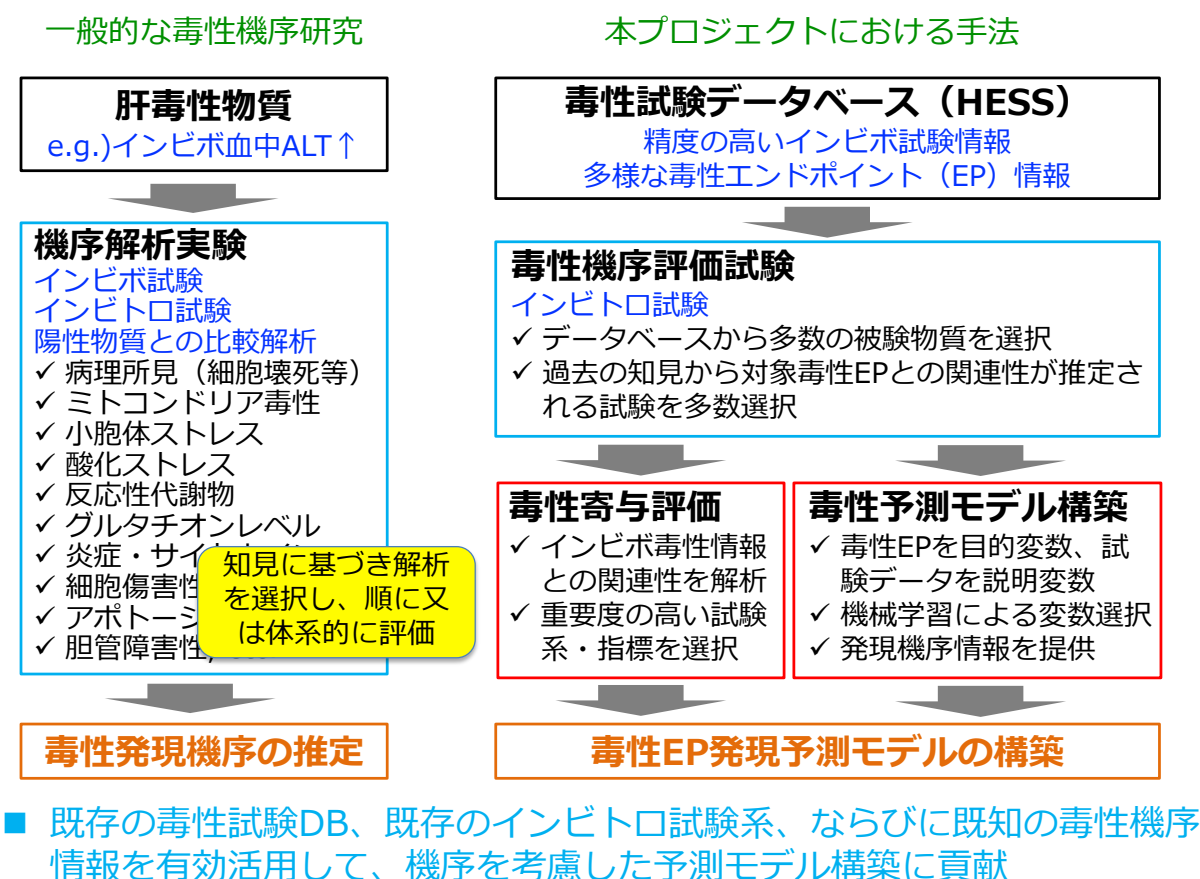


図 6 毒性予測モデル構築のためのインビトロ評価戦略

2) 目標

平成 30 年度の中間目標としては、様々なインビトロ毒性試験データが人工知能に学習させることができるかどうかを検証し、実用化に向け適切と判断できるインビトロ試験系を選択することとした。

2) 実施内容

被験物質の選択

本プロジェクトの最終ゴールは、人工知能を利用した毒性予測モデルの構築である。人工知能（機械学習）により予測モデルや判別モデルを構築するためには、「正解」のデータが必要である。

したがって、本プロジェクトで実施するインビトロ試験においては、毒性試験データが入手可能な物質を被験物質とすることが必要である。そこで本研究では、経済産業省及びNEDOの受託研究により構築され、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）により公開、運用されている有害性評価支援システム統合プラットフォーム（Hazard Evaluation Support System Integrated Platform：HESS）を活用することとした。HESSには、ラットの反復投与毒性試験データ及び毒性機序情報（毒性知識情報データベース）及び代謝知識情報データベースが搭載されており（図7）、化審法に関連するラット28日間反復投与毒性試験の試験結果を抽出可能である。本プロジェクトではラット28日間反復投与毒性試験データがあり、市販されている220物質をHESSから選択し、被験物質とした。

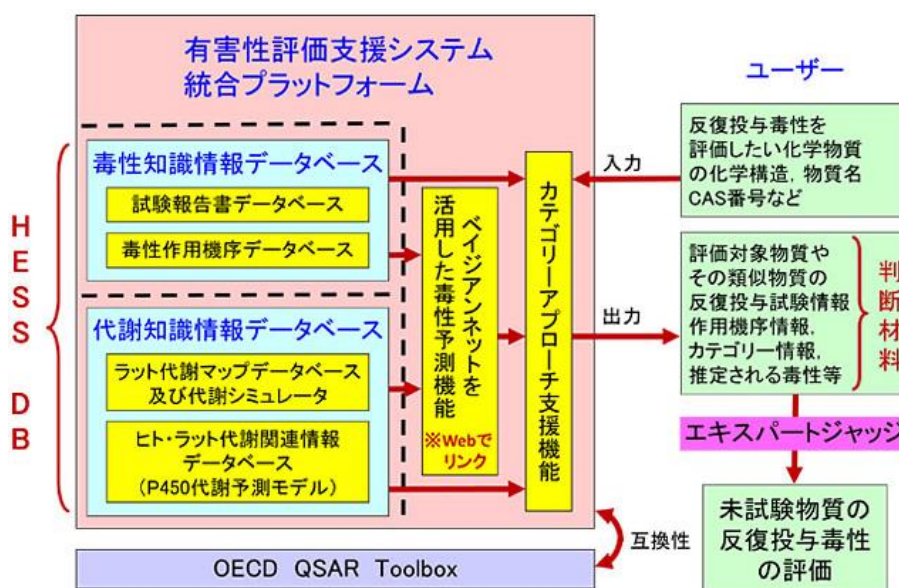


図7 有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) の構成

（出典：NITE ウェブサイト）

インビトロ試験の選択

ある化学物質の毒性発現機序を明らかにするためには、インビボで認められた現象から機序を推定し、それに関連すると考えられる項目について、インビボ及びインビトロ試験でその関与を検証し、最終的に得られた結果から総合的に判断してインビボでの毒性発現機序を推定するのが一般的である（図8）。上記で選択した被験物質については、ラット反復投与毒性試験結果を参照することでインビボ毒性の情報が得られる。しかし、反復投与毒性試験でしばしば認められる所見の多くについては毒性発現機序が不明であること、また被験物質の種類が多く、多種多様な毒性が対象となることなどの理由より、特定の機序を推定して試験を選択することは現実ではない。本プロジェクトでは、まず肝毒性を対象とすることから、既知の肝毒性情報に基づき現在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網羅的に実施することとした。

具体的には、化学物質による毒性発現の初発反応（Molecular Initiating Event：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、さらにより毒性影響（Adverse Outcome）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インビトロ試験を選択した（図 9、表 1）。

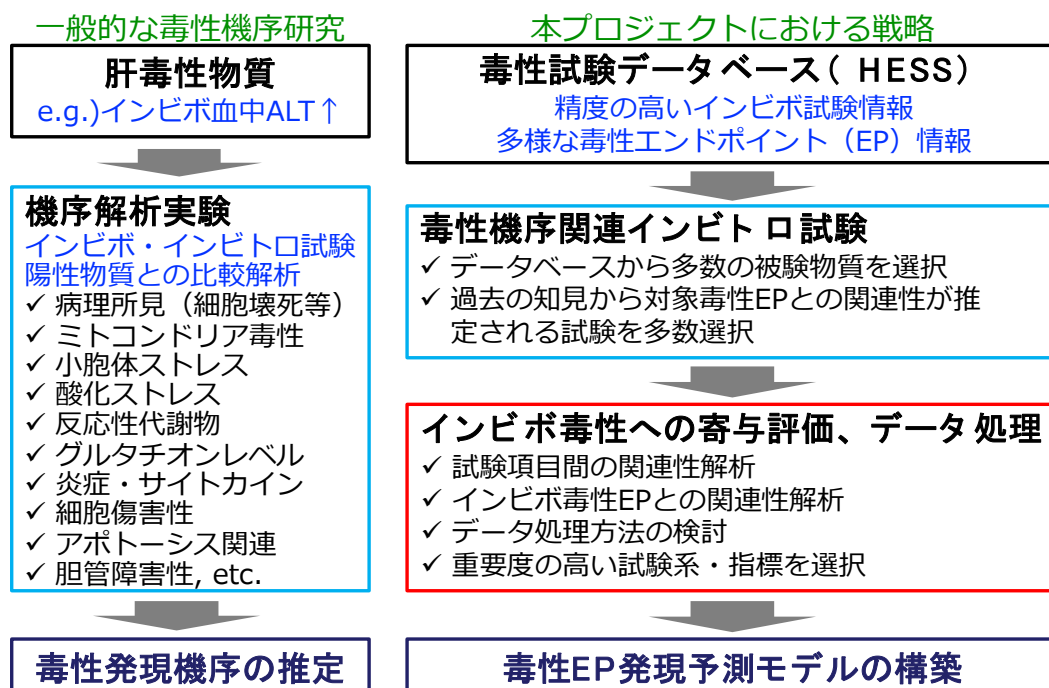


図 8 毒性予測モデル構築のためのインビトロ評価戦略

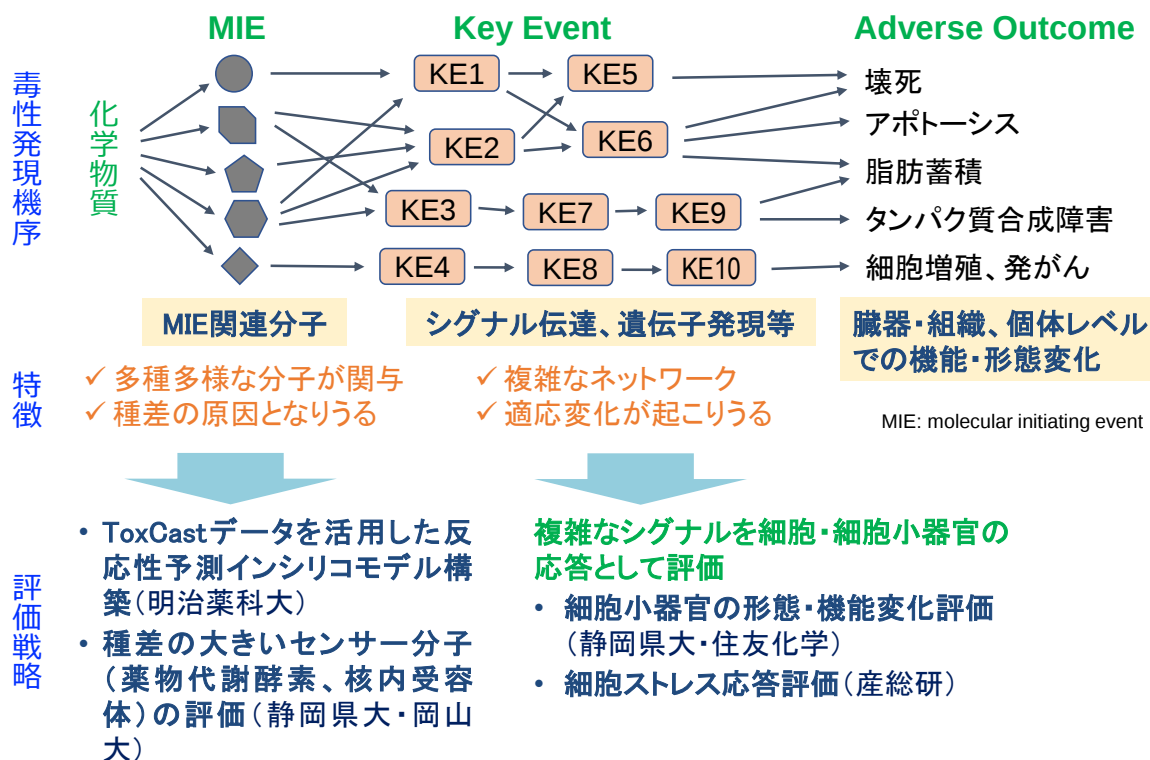


図 9 インビボ毒性予測モデルの構築に向けた細胞内イベントの評価

表 1 AI-SHIPS におけるインビトロ試験

項目		内容	標的分子・項目	方法の概要
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	・ ラット P450 (7 種: CYP1A1、1A2、2B1、2C6、2D1、2E1、3A2) ・ UGTs (総活性)	P450/UGT-Glo システム (Promega) を利用した阻害試験
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	・ ラット MRP2 ・ ラット BSEP	ベシクルと蛍光基質を利用した阻害試験
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	・ ラット核内受容体 (7 種: AHR、PXR、CAR、PPARα、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
エ.	肝細胞傷害	ラット肝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) ・ GSH 含量	初代培養ラット肝細胞を利用した曝露試験
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	・ 核 ・ 細胞質 (F-actin) ・ ミトコンドリア ・ 中性脂肪 ・ リン脂質	初代培養ラット肝細胞を利用したハイコンテント (蛍光イメージング) 解析
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	・ 酸化ストレス (Nrf2) ・ 炎症応答 (NF-κB) ・ DNA 損傷 (p53) ・ 小胞体ストレス (ATF6) ・ 熱ショックストレス (HSF)	HepG2 安定発現株を用いたレポーターアッセイ
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	・ マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞の炎症応答 (NF-κB/ AP-1)	安定発現株を用いたレポーターアッセイ
ク.	遺伝子発現	(ヒト・)ラット細胞におけるマイクロアレイによる遺伝子発現	・ 遺伝子発現量	ヒト由来肝細胞及び初代培養ラット肝細胞を用いたマイクロアレイ

