

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）終了時評価  
評価用資料

2022年11月2日

経済産業省 製造産業局 化学物質管理課

(事業の目的等)

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）事業						
上位施策名	科学技術イノベーション総合戦略 2017						
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						
事業の目的	<p>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することで、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。</p> <p>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を目指す。</p>						
類型	複数課題プログラム / 研究開発課題（プロジェクト） / 研究資金制度						
実施時期	2017年度～2021年度（5年間）	会計区分	一般会計 / エネルギー対策会計				
評価時期	事前評価：2016年度、中間評価：2020年度、終了時評価：2022年度						
実施形態	国からの直執行 （省エネ型電子デバイス材料の評価技術の開発事業への委託事業）						
プロジェクトリーダー	国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学 船津 公人 教授						
執行額 （百万円）	2017年度	2018年度	2019年度	2020年度	2021年度	総執行額	総予算額
	206	400	422	473	469	1970	2000

## 1. 本事業の政策的位置付け/背景

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、動物実験は高額のコスト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、2007～2011 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組が行われている。しかし、インビトロの試験を実施した物質について、必ずしも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。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インビボ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、毒性発現に寄与する種々のインビトロ試験系を確立し、生体での毒性試験データが存在する物質について、これらのインビトロ試験のデータを取得した。機序に基づくインビボモデル構築のため、化学物質の構造データ、インビトロ試験結果、生体毒性の 3 層をつなぐモデルを構築した。その結果、従来の QSAR とは異なる毒性発現機序に関する情報を提示可能なインビボ毒性予測モデルを構築した（図 1）。併せて、毒性発現にきわめて重要な要素である体内動態予測モデルも構築した。インビボ毒性予測と機序情報提示、さらに体内動態予測の結果を総合的に判断するためのプラットフォームとして、AI-SHIPS 統合的毒性予測システムを構築した。

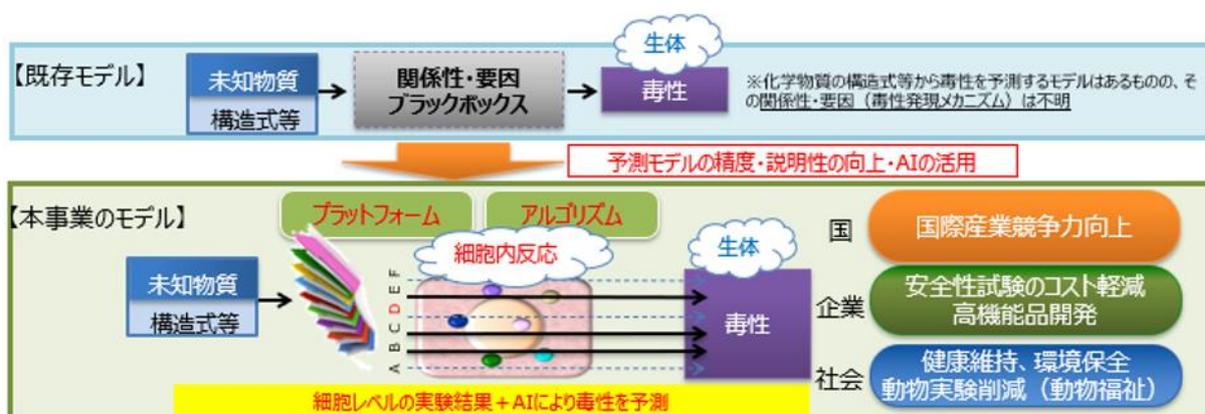


図 1 既存モデルと本事業のモデルの違い

## 2. 当省（国）が実施することの必要性

機能性化学物質は、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、一般的に、化学系企業には個社で高効率な安全性予測手法を開発するだけの人材や資金等に十分な余裕はなく、また試験機関に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が働き難いなか、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系企業、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、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。

## 3. 国内外の類似・競合する研究開発等の状況

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、無償で提供されている。特に欧州及び米国をはじめとした主要国では、動物実験廃止に向けた潮流が広がっていることもあり、化学物質の安全性評価にインシリコ手法の適用を積極的に進める傾向にあり、初期段階では復帰変異原性、環境毒性（水生生物等）で多くの予測手法が開発されている。我が国においても、インシリコ手法として政府主導により HESS（有害性評価支援システム統合プラットフォーム）の開発が進められたが、反復投与毒性のような複雑な毒性発現機序を有する毒性については、製品開発等に十分に活用されるには不確実性等の課題がある。また、2000年以降、内分泌かく乱物質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が米国を中心に進められつつある。医薬品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医薬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暴露による慢性毒性、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。

これらのうち、本事業に類似した国内外のプロジェクトは以下のとおり。

## ■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として、(Q) SAR の利用に関する OECD（経済協力開発機構）加盟国間の国際協力が 1990 年代初頭から開始されている。2003 年には、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の下で活動している。この産物である OECD-QSAR ツールボックスは、カテゴリーアプローチによる評価を支援するためのソフトウェアアプリケーションであり、欧州連合の支援を受け 2008 年 3 月に最初のバージョンがリリースされている。

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。

2022 年 10 月時点で最新の Ver. 4.5 では、新規データベースとしてヒト皮膚感作性 NICEATM/BfR には、新規物質として 1377 物質が追加された。また、光感作性データベースには新規で 73 物質が追加された。

QSAR ツールボックスは、OECD のホームページで公開されており、無料で使用することができる。

### イ. EUTOXRisk

EUTOXRisk (An Integrated European ‘Flagship’ Programme Driving Mechanism-based Toxicity Testing and Risk Assessment for the 21st century) は、欧州において 2016 年から 2021 年まで実施されたプロジェクトである。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、化学物質の暴露から有害性影響の発言の関連を理解するために、細胞生物学、オミックス、システム生物学、計算科学を統合している。主なエンドポイントは、反復投与毒性（肝臓、腎臓、肺、神経系）、生殖発生毒性である。

最終的なアウトプットとして、商業化プラットフォームがあり、in silico 毒性予測モデルや、ハイスループットのインビトロ試験システムなどを有料で提供している。

### 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で、米国環境保護庁（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）、米国食品医薬品局（US-FDA）が協力して実施している取組である。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）に基づく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（約10,000物質）。現在、国内外の研究機関がTox21データベースを利用した種々の予測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、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構と経済産業省（NEDO/METI）による構造活性相関手法を用いた有害性評価手法開発事業であり、毒性の専門家の判断をサポートするためのシステムの構築を目的とした。また、国際的に利用されることを目指し、OECD QSAR ツールボックスの開発者をメンバーに加え、経済協力開発機構（OECD）と連携しつつ2007 - 2011年度に研究開発が実施された。参加機関は国立医薬品食品衛生研究所、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）、Bourges 大学、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無影響量／最小影響量（NOEL/LOEL）情報が記載されたデータベースを整備し、カテゴリ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。本事業では、HESSで整備された高品質のデータベースを活用しAI-SHIPS統合毒性予測システムを構築した。HESS DBは、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。

4. 研究開発の内容

4-1 研究開発の全体構成

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・大学等と人工知能による予測システムの開発経験を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。本事業の研究開発目標を達成するため、表1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（図2）。

表1 研究開発項目と実施者

研究開発項目		実施者
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	—	昭和薬科大学

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	インビトロ試験系の確立と実験の実施 (薬物動態、核内受容体等)	静岡県立大学
	インビトロ試験系の確立と実験の実施 (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の解析)	産業技術総合研究所
	インビトロ試験系の確立と実験の実施 (タンパク質反応性 ADRA) および網羅的解析並びに文献調査による毒性発現メカニズム情報の整理)	化学物質評価研究機構 (CERI)
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)	インビトロ試験の予測モデルの構築 インビボ予測モデルの構築	明治薬科大学 名古屋市立大学 (株)システム計画研究所 みずほリサーチ&テクノロジーズ(株)
	AI-SHIPS 統合的毒性予測システムの構築	静岡県立大学 (株)システム計画研究所