インビトロ試験の概要

ア. 薬物代謝酵素等反応性評価 / イ. 胆汁酸トランスポーター

薬物代謝酵素試験に関しては、創薬スクリーニング等でもよく用いられている発光基質を利用したハイスループット評価系を活用した。通常これら試験は薬物代謝酵素の阻害作用の評価に利用されている。肝毒性を考慮した試験としては、代謝に伴う反応性代謝物の測定がしばしば行われているが、それら試験では代謝物の構造を決定する必要があったり、放射標識した基質が必要であったりすることから、本プロジェクトのように多種多様な多数の被験物質を対象とする評価には適切な試験系とは言えない。そこで、酵素阻害の多くは競合的阻害で起こること、反応性代謝物は肝毒性関連タンパク質だけでなく薬物代謝酵素自身とも結合して活性を阻害する場合が多いことから、本プロジェクトでは阻害試験を応用して薬物代謝酵素との反応性を評価することとした。実際には Promega 社から発売されているルシフェリン誘導体を基質とし、各組換え P450 による代謝に対する被験物質の阻害作用を評価した後、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 (%) を算出した (図 10)。UGT に関しては、ラット肝ミクロソームを酵素源として、多くの UGT 分子種の共通基質であるルシフェリン誘導体を用いた試験系により被験物質の阻害作用を測定した。P450 試験では阻害により発光強度が減弱し、UGT 試験では

阻害により発光強度が増強する。陽性・陰性の判別の際には、溶媒対照群の実験誤差を考慮し、残存活性 85%を閾値として設定した。

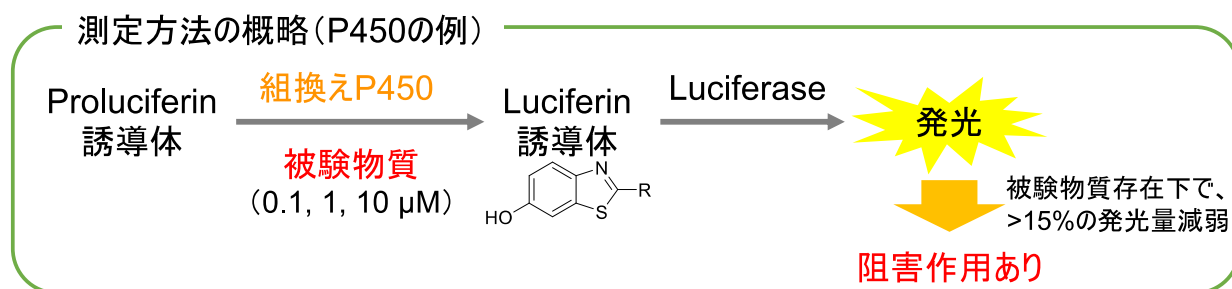


図 10 発光基質を利用した P450 阻害試験の概要

ウ. 核内受容体活性化作用評価

核内受容体活性化作用の評価においては、静岡県立大学で構築したレポーターアッセイ (AHR) 又はワンハイブリッドアッセイを利用した (PXR 及び PPAR α)。AHR では、ラット肝癌由来 H4IIE 細胞が内因性のラット AHR を発現していることを利用し、AHR 応答配列をもつルシフェラーゼレポータープラスミドを作製し、H4IIE 細胞にこれを導入後、被験物質処置によるルシフェラーゼ活性の変動を測定した。ラット PXR 及びラット PPAR α についても当初同様のアッセイを検討したが、薬物による応答性が著しく低かったことから、ワンハイブリッドアッセイを構築した。本試験では、ラット PXR 又はラット PPAR α のリガンド結合領域と、酵母由来転写因子 GAL4 の DNA 結合領域の融合タンパク質を発現するプラスミドを作製し、これと GAL4 結合配列を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを培養細胞に導入後、被験物質処置によるルシフェラーゼ活性の変動を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) により測定した。

エ. 肝細胞傷害 及びオ. 細胞小器官影響評価

ラット肝細胞傷害性及び細胞小器官に対する影響は、初代培養ラット肝細胞を利用して評価した。ラットからコラゲナーゼ還流法により単離した肝細胞をプレートに播種し、一定期間培養後にプレートを2群に分け、半数を細胞傷害性試験用、半数を細胞小器官影響評価用として、同一の被験物質セットを6濃度で48時間曝露した。ラット肝細胞は単離ごとに生物活性が異なるため、それらの影響を避けるために、両試験を同一ロットの細胞で行うとともに、各アッセイに一定のクライテリアを設定し、それを満たさない実験データは採用しないこととした。細胞傷害性評価は市販のキットを利用して、乳酸脱水素酵素 (LDH) の培地中への放出量の測定 (LDH アッセイ: CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit、Promega) 並びに生細胞に由来する ATP 量の測定 (CellTiter-Glo アッセイ、Promega) により行った。いずれも多くの研究機関で用いられている細胞毒性評価である。細胞小器官に対する影響評価は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、被験物質曝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 CELLOMICS ARRAYS CAN VTI HCS Reader (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できる。本研究では、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) で染色した。

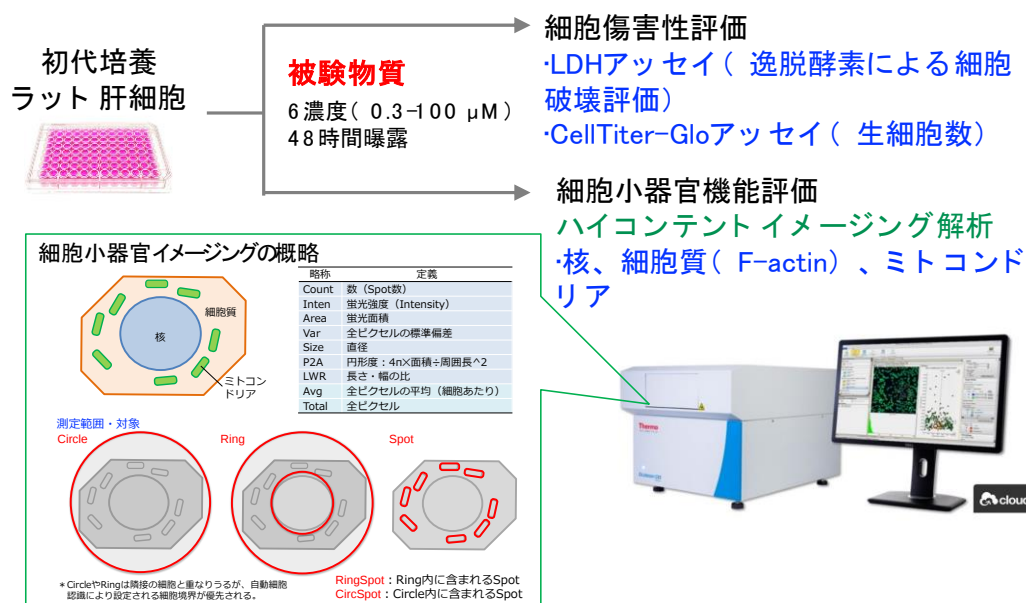


図 11 初代培養ラット肝細胞を利用した細胞傷害性及び細胞小器官影響の評価の概略

カ. HepG2 細胞を用いたストレス応答のリアルタイム発光測定

多色発光レポーター導入 HepG2 細胞等を用い、HESS に登録されている化学物質 (以下、HESS 化合物と記載) のストレス応答シグナル伝達経路に対する影響をリアルタイム発光測定により解析し、毒性予測システム構築のための細胞生存率、シグナル伝達に対する影響 (活性化或いは不活性化の大きさ) とその時間等を数値化した情報を収集した。



図 12 多色発光レポーター導入 HepG2 細胞を用いたストレス応答のリアルタイム発光測定

キ. マクロファージ様 RAW264.7 細胞を用いた免疫細胞への影響解析

肝臓に対する化学物質の影響を理解するには、肝臓内の免疫細胞に対する直接的な作用も考慮することが重要である。即ち、化学物質が肝臓内のマクロファージ細胞（Kupffer 細胞）等の免疫系細胞を直接活性化して炎症を惹起し、肝細胞へ間接的に影響することも十分に想定される。そこで、肝臓内の免疫細胞（Kupffer 細胞）の代替として、簡便にアッセイ可能なマウスマクロファージ様株化細胞 RAW264.7 を用いた解析を実施した。

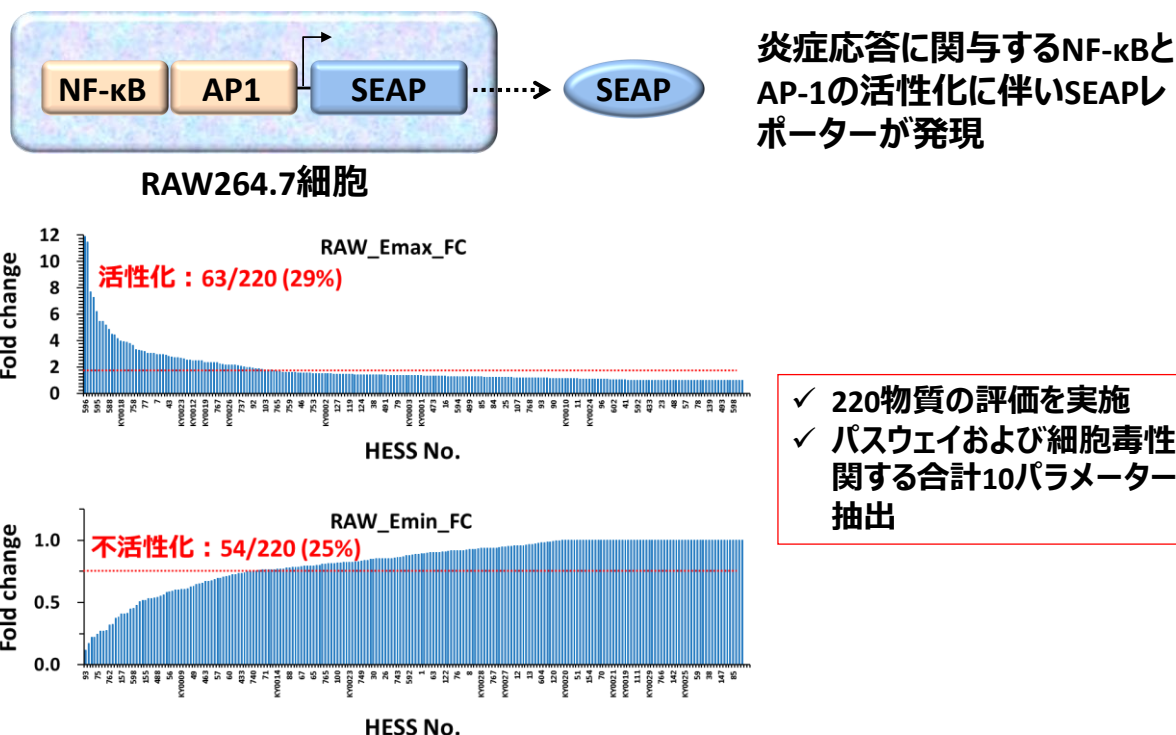


図 13 マウスマクロファージ様 RAW264.7 (RAW-Blue) 細胞を用いた免疫細胞への影響解析

ク. 細胞内応答の網羅的遺伝子発現量データの取得及び毒性発現メカニズムの解析

ヒト由来肝細胞である HepaRG®細胞及びラット初代培養肝細胞を用いて、遺伝子発現量データを取得するための試験・評価系を構築した。ラット初代培養肝細胞のプロトコルでは、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た。HepaRG®では 10 物質、ラット初代培養肝細胞では 72 物質について、遺伝子発現量データを取得した。取得したデータを用い、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を実施した。