※東京大学(2017~2020)、奈良先端科学技術大学院大学(2021)はマネジメント機関として、全研究開発項目にかかわる。

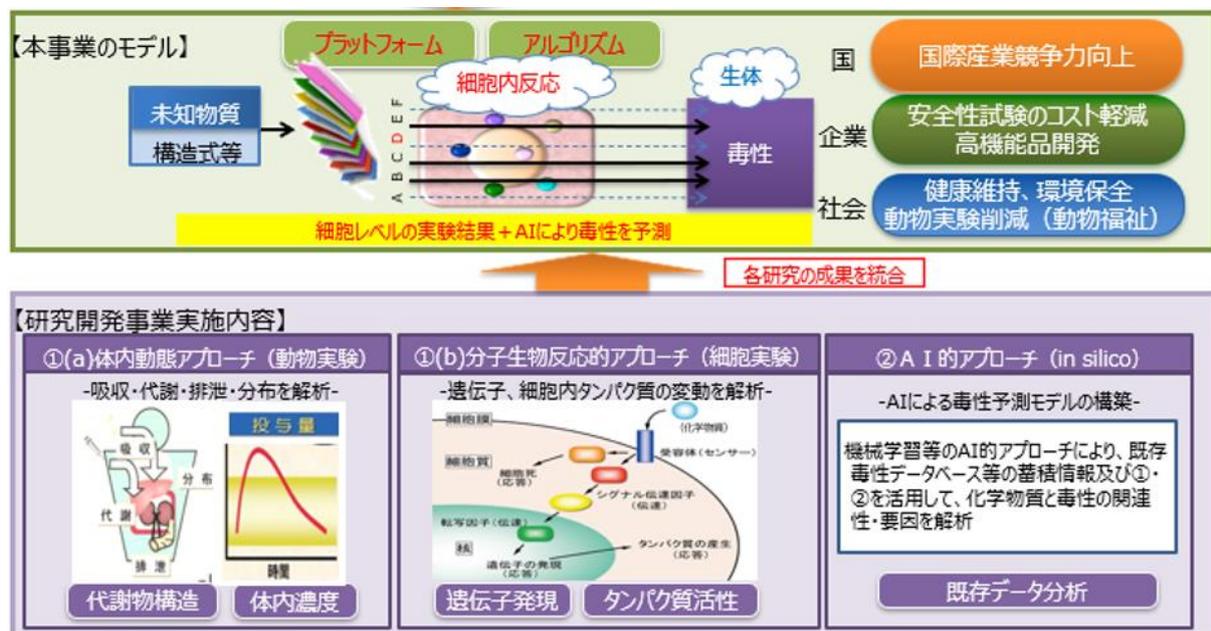


図 2 研究開発項目と目的の関係

本事業では、取り組むべき技術開発項目として、事業開始前の事前評価時に以下の4項目（技術テーマ①～④）を設定した。その後、事業開始に当たり、より一層の効率的・効果的な事業実施計画等を検討した結果、研究開発項目を当初の技術開発項目から表1に示す3つの研究開発項目（研究開発項目①(a)、①(b)、②）に編成し直して事業を推進することにした。このため、研究開発内容や成果の詳細に係る「4. 研究開発の内容」については、研究開発項目①(a)、①(b)、②に沿って示すものとし、当初設定した技術開発項目の達成状況に係る「6. 事業のアウトプット」については、技術テーマ①～④に沿って示すものとする。なお、技術テーマ①～④と研究開発項目①(a)、①(b)、②との関係は次のとおりであり、研究開発の内容自体に変更はない。

技術テーマ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（研究開発目標①(a)に該当）

技術テーマ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（研究開発目標①(b)に該当）

技術テーマ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（研究開発目標①(b)に該当）

技術テーマ④：①～③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（研究開発目標②に該当）

## 4-2 各研究開発項目の実施内容

### (1) 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) 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暴露時間、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 のデータベースには、ラットインビボ毒性試験の詳細な試験結果の他、ラットの薬物代謝の情報が記載されているものの、体内動態情報は記載されていない。

関連して近年、化学物質の生体内濃度の時間推移は、生理学的薬物動態 (PBPK) モデルを活用して再現することが世界的に可能となっているが、実験動物組織中濃度についての評価や外挿法は十分に検討されていない。