3) 具体的成果

様々なインビトロ毒性試験データが人工智能に学習させることができるかどうかを検証し、実用化に向け適切と判断できるインビトロ試験系を選択するという平成 30 年度の間目標に対し、2) で示したインビトロ試験系の選択を完了した。

また実際に、中間評価時点までに 220 物質について下記のインビトロ試験を実施した。

インビトロ試験の実施にあたっては、試験プロトコル検討のためのワーキンググループを設置し、プロジェクト全体での統一化を図った。実施したインビトロ試験について、得られた成果を実験項目ごとに以下にまとめる。

ア. 薬物代謝酵素等反応性評価 / イ. 胆汁酸トランスポーター

上記で選択した 220 種の被験物質について、ラット薬物代謝酵素 8 種(CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2C6、CYP2D1、CYP2E1、CYP3A2、UGT) 及びトランスポーター1 種(ラット MRP2) に対する阻害作用を評価した。ラット P450 及び UGT に対しては 3 濃度 (0.1、1、10 μ M 及び 1、10、100 μ M) で評価を行い、最も残存活性が低かった濃度の値を、また MRP2 に対しては 1 濃度 (100 μ M) で評価した結果を図 14 に示す。

残存活性 85%未満を陽性(作用あり)と判定した場合、いずれかの酵素またはトランスポーターに阻害作用を示した物質の割合は 6%から 33%であり、対象分子により作用する被験物質数は大きく異なった。全体としては、110 物質 (50%) がいずれかの P450 又は UGT に対して阻害作用を示し、2 物質は全 8 種の酵素に対して阻害作用を示した。ラットの P450 の基質特異性はヒト酵素に比べて明確になっていないこと、またヒトとラットでは同じサブファミリーの酵素でも基質特異性が異なることから、ヒト P450 との比較には限界があるが、医薬品代謝に対する寄与は低い、毒性発現の関与が知られている CYP1A1 や CYP2B1 に対する阻害作用を示す物質の数が多く、ヒトでは医薬品代謝への寄与が大きい CYP2D 酵素に対して作用した物質が少なかったことは、今回用いた被験物質が医薬品等とは異なる化学構造的特徴を示すことを意味している可能性がある。

残存活性の最低値(最大影響量)とそれらの 3 濃度の総和のデータを算出し、研究開発項目②の予測モデル開発に用いることとした。

残存活性値



図 14 被験物質の薬物代謝酵素及びトランスポーターに対する阻害作用

ウ. 核内受容体活性化作用評価

核内受容体活性化作用に関しては、これまでに AHR、PXR 及び PPAR α に対する作用を評価した。被験物質は 3 濃度 (10、30、100 μ M) で処置した。得られた結果を図 15 に示す。本評価系では培養細胞を利用しているため、細胞毒性が強い物質では適切な評価を行うことができず、グレーで示した部分に関してはデータを得ることができなかった。そのため、本評価系では 3 濃度における相対活性の最大値を算出し、研究開発項目②の予測モデル開発に用いることとした。

溶媒対照群の実験誤差を考慮し、被験物質処置にレポーター活性が 2 倍以上となった場合を活性化作用あり (陽性) と判定したとき、陽性率は受容体により異なり、PXR では 35% と比較的高かったのに対し、AHR では 11%、PPAR α では 14.5% と比較的低かった。これまでに、PXR のリガンド選択性は低く、PXR は脂溶性が比較的高い多種多様な化学物質により活性化されることが報告されており、得られた結果は過去の知見と一致するものであった。AHR については多環芳香族炭化水素やダイオキシン類により活性化されることが知られているが、今回陽性を示した物質では、必ずしもこれまでに提唱されている構造を有さないものが多かった。これまでに化学物質による AHR 活性化作用を網羅的に評価した報告はほとんどなく、本研究成果は化学物質の AHR を介した毒性の発現機序の解明にも有用と思われる。PPAR α については脂肪酸 CoA エステルや中性脂肪低下薬であるフィブラート類が代表的リガンドとして知られているが、PPAR α に関しても構造活性相関研究の報告はなく、本研究成果は有用な情報となりうると考えられた。

レポーター活性値 (相対値)

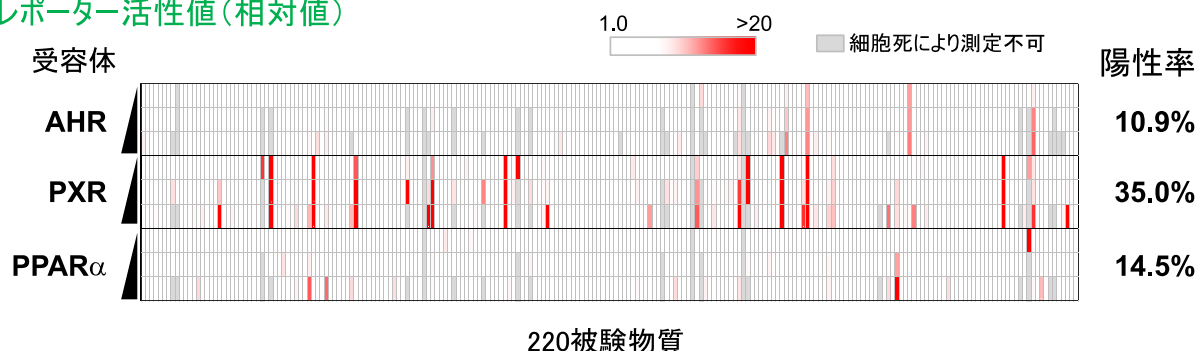


図 15 被験物質の核内受容体活性化作用

エ. 肝細胞傷害 及びオ. 細胞小器官影響評価

肝細胞傷害性と細胞小器官影響は、初代培養ラット肝細胞を被験物質で 48 時間処置し、評価した。肝細胞傷害性は LDH アッセイと CellTiter アッセイの 2 つで評価し、細胞小器官に関してはこれまでに核、細胞質 (F-アクチン) 及びミトコンドリアの HCA 解析により評価した。被験物質は 6 濃度 (0.3、1、3、10、30、100 μ M) で処置した。HCA 解析では、蛍光強度値の算出方法により、核では 10 パラメータ、細胞質 (F-アクチン) 及びミトコンドリアでは 16 パラメータが得られる。また、6 点濃度におけるこれらの値から、最大値 (MAX)、最小値 (MIN)、相対積算値 (AUC)、絶対積算値 (AUCabs)、最大無影響濃度 (NOEC) を算出し、研究開発項目②の予測モデル開発に用いることとした。

図 16 には、細胞傷害性データの AUC 及び HCA 解析の AUCabs の値を示した。実験誤差等を考慮して 0.6 の閾値を設定し、陽性・陰性の判定を行った。また、図 16 では各パラメータの強弱

を赤色で示した。細胞傷害性の2つのパラメータでは14%~19%の物質で変動が認められた。また、核では最大37%、ミトコンドリアでは最大75%、細胞質では最大45%の物質で陽性と判定された。いくつかのパラメータでは被験物質処理による変動が全く認められなかったことから、これらパラメータは細胞小器官影響評価には不適切と考えられた。また、各パラメータ間の相関性を解析したところ、多くのパラメータ間で有意な相関が認められたが、その程度には大きな差が認められた。細胞傷害性の2つの測定項目に関しては、一般に比較的相関が高いと考えられているが、相関係数は0.69程度であり、非常に強い相関が認められる訳ではないことが示された。また両パラメータともに核やミトコンドリアに比べて、細胞質のパラメータのいくつかと高い相関を示し、特にLDHアッセイとの相関係数は0.85を超えていた。これらの結果は、LDHアッセイが細胞死に伴う内在性酵素であるLDHの漏出を測定しているのに対し、CellTiterアッセイは生細胞で産生されるATP含量を測定することから、その測定対象の違いを反映していること、また、今回細胞質の指標として測定しているF-アクチンが細胞骨格とより関連していることに起因すると考えられた。

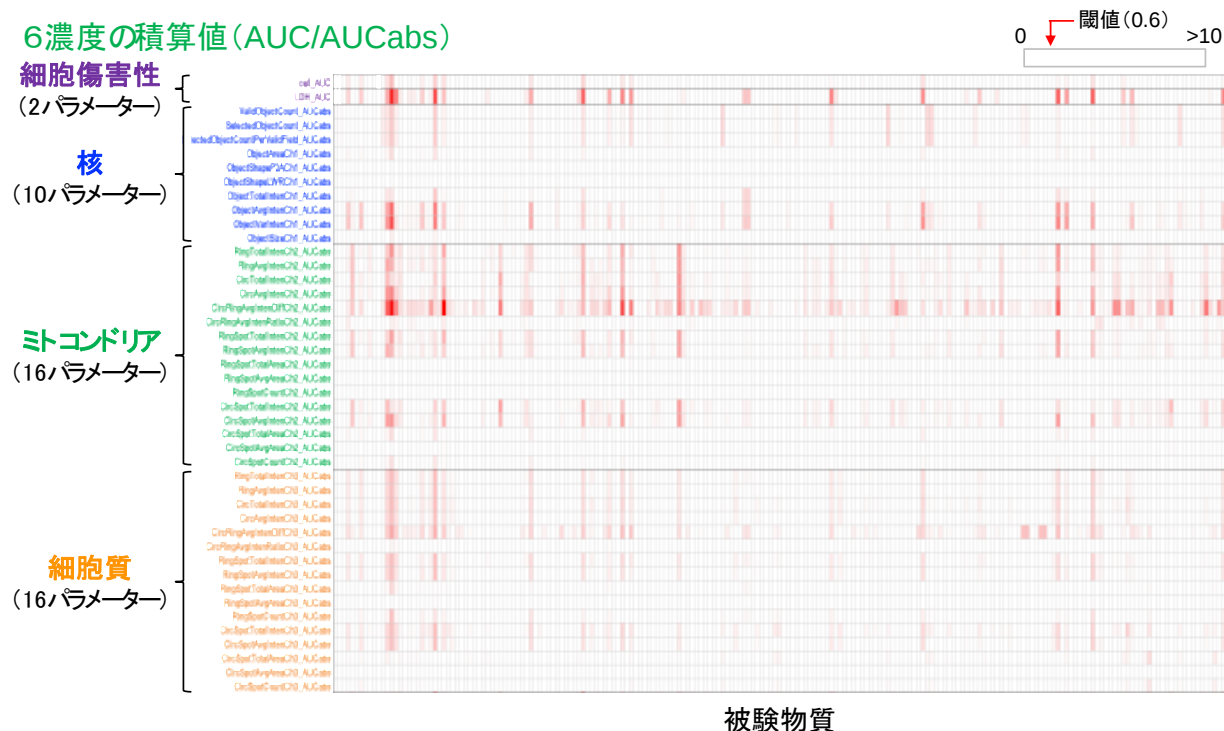


図 16 被験物質のラット肝細胞傷害性及び細胞小器官影響

カ. HepG2 細胞を用いたストレス応答のリアルタイム発光測定

ストレス応答の解析については、最初にストレス応答評価用発光細胞の樹立を試みた。解析対象とするストレス応答および転写因子については、既存研究およびTox21等を参考に、細胞毒性発現と深く関わる7種類のパスウェイおよび転写因子を選定した(表2)。

表 2 選定したストレス応答および転写因子

ストレス応答	転写因子
酸化ストレス	Nrf2
炎症応答	NF- κ B
	AP1
小胞体ストレス	XBP1
	ATF6
熱ショックストレス	HSF
低酸素ストレス	HIF1 α
DNA 損傷	p53
サイトカイン応答	STAT3

続いて図 12 に記載のスキームでこれらのストレス応答および細胞毒性の変化を光で評価可能な HepG2 安定細胞株 9 種類を樹立した。次に、酸化ストレス応答 (Nrf2)、炎症応答 (NF- κ B) および小胞体ストレス応答 (ATF6) 評価用 HepG2 細胞に HESS 化合物 220 物質を曝露し、各ストレス応答および細胞毒性の動的变化を測定し、得られた測定結果からストレス応答に対する影響の閾値 (活性化、不活性化および無影響の 3 値) を決定した。その結果、供試した 220 物質のうち、144 物質 (65%) はいずれかのストレス応答に影響 (活性化或いは不活性化) するが、76 物質 (35%) は影響しないことが明らかとなった。続いて、予測システムに入力するためのパラメーターとして、当該試験法の最大の特徴である時間情報を加味するよう、キネティクスデータから、図 17 に示す細胞生存率 (細胞毒性) およびストレス応答に対する 10 種類のパラメーター (AUC、最大値、無影響濃度) を抽出し、研究開発項目②の予測モデル開発に用いることとした。

最も高い値FC値を示した濃度のデータ

生存率		パスウェイ	
前半	後半	前半	後半
AUC1	AUC2	AUC1	AUC2
		Emax1	Emax2

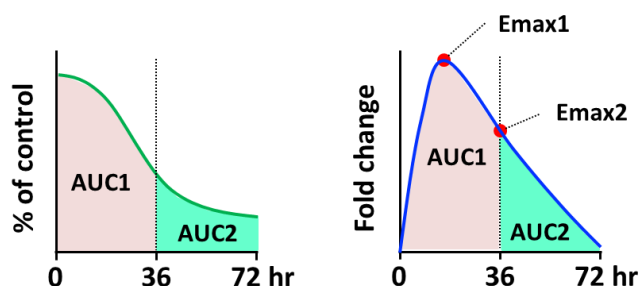
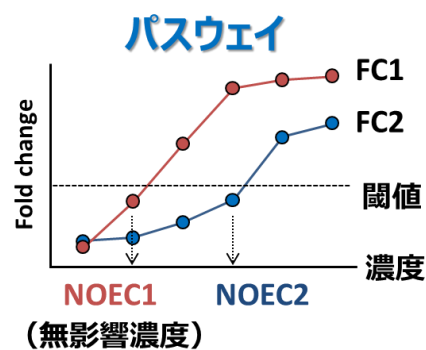


図 17 細胞生存率(細胞毒性)およびストレス応答に対する 10 種類のパラメーター

キ. マクロファージ様 RAW264.7 細胞を用いた免疫細胞への影響解析

マクロファージ細胞 (RAW264.7 細胞) に対する HESS 化合物の影響に関しては、220 物質を曝露し、48 時間後の培地中の SEAP 活性および WST8 による細胞生存率を測定し、得られた結果からマクロファージ細胞活性化の指標となる fold change 値の閾値 (活性化、不活性化および無影響の 3 値を決定) を決定した。その結果、供試した 220 物質のうち、63 物質 (29%) はマクロファージ細胞を活性化する一方、54 物質 (25%) は不活性化することが明らかとなった。続いて、予測システムに入力するためのパラメーターとして、図 18 に示すレポーター活性、細胞生存率 (細胞毒性) および fold change 値に対する 10 種類のパラメーター (最大値、最小値、IC50 値、無影響濃度) を抽出し、研究開発項目②の予測モデル開発に用いることとした。

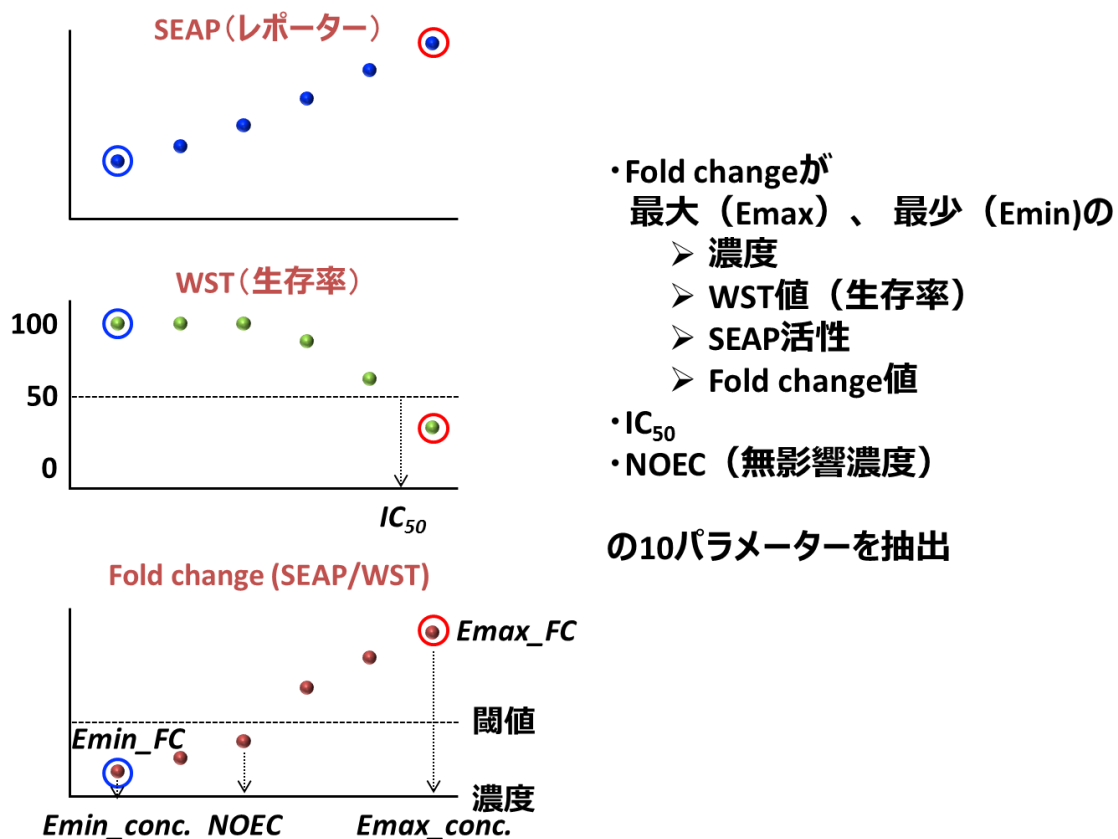


図 18 レポーター活性、細胞生存率（細胞毒性）および fold change 値に対する
10 種類のパラメーター

ク. マイクロアレイによる細胞内応答の網羅的遺伝子発現量データの取得及び毒性発現メカニズムの解析

既存情報の整理

肝臓における毒性発現に関与するイベントについて、既知情報を調査、整理した。細胞障害、炎症に関する整理結果の一部を図 19 に示す。細胞障害、炎症を引き起こす際、複数の経路が存在しており、本事業では主に、オンコーシスによる細胞壊死 (Oncotic necrosis) に関する複数の MIE 及び KE を測定対象としている。例えば、ある被験物質が生体内に取り込まれると、CYP の酵素反応により活性物質が生成され、そのセンサーとなる Nrf2-Keap1 シグナルが活性化、GST 等が誘導される。しかし、この適応反応が継続されると、ER ストレスやミトコンドリアの機能不全がおこり、細胞壊死や炎症応答につながる。このような毒性発現に至る多様なプロセスについての既知見を用いた整理をさらに進めており、これらの情報を予測システム構築の考え方に反映させる。

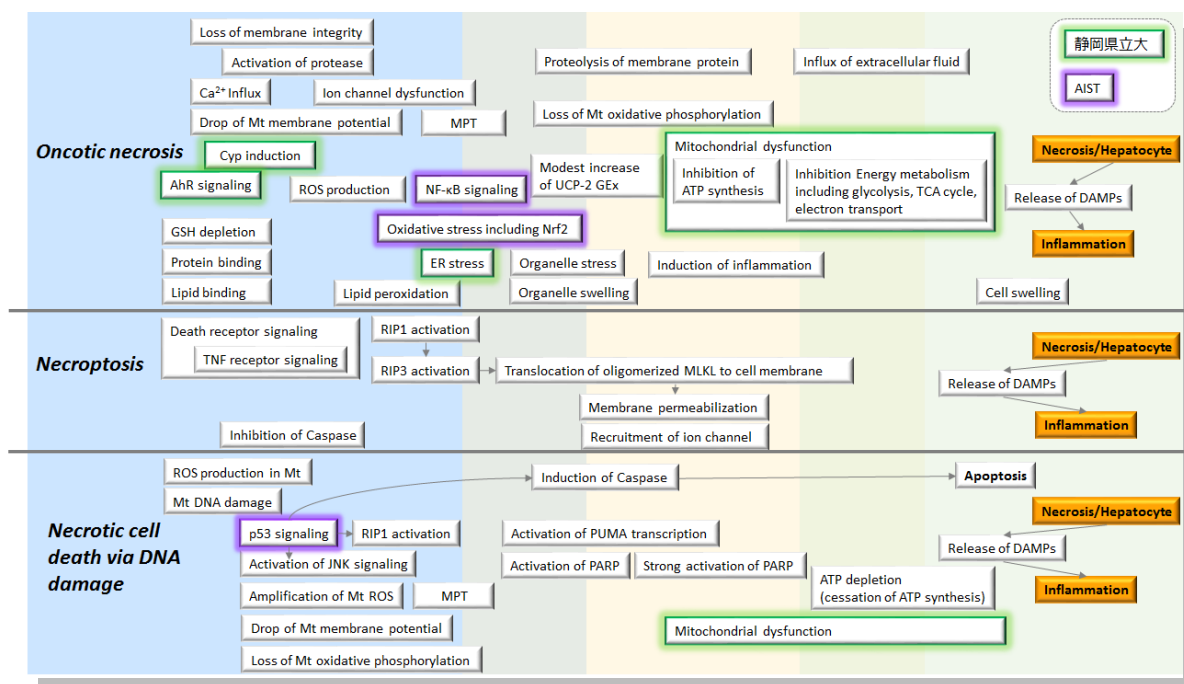


図 19 LV01 細胞障害・炎症:細胞壊死に関連すると考えられるイベントの例

MPT: Mitochondrial membrane Permeability Transition、DAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns

UCP: Uncoupling Protein (Mt 脱共役タンパク質)、PUMA=p53 up-regulated modulator of apoptosis

PARP=Poly (ADP-ribose) polymerase、MLKL: Mixed lineage kinase domain-like (RIP の基質)

動物試験データと in vitro 試験データ等の比較による比較解析

経済産業省 Tox-Omics プロジェクト (5 カ年) あるいはトキシコゲノミクスプロジェクト (以下、TGP) の Open TG-GATEs から公開されているラット肝臓の 1~28 日間の強制経口投与による動物試験データ及び遺伝子発現量データと、本事業で取得した各種インビトロ試験データ及びインビトロの遺伝子発現量データを用いて比較解析を行い、各種インビトロ試験データと毒性発現の関連性等を検討した。

国内では染料・顔料中間体に使用されている 4,4'-dichlorodiphenyl sulfone (DCDPs) の解析例を以下に示す。SD ラットに DCDPs を 28 日間混餌投与した試験で、DCDPs の濃度が高かったのは脂肪組織>>>肝臓>腎臓>脳、脾臓、肺との報告がある。また、DCDPs は CYP1A 種を誘導するとの報告があり、ラットに DCDPs を静脈内投与した試験において代謝物として 3-hydroxy-4,4'-dichlorodiphenyl sulfone が同定されている。Tox-Omics において雄の CrI:CD (SD) ラットに DCDPs を 250 mg/kg/日 (高用量群) で 1、7、14 あるいは 28 日間強制反復経口投与して得られた肝毒性に関わる血液生化学及び病理学的所見の概要を表 3 に示す。投与 1 日から肝臓相対重量の増加、剖検における肝臓の腫大が見られ、投与 7 日からは肝臓絶対重量の増加及び剖検における肝臓の白色化、病理組織学的検査における核小体明瞭化及びくもり硝子変性を伴う小葉中心性肝細胞肥大並びに限局性肝細胞壊死が見られていた。また、投与 14 日からは ALT の高値も認められていた。

表 3 血液生化学及び病理学的所見の概要

Finding	Grade	250 mg/kg/day			
		1D	7D	14D	28D*
ALT	—			↑	↑
γGTP	—				↑
Total cholesterol	—				↑
Total protein	—				↑
Albumin	—				↑
Absolute Liver weight	—		↑	↑	↑
Relative Liver weight	—	↑	↑	↑	↑
Liver enlargement	—	↑	↑	↑	↑
Whitish region in liver	—		↑	↑	↑
Hypertrophy with prominent nucleoli and ground glass appearance/ hepatocyte/ Centrilobular	Moderate		1/4	2/4	3/4
	Severe		3/4	2/4	1/4
Necrosis/ hepatocyte/ Focal	Slight		3/4		3/4
	Moderate			2/4	1/4