##### 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。特に、化審法ラット 28 日間反復投与毒性の予測を目指し、ラットにおける体内動態予測手法開発とその精緻化に注力した。

### 3) 実施内容と具体的成果

化合物の動物の体内動態に関する文献情報あるいは実測値を収集し、経口投与後のラット血中濃度推移再現を目的とする消化管吸収速度 ( $k_a$ ) および、全身分布容積 ( $V_1$ ) および肝代謝消失速度 ( $CL_{h,int}$ ) を個別に決定し、さらにこれら 3 種の重要薬物動態パラメータを未知物質の化学構造データから予測するモデルを確立した (図 3)。

本研究の大きな進捗は下記のとおりである。

2017 年度：ケミカルスペース上の多様性を確保したデータ収集方針策定

2018-2019 年度：腸透過 (吸収) 係数実測と収集した血中濃度 (conc) 対時間 (time) の曲線再現と肝/腎中濃度予測

2020-2021 年度：未知物質パラメータ値算出用の回帰式あるいは機械学習を介する予測手法構築と精緻化

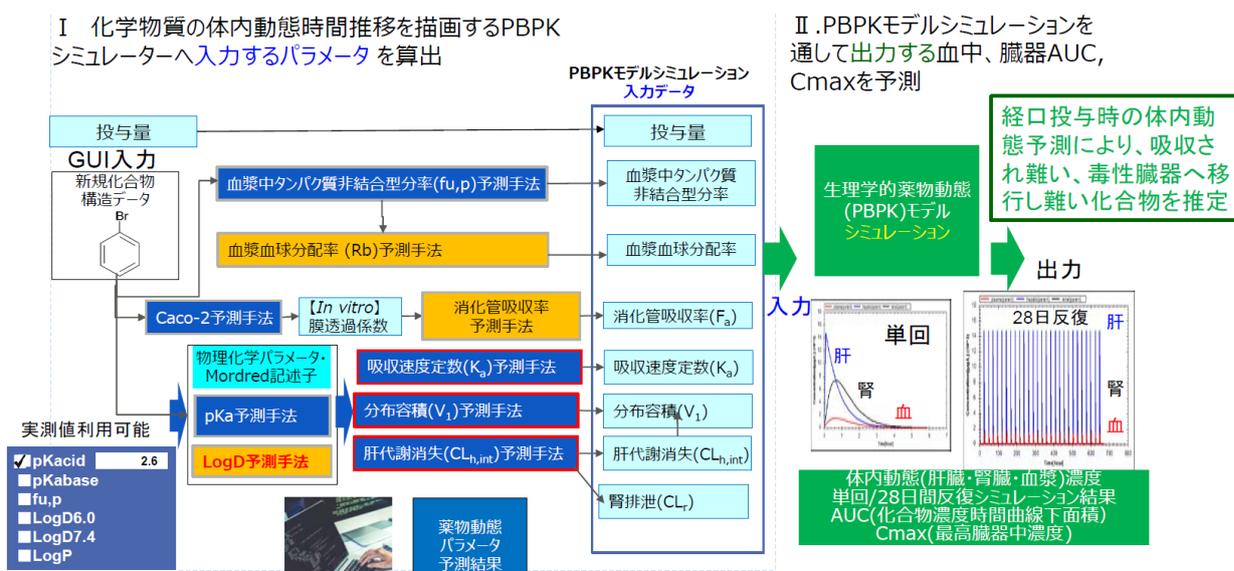


図 3 PBPK モデルスキーム

### ケミカルスペースと被験物質の選定

複数の一般化合物データベースに収載された物質 5 万について、各物質の構造を特徴に応じて 196 次元の記述子情報に変換し、二次元平面に写像したものをケミカルスペースとした。ケミカルスペースでは、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る。このケミカルスペースを 5×5 の 25 区画に分割し、PBPK モデルおよび膜透過モデルを作成するために実験を実施する物質や文献から収集した物質をケミカルスペースにマッピングし、25 区画を万遍なく埋めるように空間上の多様性を確認しながら進めた (図 4)。

最終的に PBPK モデルまたは膜透過係数予測モデル用搭載物質として取り扱った約 550 種の化合物群は化合物空間に万遍なくプロットされ、特段大きな偏向はなかったことから、多様性