*:5 例中 1 例死亡

前述したように、DCDPs はラットにおいて CYP1A 種を誘導するとの報告があり 3、in vivo 系となる投与後 28 日までのラット肝臓の遺伝子発現データを Ingenuity® Pathways Analysis (IPA®) により解析した結果においても、28 日まで継続的な AhR シグナリグングパスウェイの活性化（ただし経時的に減弱）及び CYP1A1 の誘導が認められていた。AI-SHIPS の in vitro 系においては、DCDPs が CYP1A1 の基質となることが示されている。in vivo 系の遺伝子発現量データの解析において、Nrf2-mediated oxidative stress response の Canonical pathway が投与後 28 日までの間、継続的に活性化されており、Tox21 アッセイでも Nrf2 を介したストレス応答が認められていた。また、AI-SHIPS の in vitro 系において非実質細胞における NF-κB/AP-1 の活性化が認められており、炎症性サイトカインが誘導されていた可能性が示唆された。さらに、ラット初代培養肝細胞を用いた AI-SHIPS におけるハイコンテンツアナリシスの結果、ミトコンドリア及び細胞質への影響が認められていた。このように、薬物代謝酵素の誘導、AhR シグナリングの活性化、Nrf2 を介した酸化ストレス応答及びミトコンドリアへの影響等が認められていたことから、DCDPs の 28 日までの投与で認められた肝細胞の壊死（Necrosis）の要因として、図 20 で示したオンコーススによる細胞壊死 (Oncotic necrosis) に類似した経路の可能性が示唆された。このようにこれら一連の遺伝子発現量データの解析結果は本プロジェクトで得られた HCA 等の in vitro 実験結果とも符合し、有益な毒性機構解明に活用できることが示された。

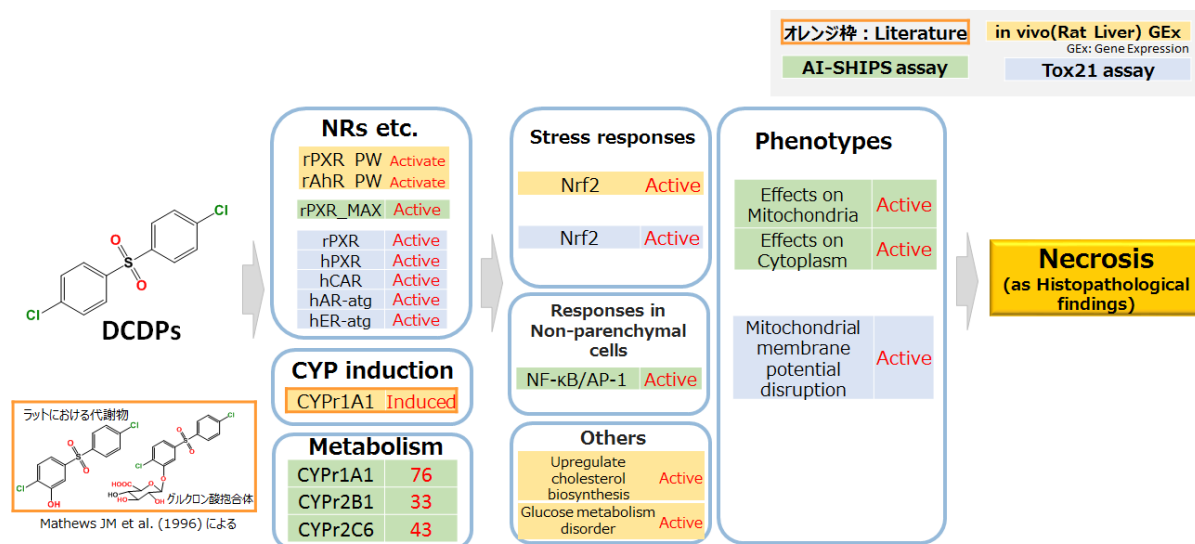


図 20 DCDPs における毒性試験データと in vitro 試験データ等の比較結果

実験系の違い (in vivo vs. in vitro 及び ヒト vs. ラット)

In vitro 系における細胞応答等を用いて in vivo における毒性予測を行う際、細胞の種間差を含めた実験系及び細胞系の差異と予測の限界性を把握することを目的としてこれまでに実施した遺伝子発現量データの解析のうち、TGP においてデータ取得された 5 物質の in vivo 系 (雄 SD ラット肝臓) 及び in vitro 系 (ラット及びヒトの初代培養肝細胞) の比較解析を実施した。すなわち①in vivo 系及び in vitro 系 (ラット及びヒト) で共通、②in vitro 系 (ラット及びヒト) では検出できない、さらには③種差の可能性があるパスウェイや細胞機能を検討した。この結果②の細胞機能としてコレステロール生合成系の活性化が 2 物質 (D, L-Ethionine, Tetracycline) で共通であり、前述の DCDPs でも in vitro 系においては検出できない細胞機能であった。③については 3 物質 (Tetracycline、2-Acetamidofluorene、Diethylnitrosamine) で共通してヒト初代培養肝細胞においてのみに認められた eIF2 (Eukaryotic Initiation Factor 2) シグナリング/タンパク質合成系の活性化があった。これらの情報は、予測システム開発構築のみならず今後ヒトの毒性を予測するうえで重要な示唆を与えるものと判断され、さらに調査を継続する。

4) 今後の展開

今後、被験物質の拡充を行いつつ評価を継続し、インビトロ試験系予測モデル、インビボ EP 予測モデル構築に貢献する各パラメーター間、インビボ毒性との関連性をさらに解析し、パラメーターの最適化と、重要な評価系・パラメーターの抽出を行う。

研究開発項目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）

1) 背景

化学物質にはその化学構造をはじめとする様々な物理化学的特性があり、各化学物質の有する毒性については、どの特性が寄与しているかは明らかになっていない。その一方で、毒性評価に関しては世界標準の評価軸が存在し、それぞれの化学物質の有する毒性についての情報はデータベースとして保存されている。そこで、各化学物質の構造情報や物理化学特性のうち、毒性に寄与する特性（記述子）の選定、およびそれらの記述子から導出される毒性のルール抽出を実施することによって、従来の動物実験を必要としない毒性類推手法の基盤技術を確立する。

2) 目標

第一に既存データベースとして散在する化学物質の構造情報、核内受容体・ストレス応答パスウェイ等の活性データ、物理化学特性の情報とそれに付随する動物実験に基づく毒性情報を一元化する。これにより、毒性発現に寄与する特性を選定するとともに、化学物質の特性が寄与する毒性の種類も明確にする。次に、選定した特性と既知の毒性間に存在するルールを深層学習等人工知能技術によって明らかにする。さらに、明らかにされたルールを元に新規化学物質の特性から、その化学物質の発現しうる毒性を高精度に類推する情報基盤技術を確立する。最終的には本研究で構築した情報基盤技術を研究開発項目①で得られる生体メカニズムと融合することで、現存する毒性判定実験に代わる化学物質の生体への影響予測基盤プラットフォームとして構築することを目指す。

平成 30 年度の間目標として、既存の毒性学論文やインビトロ試験データ、HESS に搭載されている化学物質の構造式や動物実験による毒性情報を学習させることが可能な様々な人工知能から、実用化に向けて適切と判断できる人工知能を選択することとした。

3) 実施内容と具体的成果

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の構築

「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（以下、化審法）の「哺乳類を用いる 28 日間反復投与毒性試験」（OECD テストガイドライン 407）を予測するシステムの開発を目指し、肝毒性予測プロトタイプシステムの構築を行った。

具体的には、ラットの 28 日間反復投与毒性試験に基づく有害性クラスへの該当性を予測することを念頭に、HESS に収載されている全 441 所見（雄）の分析を行い、肝毒性のエンドポイントである下表の 6 所見にグルーピングを行い、各エンドポイントについて、「NO (A) EL $\leq$ 300mg/kg/day」、 「NO (A) EL $>$ 300mg/kg/day」の 2 区分に分類する二値判定モデルを構築することとした。また、「NO (A) EL $\leq$ 300mg/kg/day」となった場合について、「NO (A) EL $\leq$ 30mg/kg/day」、 「NO (A) EL $>$ 30mg/kg/day」の 2 区分に分類モデルを構築することとした。

表 4 プロトタイプシステムのエンドポイント

名称	グループ名	特徴・代表的所見
EP_LV01	細胞障害・炎症	細胞死関連所見
EP_LV02	肝機能低下	タンパク質合成低下など
EP_LV03	肝機能亢進	タンパク質合成亢進など
EP_LV04	胆管障害	胆管、胆道系障害
EP_LV05	肥大	肝臓、肝細胞肥大
EP_LV06	脂質代謝異常	肝内、血中脂質レベル増加

予測モデルのインプットとしては、従来のような構造情報とエンドポイントの毒性情報だけでなく、本プロジェクトで取得したインビトロ実験の各種活性値及び予測値、米国 Tox21 プロジェクトによって公開された活性スコアを記述子とした。

ただし、全物質を対象として各種のインビトロ試験を全て実施することは困難であることから、約 190 物質のインビトロ試験データを学習用データとして、機械学習を用いた予測モデルによりインビトロ試験の未実施物質の試験データを予測することで、データの補完を実施した（図 21）。