が確保できることが確認できた。

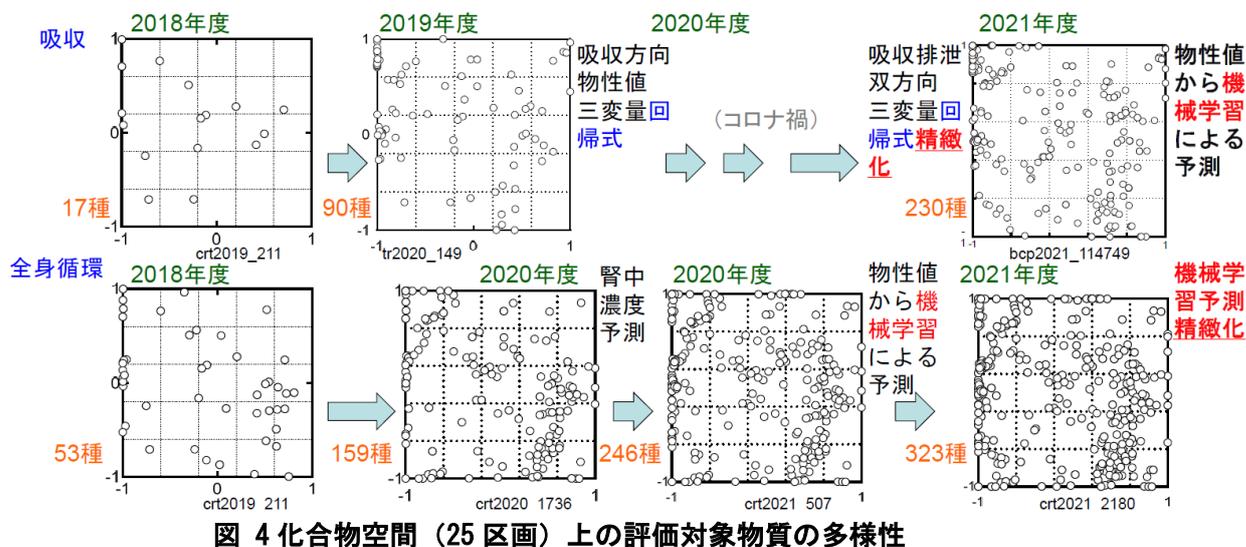


図 4 化合物空間 (25 区画) 上の評価対象物質の多様性

#### ア. 腸管由来細胞株を用いる吸収予測

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た。中間評価時点では、以下の点から、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旨報告した。

- ・ 14 種の化合物のヒト Caco-2 細胞膜透過係数実測値は、ラット腸細胞での膜透過係数実測値と良好な相関 ( $r=0.90$ ) を示した
- ・ 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、有意な相関関係があった
- ・ 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 ( $r=0.69$ )

最終的に約 200 の一般化学物質について、結腸がん由来 Caco-2 細胞を用いて培養腸管細胞の双方向膜透過係数を実測した。それらの実験結果をもとに、各物質の物性値や構造記述子から消化管吸収過程の予測手法を確立した。この予測方法では、主に 3 変量線形回帰と機械学習アプローチを使用している。3 変量線形回帰分析は、3 つの一般的な物理化学的特性 (アッセイで使用される実験における細胞の上部 (apical 側) と側底部の pH 条件および物質の分子量) を組み合わせて使用し、双方向輸送パラメーターを予測するものである。機械学習アプローチでは、化学物質の構造記述子を説明変数として、Light 勾配ブースティング機械学習システムを適用した。その結果、3 変量回帰 ( $r=0.76$ ) よりも精度の高いモデル ( $r=0.84$ ) が構築できた (図 5 および図 6)。

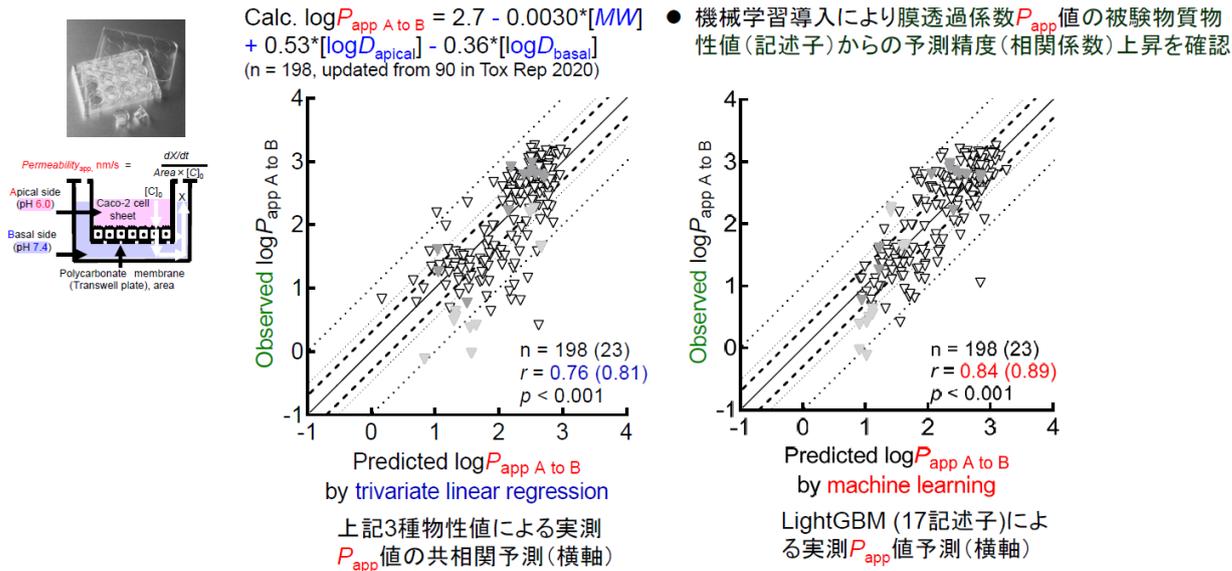


図 5 インビトロ膜透過係数  $P_{app}$  の予測 (3 変量線形回帰と機械学習アプローチ)

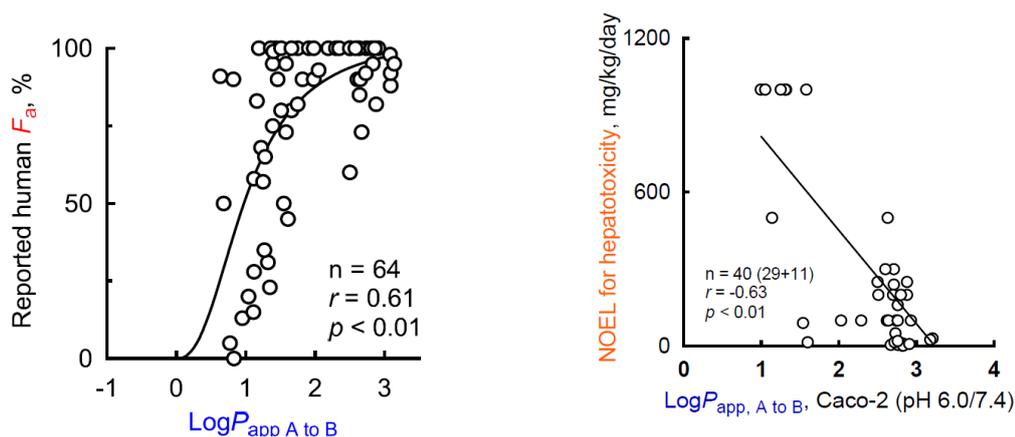


図 6 膜透過 (吸収係数) と経口投与後の吸収 (利用) 率  $F_a$ 、肝毒性 NOEL との相関

### イ PBPK モデル

AI-SHIPS 統合的毒性予測システムでの PBPK モデルは、生体側の肝血流量  $Q_h$  や肝重量  $V_h$  を固定値とし、物質側の水油分配係数  $\log P$ 、血漿タンパク質非結合率  $f_u$ ,  $p$ 、血液血漿濃度比  $R_b$  や血漿肝濃度比  $K_p$ ,  $h$ 、さらには物質と生体の関わりから決定される消化管吸収速度  $k_a$ 、全身分布容積  $V_l$ 、および肝代謝消失速度  $CL_{h, int}$  ならびに付随する消化管透過率  $FaFg$  や腎クリアランス  $CL_r$  などのパラメータ値を用い、消化管化合物量  $X_g$ 、血中濃度  $C_b$  あるいは肝中濃度  $C_h$  の時間変化を数学的に記述するものである。(図 7)。