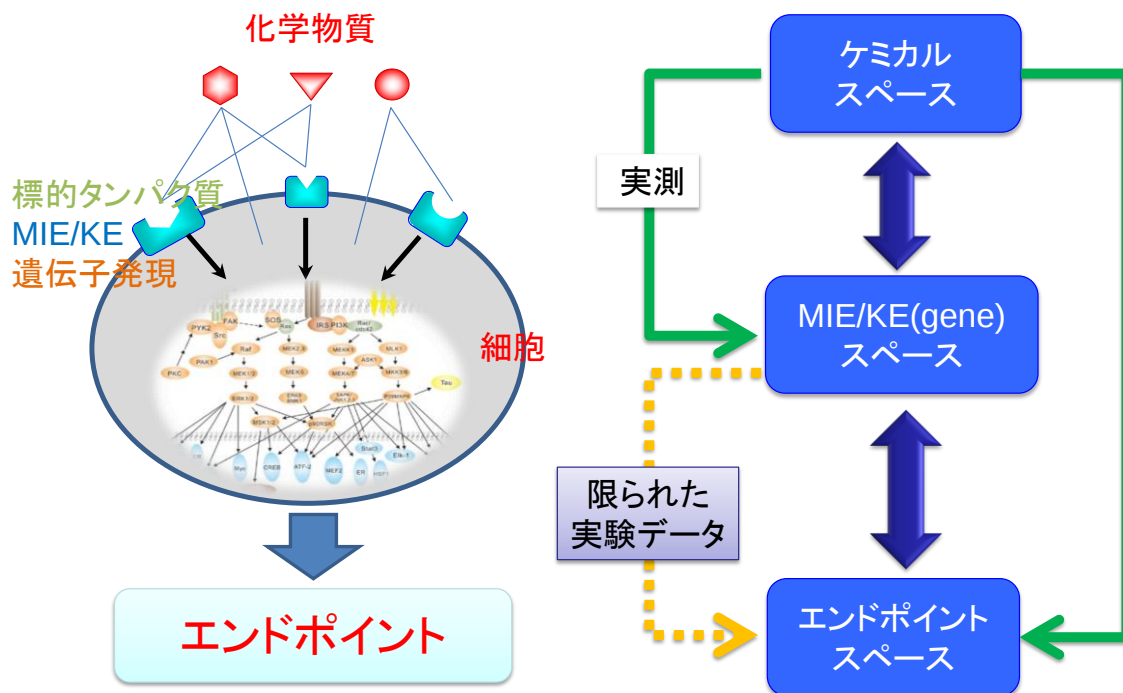


図 21 毒性予測モデルの構築イメージ

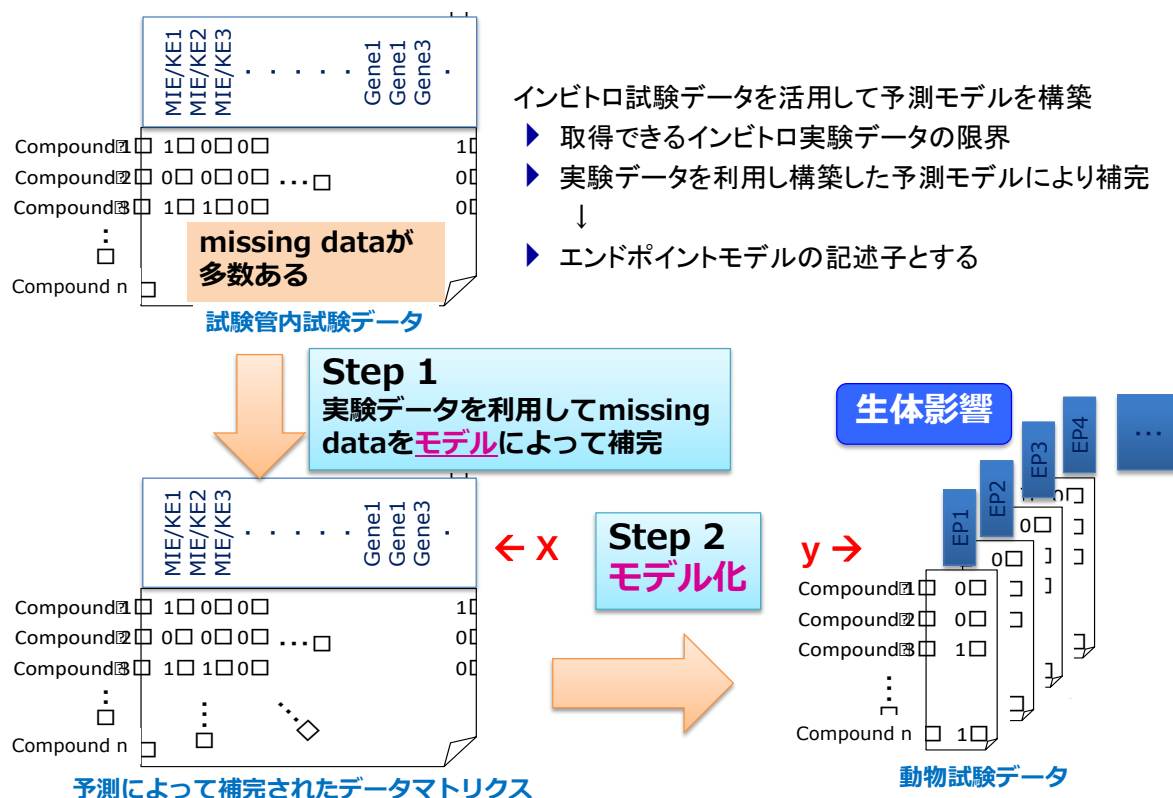


図 22 予測モデルによる実験値の補完イメージ

また、本事業で最終的に開発する予測システムの評価版として、実際の予測モデルを移動させ、化学メーカーなど第三者が任意の化合物を入力してその予測結果を確認できるものを提供することを目的として、プロトタイプシステムを構築した。システムの構成を図 23 に示す。

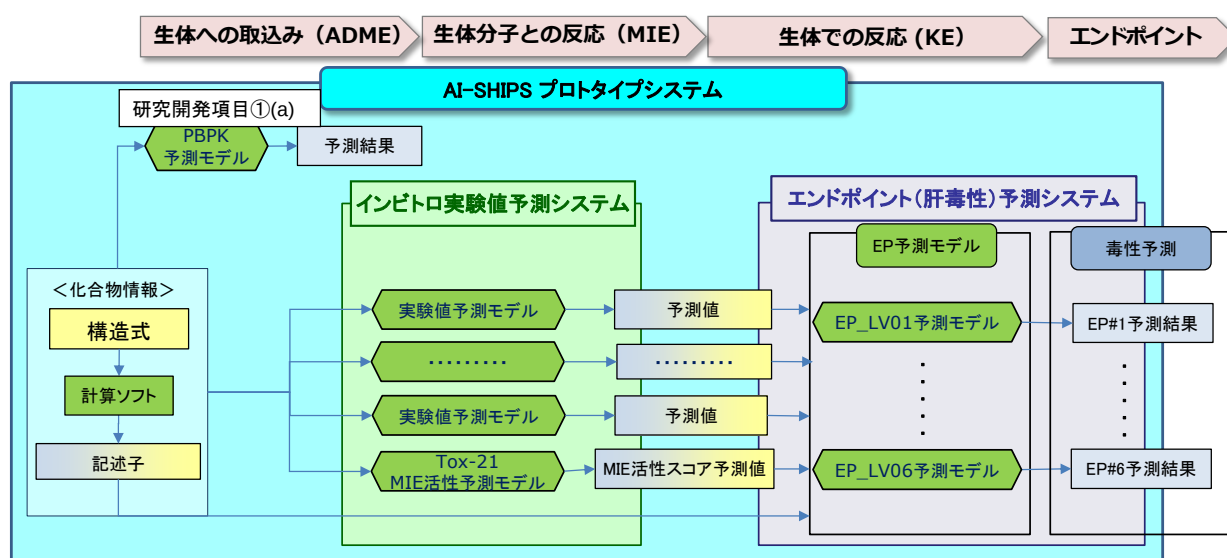


図 23 肝毒性の6つのエンドポイントを対象としたプロトタイプ予測システムの構成

化学構造式を入力とし、肝毒性エンドポイントの予測結果を出力する。予測の過程で、構造記述子の計算、多数のインビトロ実験値予測モデルの呼び出しが行われ、予測結果の表示や保

存、類似化合物の検索などの付加機能も有している。

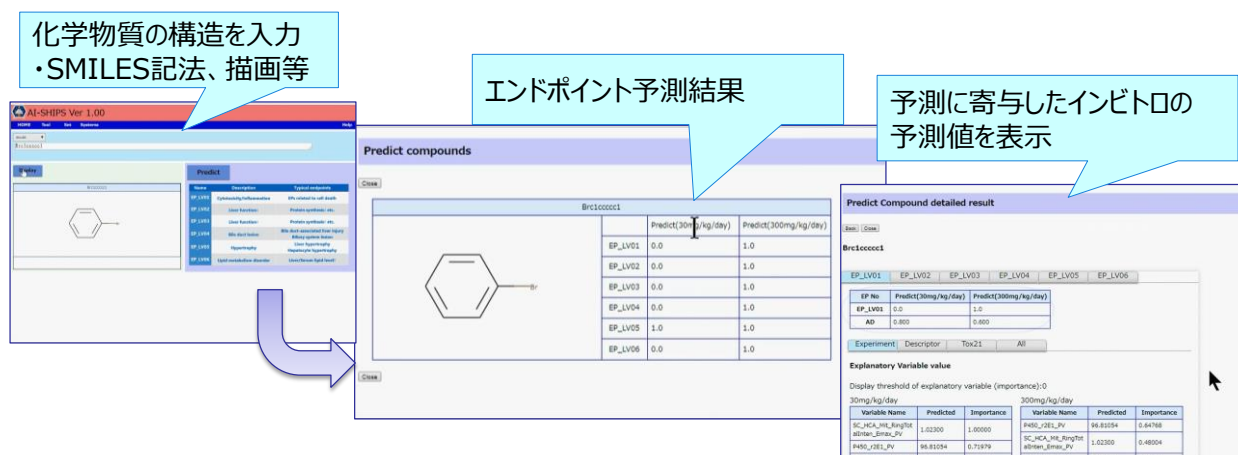


図 24 構築したプロトタイプシステムのユーザーインターフェース

イ. データマトリクスの構築

化学物質の構造情報と毒性情報が一元的に整理された既存データベースである製品評価技術基盤機構（NITE）で公開されている「有害性評価支援システム統合プラットフォーム（HESS）」から化学構造及びラット（雄）の 28 日間反復投与毒性試験及び 42 日間生殖発生併合毒性試験データに該当すると考えられるデータを抽出した。これに、構造記述子、物理科学的性状（図 25 ■に該当）、本プロジェクトで取得したインビトロ実験値（図 25 ○に該当）、インビトロ実験の予測値（図 25 の×に該当）、毒性値等の全データを一元的に収載するデータマトリクスを構築した。



図 25 データマトリクスのイメージ

ウ. インビトロ実験値予測モデルの構築

実施可能なインビトロ試験の件数に限界があるため、研究開発項目①(b)において平成 30 年度までに取得した約 190 物質のインビトロ試験データを学習用データとして、機械学習による予測モデル構築し、インビトロ試験の未実施物質の試験データを予測することで、データを補完した。

平成 30 年度までに構築したインビトロ試験モデルの予測対象を表 5 に示す。

表 5 構築したインビトロ試験モデルの予測対象

分類	実験内容	予測対象
薬物代謝酵素等 反応性評価	ラットシクロム P450 のインビトロ阻害 評価試験	rCYP: 7 種 × 1 パラメータ 1A1, 1A2, 2B1, 2C6, 2D1, 2E1, 3A2
	ラットグルクロン酸転移酵素(UGT)に 対する反応性	rUGT: 1 パラメータ
核内受容体活性 化作用評価	ラット Ah 受容体活性化作用の培養細胞 を用いた評価試験	rAHR: 1 パラメータ
肝細胞の化学物 質応答性評価	ラット肝細胞を用いたハイコンテンツ (HCA)解析	HCA: 4 種 × 3 パラメータ Celltiter, MEAN_RingTotalIntenCh2 MEAN_RingTotalIntenCh3 MEAN_ObjectSizeCh1
ストレス応答シグ ナル伝達経路に 対する影響評価	2 色ルシフェラーゼ導入 MI-MAC-HepG2 細胞を用いたリアルタ イム発光測定(酸化ストレス Nrf2)	Nrf2: 4 パラメータ
受容体反応性評 価	受容体反応性評価(Tox21)	Tox21: 50 × 2 パラメータ

エ. Tox-21-MIE 活性データによる予測モデルの構築

米国 Tox21 プロジェクトによって公開された約 1 万化合物に対する核内受容体及びストレス
応答パスウェイ (Tox21-MIE) アゴニスト・アンタゴニスト活性に対するレポーター遺伝子アッ
セイの結果を使用し、化学構造から MIE のアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を予測す
るための機械学習モデル (インビトロ予測モデル) を構築した。この予測性能は、同じデータ
ベースの一部を用いて NIH が主催した Tox21 data challenge 2014 における優勝者の成績と同
程度であることから、世界最高水準に達しているものと考えられる。

また、(1)の化学構造記述子を用いた従来法に加えて、新規性の高い次の 2 種類のモデル構築
法に関する調査・検討を行った。すなわち、(2)3D 分子画像入力システムに基づく深層学習、お
よび(3)ドッキングシミュレーションに基づく相互作用エネルギースコアを用いる方法を用い
て予測精度を検証した。この方法論は新規性が高く、やはり国内外に類似した研究例は存在し
ない。

さらに、エンドユーザー用のユーザーインターフェースを備えた Tox-21-MIE 活性スコア予測
システムを構築する実証実験を行った。本システムは化学構造を描画により入力する入力部と
種々の数値・グラフ表現によって予測結果を表示する出力部より構成される。さらに、化学空
間における入力化合物の位置と信頼性を可視化する機能、および MIE に関する活性データを検
索する機能を併せ持つ。

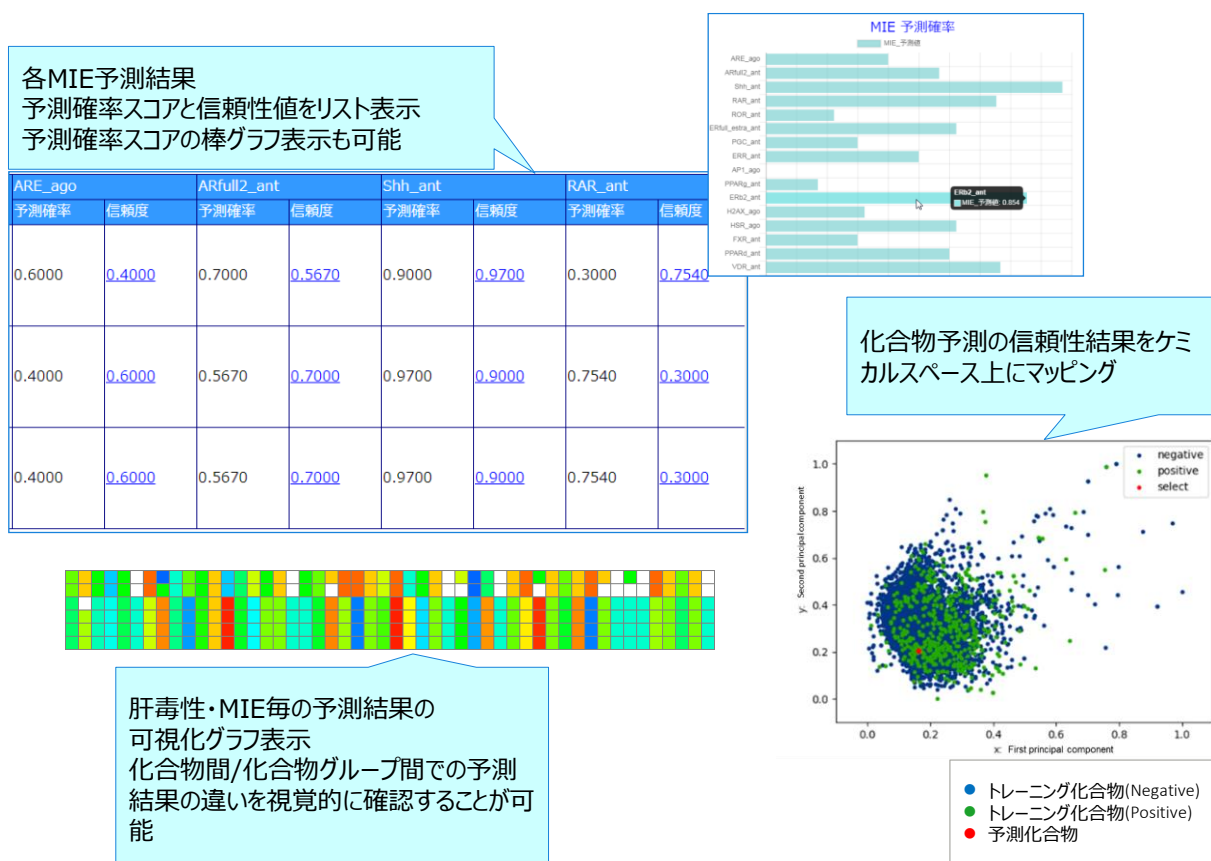


図 26 Tox-21 活性スコア予測システムのユーザーインターフェース

オ. KPI の策定

本事業で構築した肝毒性予測プロトタイプシステムの客観的評価を行うため、評価基準として Key Performance Indicator (KPI) を策定した。

4) 今後の展開

研究開発項目①(b)で得られたインビトロ実験値をもとに、さらにインビトロ実験値予測モデルを構築する。このほか、大規模副作用情報データベースを用いてヒトに対する各種毒性の QSAR 予測モデルを構築するなど、記述子の探索を行い、エンドポイント予測モデルの毒性予測性能の向上を目指す。データマトリクスについても、REACH 登録情報の活用や事業者の協力により、さらなるデータの拡充を行う。

また構築した各種予測モデルは、予測システムとして統合し、ユーザーとなる事業者のニーズを反映して実用化することを目指す。

(2) 事業アウトプット

事業アウトプット指標		
開発に取り組む各技術テーマ（①～④）のうち各年度の目標を達成したテーマ数		
①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細胞試験技術を活用した、遺伝子のシグナル伝達の測定手法の開発		
③遺伝子ネットワーク解析を活用した細胞内ネットワーク構造解析手法の開発、及び解析結果と動物試験データとの検証に基づく毒性発現メカニズムの解明		
④①～③を組み合わせた毒性発現パターン解析手法の開発、及び解析結果と動物試験データとの検証に基づく予測手法の開発		
指標目標値（計画及び実績）		
事業開始時（平成29年度）	計画：－	実績：－
中間評価時（令和元年度）	計画：4	実績：4
技術テーマ①	①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	・腸管吸収予測モデルおよびラット実測値等を用いた3パラメーター算出によりPBPK予測モデルを構築（研究開発項目①（a）に該当）
技術テーマ②	②細胞試験技術を活用した、遺伝子のシグナル伝達の測定手法の開発	・遺伝子のシグナル伝達や、薬物代謝酵素、核内受容体の反応性評価、蛍光セルイメージングシステムを利用した細胞応答性評価等のインビトロ試験系を確立（研究開発項目①（b）に該当）
技術テーマ③	③遺伝子ネットワーク解析を活用した細胞内ネットワーク構造解析手法の開発、及び解析結果と動物試験データとの検証に基づく毒性発現メカニズムの解明	毒性発現メカニズムの解明に向け、 ・②で開発したインビトロ試験系で試験を実施し、動物試験データとの比較解析を実施。 ・マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現量解析のためのプロトコルの構築、既存の動物試験から得られた遺伝子発現量データを含めて解析を実施。 （以上、研究開発項目①（b）に該当）
技術テーマ④	④①～③を組み合わせた毒性発現パターン解析手法の開発、及び解析結果と動物試験データとの検証に基づく予測手法の開発	①～③の成果を統合し ・インビトロ試験の実験値予測モデルを構築 ・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予測システムを構築 ・データマトリクスを構築 （以上、研究開発項目②に該当）
終了時評価時（令和3年度）	計画：－	実績：－

＜共通指標実績＞

論文数	論文の 被引用度数	特許等件数 (出願を含む)	特許権の 実施件数	ライセンス 供与数	国際標準へ の寄与	プロトタイ プの作成
131	－	0	0	0	0	○

3. 当省(国)が実施することの必要性

機能性化学物質は、I o Tに密接に関わる高性能電池や次世代半導体等のイノベーションの源泉であり、優れた機能性を有する化学物質をいかに迅速に、効率的に開発するかが我が国産業の競争力強化に向けた課題である。一方、機能性と毒性は不可分であり、機能性化学物質の開発段階から安全性を効率的に評価していく必要がある。また欧米では、化学物質の研究開発コストの削減のため、及び動物福祉の観点から、動物を使った従来の毒性試験に替わる試験（インビトロ試験及びインシリコ手法）の開発が進展している。

しかし、化学品メーカーには個社で高効率な安全性予測手法を開発するだけのノウハウはなく、また試験機関には既存事業を代替する予測手法の開発に対するインセンティブは働き難いなか、安全性予測手法の開発を業界共通の基盤として、毒性データを保有する国及び化学品メーカー、毒性発現メカニズム研究等に関する知見を有する大学・研究機関が共同して実施する必要があることから、国が取り組むべき事業である。

また、機能性材料の開発加速化による競争力強化、化学物質管理の推進及び我が国及び世界の重要課題であるエネルギー・資源問題の解決を両立する事業であり、優先度が高い。

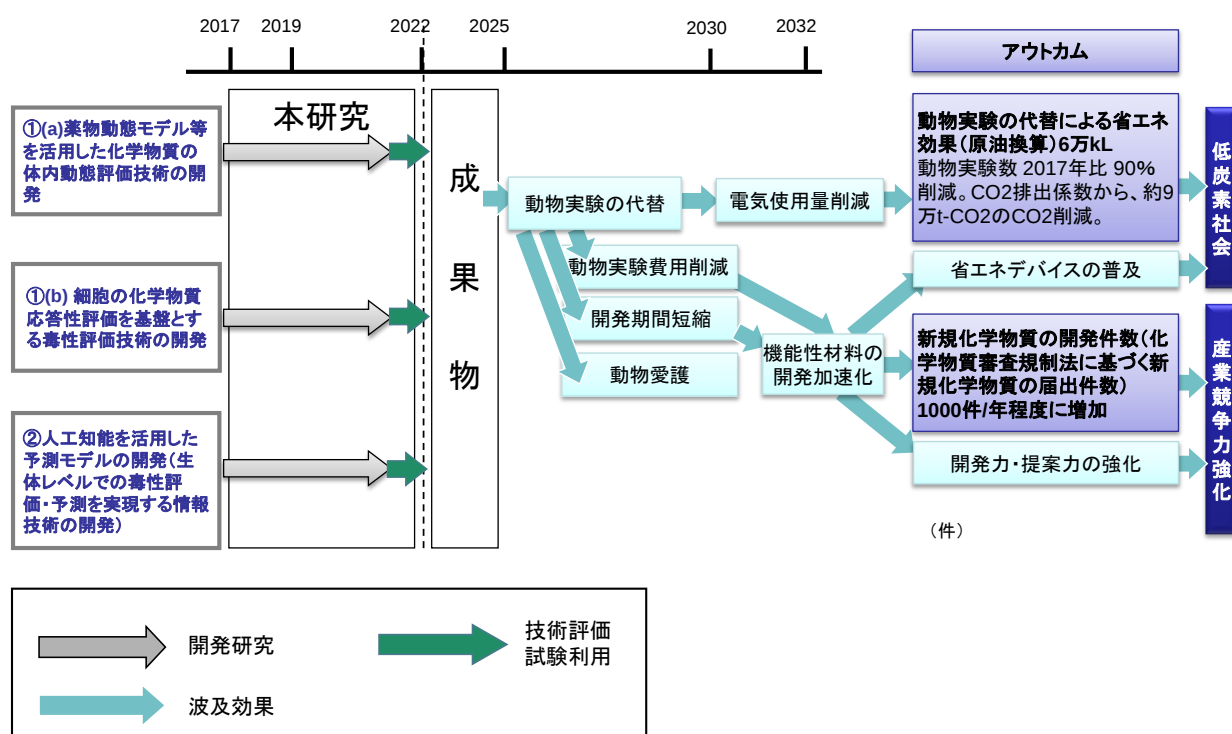
4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

事業アウトカムの達成時期としては、事業終了後 10 年後、動物実験数が現在より 90%削減され、開発段階での安全性評価のための動物飼育・実験施設での電気使用量が削減されることにより、約 9 万 t-CO₂ の CO₂ 削減を見込んでいる。また、コンピュータシミュレーションによる毒性予測によって、機能性化学物質の開発の効率化が図られることにより、国内の開発拠点が維持され、新規化学物質の開発力が向上し、本開発テーマ終了 10 年後の平成 43 年度には、新規機能性化学物質の開発件数が現在の約 600 件/年から 1000 件/年程度に増加することを見込む。

事業アウトカムの目標値達に向けて、2018 年度末までに PBPK モデル、肝毒性予測モデルのプロトタイプを構築した。また、肝毒性予測のプロトタイプについては、外部有識者の助言を受けつつ、客観的評価指標として KPI を策定した。

実用化に向けた取り組みとしては、海外での予測手法の導入状況等の調査を行い、事業終了後の実用化に向けた検討を進めている。

成果物のユーザーとしては、国内の機能性化学品の製造メーカーだけでなく、医薬、食品、農業等の研究開発や安全性評価、労働安全衛生上の管理を行う事業者や、大学等の研究機関、規制当局等が想定される。さらに、欧州、米国といった予測に基づく化学品の安全性評価制度を有する国では、予測手法のニーズは非常に高いことから、こうした諸外国における活用も想定される。