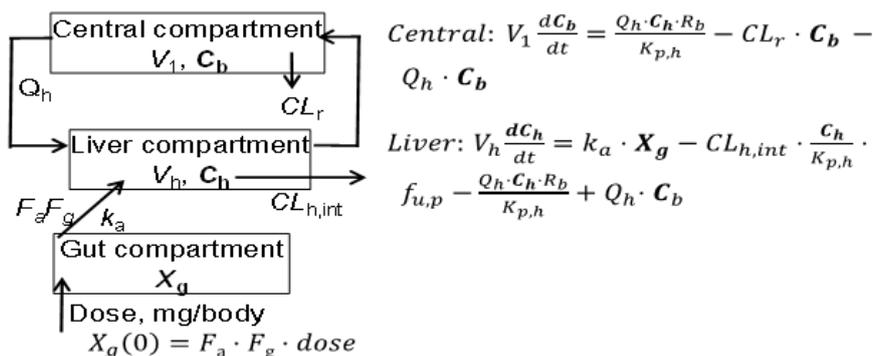


図 7 PBPK 予測モデルの概要と関連計算式

中間評価時には、下記を報告した。

- ・ラット血中濃度推移情報を得た 159 物質（うち実測 16 物質）を利用して、部分的最小二乗回帰分析により、物質の吸収速度定数 ( $k_a$ )、分布容積 ( $V_1$ )、および肝代謝消失速度 ( $CL_{h,int}$ ) を予測するモデルを構築し、PBPK のプロトタイプモデルを構築した。
- ・上記 3 パラメータを入力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 ( $r=0.75$ )。
- ・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ことから、化合物の膜透過実測値を加えることで、生体内動態をさらに精度よく予測し得る。

中間評価時以降は、一般化学品、食品、医薬候補品など、分子量 1000 以下の 300 種の有機化学物質に関する文献データと実験結果から得られた約 330 のラットの血中濃度推移データを用いて、PBPK モデル入力用の各パラメータ  $k_a$ 、 $V_1$  および  $CL_{h,int}$  の予測モデルを機械学習アルゴリズムにより構築した。例として  $V_1$  と  $k_a$  に関する結果を図示する (図 8)。これらの予測モデルによる化合物 1.0 mg/kg をラットに経口投与した場合の血中濃度の予測値は、文献／実験観測値と良好な関係にあった (相関係数=0.91, 図 9)。