5. 研究開発の実施・マネジメント体制等

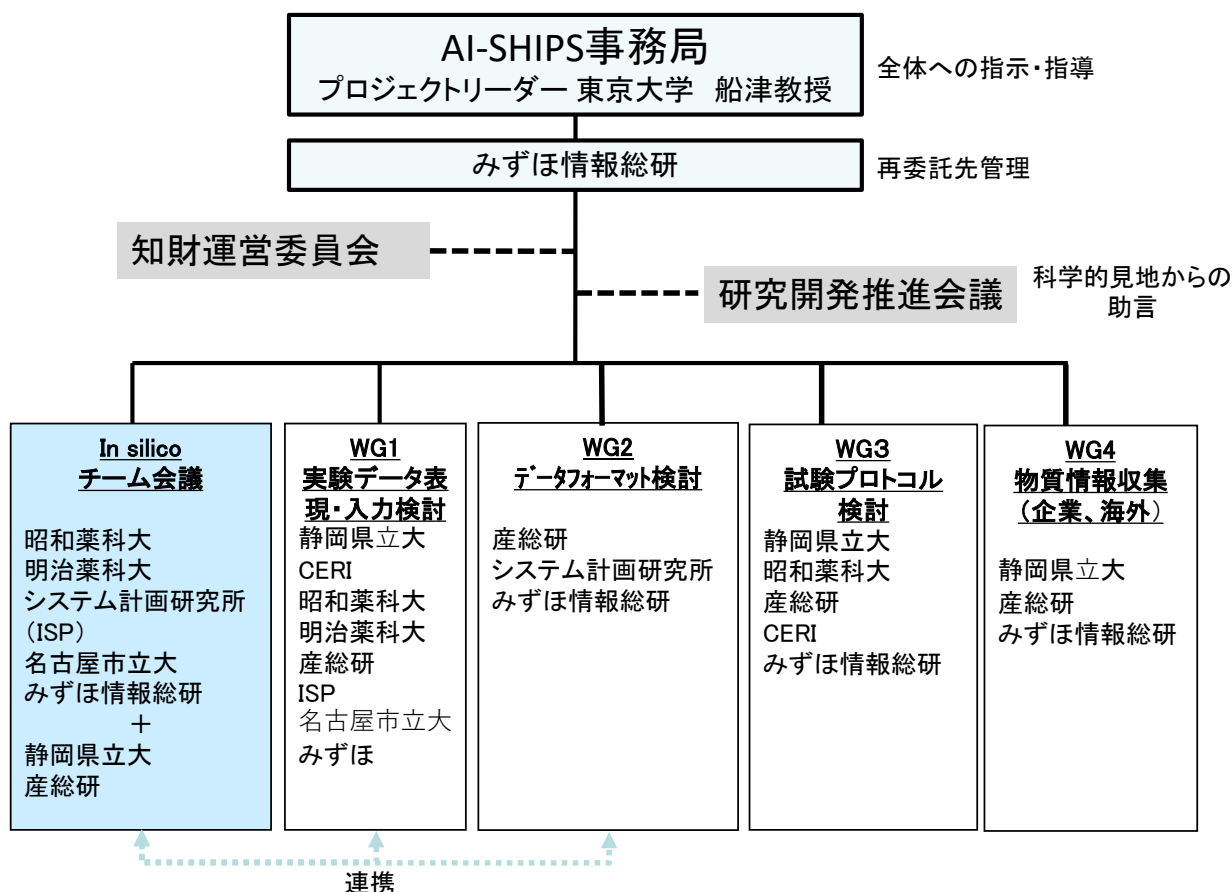
(1) 研究開発計画

2年目までに肝毒性を対象とした毒性予測システム（プロトタイプ）を構築。3年目4年目は、本モデルの精度を上げつつ、血液毒性・腎毒性についても予測対象範囲を広げる。

期間	事業の大枠の目標	具体的なアクション	
1 st STEP 2017－2018 (19)年度	 肝毒性予測プロトタイプシステム構築	1. 基本的な予測モデル(肝毒性)の構築 ・構造、物性から肝毒性予測までの入力記述子(実験データ等含む)の選択(ADME情報や作用機作情報等)と適正情報処理システム(アルゴリズム等)の開発、構築 2. 毒性メカニズム解明 ・シグナル伝達系、タンパク、核内受容体、細胞内複雑系毒性発現情報取得)	
2019 中間評価			
2 nd STEP 2019(20)-2021年度	 ・血液毒性、腎臓毒性等予測プロトタイプシステム構築 ・肝毒性予測システムの精緻化 ・肝臓、血液および腎臓毒性統合システムの構築	1. の血液毒性、腎臓毒性への応用展開 ・血液毒性、腎臓毒性作用機差情報の取得必要に応じ、実験データ取得。 2. 国際機関、企業取得情報の入力および上記、複雑系毒性情報の入力による 全体毒性予測システムの精緻化	企業等外部データ入力(組織構築)
PJ終了後 2022年度以後	 上記予測システムの精緻化アップディティン活用	新規情報の入力、メンテナンス規制への利用展開(既存化学物質評価等)	管理組織

(2) 実施体制

本事業全体のマネジメントを東京大学が行い、事業成果や進捗の確認は、全参画機関が出席する全体会合（年9回程度開催）にて行い、個別テーマについてはワーキンググループを設置し検討を行いつつ事業を実施した。また、研究開発推進会議（年2回開催）を開催し、外部有識者からの適切な指導、助言を受けた。



(3) コミュニケーション活動

本プロジェクトの研究開発に資する情報・知見を共有しその取り組みを国内外に発信するため、米国 EPA 及びイタリアのマリオネグリ薬理学研究所から3名の有識者を招聘し、国際シンポジウムを開催し、国内外の専門家や事業者等、100名以上の参加を得た。

また、企業からの安全性予測システム構築にむけた情報提供等協力とその体制の在り方および事業化を含めた安全性予測システムの在り方について関連業界団体を対象にAI-SHIPSプロジェクトにおける予測システムの研究開発の状況説明を行うとともに意見交換、要望聴取を実施した。

(4) 国内外の他者において実施されている類似の研究開発のマネジメント状況の比較

国内外で計算科学的手法を用いる毒性予測システムは数多く開発されておりこれらの予測システムは各国各機関、企業から有償、無償で提供されており一方では最近も多くの研究開発事例が報告されている。初期段階では発がん性、復帰変異原性、環境毒性（水生生物等）で多くの予測手法が開発されたが欧州を中心とする動物福祉の普及にともない哺乳動物試験の代替法として眼、皮膚刺激性、感作性（呼吸毒性：アレルギー性）、急性毒性試験が開発された。さらに2000年以後内分泌かく乱問題を契機に生殖毒性や発達神経毒性等内分泌かく乱物質関連の毒性予測システムの開発も米国を中心に進んでいる。医薬では創薬分野での副作用あるいは毒性予測手法開発として肝毒性（Drug-induced Liver Injury：DILI）、心毒性の予測手法開発が今も精力的に進められている。これらはほとんどが薬物あるいは化学物質の単回投与を前提とした予測手法開発であるが前述したように繰り返し曝露による慢性毒性、亜急性毒性、生殖毒性や発がん性試験等は毒性発現機構が複雑

かつ試験報告数が少なく公表されているデータも少ないことから予測システムの開発は進んでいないのが現状である。

最近になってデータベースの整備や情報公開が進み徐々に開発が進んでいる段階にある。これらのうち本プロジェクトに類似した国内外のプロジェクトについて以下に紹介し比較する。

■海外

ア. OECD QSAR ツールボックス

化学品管理規制での毒性予測における (Q) SAR の利用に関する OECD 加盟国間の国際協力は 1990 年代初頭から開始されている。2003 年構造活性相関に関する専門家組織が設立され現在、OECD の有害性評価作業部会下で活動している。この産物である OECD (Q) SAR ツールボックスは欧州連合が支援し化学物質の危険性評価のための必要な毒性データを充足し、政府、産業界および他の利害関係者が利用することを目的としたソフトウェアアプリケーションで 2008 年 3 月最初のバージョンがリリースされている。ここでは哺乳動物毒性のみならず生態毒性を含め

1) 標的化学物質構造的特徴および潜在的な機構または作用機序の同定

2) 同じ構造的特徴および/またはメカニズムまたは作用機序を持つ他の化学物質の特定

が可能な予測システムをツール化しかつデータギャップを埋めるための既存の実験データを使用した予測システムを構築しようとしている。

予測手法の基本は本事業とは異なり化学物質カテゴリーアプローチすなわち共通の官能基 (例えば、アルデヒド、エポキシド、エステル、特定の金属イオン)、一般的な構成要素または化学的分類、炭素数の範囲等の類似性に着目し同様の類似性の構造は同様の生理活性を示すという原則に基づいている。

最新の Ver. 4.3 では 2 種の新データベース (pKa OASIS と ADME データベース)、5 種の新しいプロファイラー (急性経口毒性、血液脳関門 (ベータ版)、経口吸収 (ベータ版)、皮膚透過性 (ベータ版)、脱共役剤 (MITOTOX)、2D パラメータ: pKa 評価の 5 種の新たな手法を掲載したものとなっており原則、政府機関を中心に無償で利用できる。

イ. 欧州 SEURAT、COSMOS および EUTOXRisk

欧州における代替法試験開発のプロジェクト SEURAT-1 は、2011 年 1 月 1 日に 7 研究プロジェクトとして開始。うちインシリコ関係では COSMOS の化粧品インビトロデータおよび生理学的薬物動態学 (PBPK) モデリングを含む個々のモジュールを使用したヒト反復投与毒性予測のための統合された *in silico* モデルとして亜急性、慢性等反復投与毒性予測を想定 (DETECTIVE) し、開発を進めていた。本プロジェクトは、2013 年の第 7 回化粧品指令の修正 (動物試験禁止) を契機に 2015 年以後 EUTOXRisk (An Integrated European 'Flagship' Programme Driving Mechanism-based Toxicity Testing and Risk Assessment for the 21st century) が継承している。このシステムでは「ブラックボックス」である動物試験から、ヒト細胞反応と化学的有害影響の因果関係の包括的な機構的理解に基づく毒性予測を目指しており、AI-SHIPS と同様のコンセプトであるが詳細は不明である。

ウ. 米国 Tox21 および ToxCast

Tox21 は、2008 年から開始している国家レベルのプロジェクト(予算規模 2000 億円)で US-EPA、米国国立衛生研究所(NIH)、米国環境健康科学研究所(NIEHS : NCATS)、米国国家毒性プログラム(NTP)、US-FDA 連邦当局間協力で実施している取組みである。2016 年に米国毒性物質規制法(TSCA)の改訂(Lautenberg 法)により化学物質安全性評価には、動物実験の使用を最小限に抑え、コンピューターによる毒物学を使用するための措置を取ることを EPA に義務付けることが規定された。これに伴い Tox21 プロジェクトの中核である ToxCast (Tox Forecaster) プログラムでは最終的に工業製品や消費者製品、食品添加物、環境負荷化学物質 10,000 物質に及ぶ化学物質に対して、インビトロハイスループット試験を行い、800 以上の多面的な生物活性プロファイル(アッセイのエンドポイント)に基づいてインシリコ毒性予測モデルを開発することを目指している(2018 年 4,500 物質)。予測モデルは国内外の研究機関が現在、鋭意 Tox21 データベースを利用してモデルを開発中である。

■国内

ア. 有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS : Hazard Evaluation Support System)

HESS (有害性評価支援システム統合プラットフォーム) は NEDO/METI 委託事業 であり構造活性相関手法による有害性評価手法開発事業であり毒性専門家の判断をサポートするためのシステムを構築することを目的に国際的に利用されるものを目指し (OECD QSAR Toolbox の開発者をメンバーに加え、OECD と連携しつつ研究開発を実施) 2007 - 2011 年度に実施された。予算規模は平成 22 年度実績で年間 1.4 億円、参加機関は国立医薬品食品衛生研究所、製品評価技術基盤機構、Bourges Univ. 関西学院大学、富士通(株)および 東北大学である。HESS では化審法反復投与毒性試験を中心に GLP 基準で実施された亜急性反復投与毒性試験の各検査項目の NOEL/LOEL 情報が収載されたデータベースを整備し、カテゴリーアプローチによる未試験物質の評価を支援する機能を備えている。データベース (HESS DB) は詳細な試験データ並びに被検物質の ADME 及び毒性作用機序に関連する文献情報を収めている。AI-SHIPS では HESS で整備された高品質のデータベースを活用し予測手法を開発しつつある。現在、製品評価技術基盤機構 (NITE) が化審法の反復投与毒性試験結果を随時データベース化しアップデートを行っている。

イ. 日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬支援推進事業 「創薬支援インフォマティクスシステム構築」

本プロジェクトでは①多階層データの統合モデリングによる薬物動態予測システムの構築 ②インフォマティクスとシミュレーションを融合した多面的 心毒性予測システムの構築 ③肝毒性予測のためのインフォマティクスシステム構築 に関する研究がある。予算規模は 1.5~2 億円程度/年間 (推定)。このうち、③肝毒性予測のためのインフォマティクスシステム構築に関する研究については、医薬基盤・健康・栄養・研究所 (研究代表者) を中心に産業技術総合研究所、熊本大学および明治薬科大学が参画している。予算規模は不明である。これまでのところプロトタイプの肝毒性関連データベース 2 種および プロトタイプのインビトロ遺伝子発現に基づく肝毒性予測システム 2 種が開発されている。また 2017 年度より、化学構造からヒトの肝毒性を予測するシステム開発を開始し追加計画として、2018 年度よりオントロジーデータベースの開発を開始している。本システムは医薬の創薬を意図したものであり、ラットの反復投

与毒性を目的とした AI-SHIPS とは異なるが、研究領域で共通の部分が多く、今後、モデリング等において研究協力も考えられる。

(5) 知財及び研究開発データの取り扱いについての戦略及びルール

研究開発実施期間中に発生する知的財産とデータ・情報の取扱いについては、日本版バイ・ドール制度の目的（知的財産権の受委託帰属を通じて研究開発活動を活性化し、その成果を事業活動において効率的に活用すること）及び本プロジェクトの目的を達成すべく以下の知的財産マネジメントを実施することとした。具体的には、平成 27 年 5 月経済産業省「委託研究開発における知的財産マネジメント」に関する運用ガイドラインに従い、経済産業省の指導の下、関係参加機関と協議の上、知財合意書を平成 29 年度に策定し、平成 30 年 1 月 15 日付で関係参加機関の承認を得てこの合意書に基づいた知財運用を実施した。またあわせて本知財合意書内容に従い平成 29 年 10 月に知財運営委員会規則を策定し、本規則に従って知財関連案件の委員会運営を実施している。

6. 費用対効果

安全性試験の代替による費用削減効果としては、28 日間反復投与毒性試験が本プロジェクトの成果物に置き換わったとすると、1 物質の新規化学物質の開発にかかる安全性試験の費用として、10 物質 × 850 万円 = 8,500 万円が削減できる。通常新規化学物質約 300 物質のうち、高分子フロースキーム等を除く 28 日間反復投与毒性の試験データを要する物質の年間届出件数は平成 29 年度において約 110 物質であり、研究開発段階から上市までの関連候補物質の検討まで考慮すると、国内全体で年間約 100 億円の費用が削減できる。この費用削減と開発期間短縮効果により、新規化学物質の開発が加速化し、届け出件数が増加した場合には、これ以上の費用削減効果が生じる可能性がある。

安全性評価コスト（費用・期間）の削減により、材料メーカーの提案力の強化、ユーザーとの摺り合わせ時間の短縮化、開発コストの大幅低減、新製品（省エネ型デバイス）開発の加速化により、我が国産業の競争力強化及び低炭素社会の実現に寄与する。