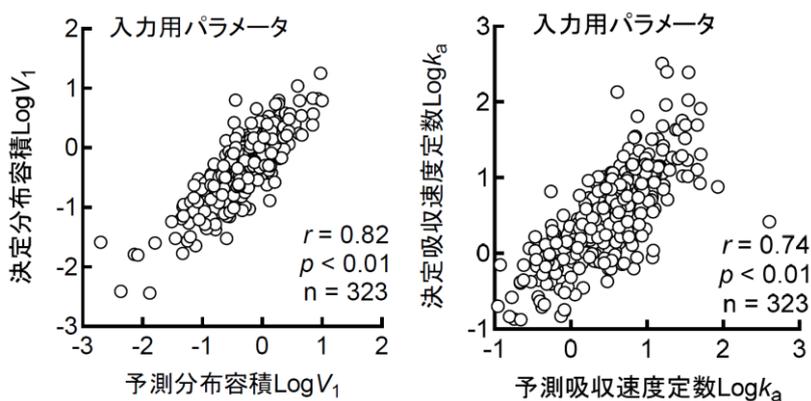


図 8 分布容積および吸収速度定数の実測値と予測値

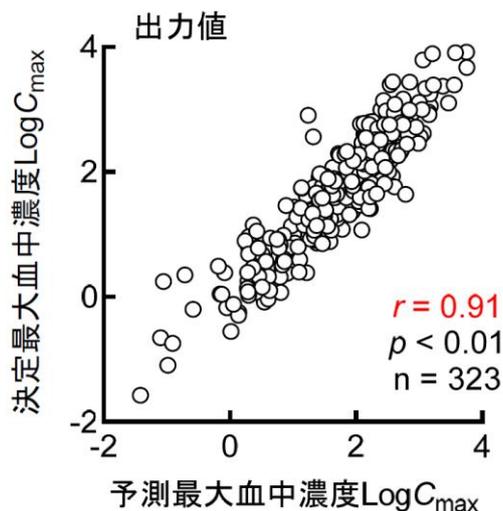


図 9 血中濃度の実測値と予測値

なお、外部検証として、生体の実験値が得られた 10 物質について 3 種パラメータ予測値と、PBPK 出力値の検証を行った (図 10)。323 物質を用いて内部クロスバリデーションの機械学習を行い、この新たな仕組みでの予測法によって外部 10 物質の 3 種入力パラメータ値と、これらを PBPK モデルに適応した出力値を検証した。その結果、従前法による結果であった LogCmax と LogAUC 白色の各点は、新法による灰色の点とほぼ同一の座標を示したが、それぞれのインシリコ予測値はインビボ決定値により近くなり、相関性の高い高精度な値が得られた。

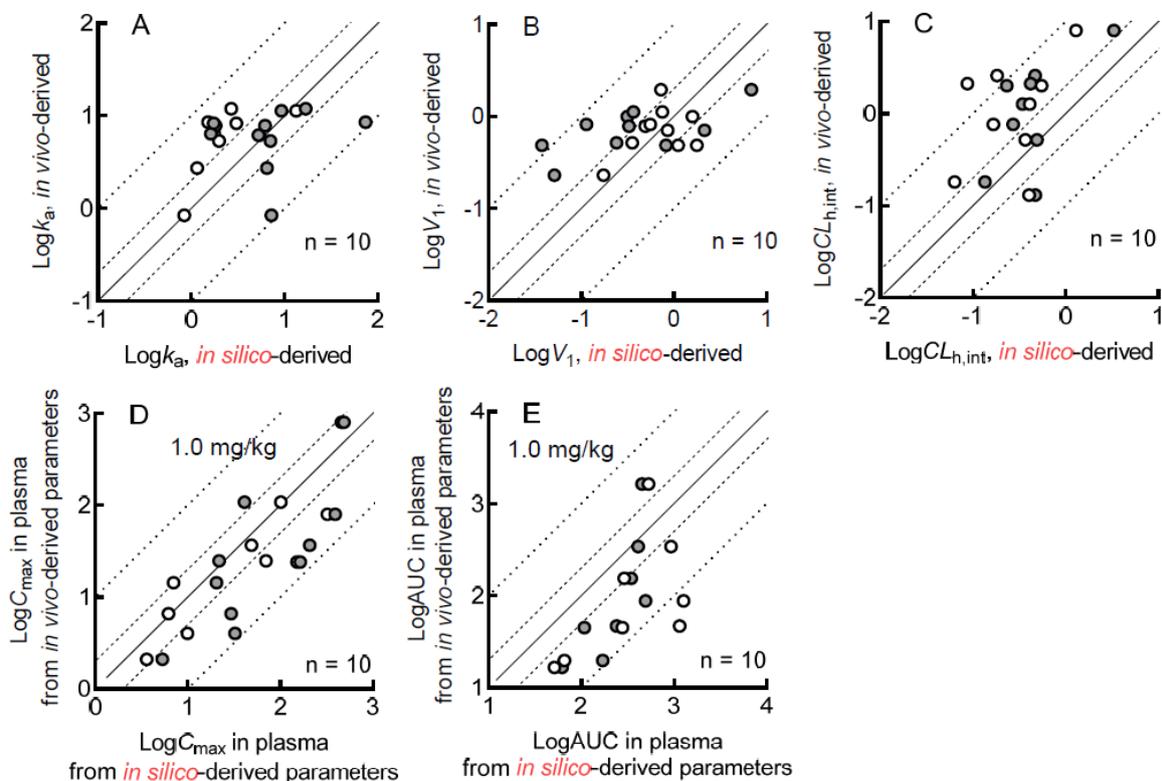


図 10 3 種パラメータ予測値と、PBPK 出力値 (血中濃度) の外部検証結果

## 化学物質の代謝について

一般化学物質の毒性を推定する際は、評価対象となる化学物質から生成する主要代謝物の毒性についても考慮することが重要である。しかし、本事業で開発したシステムでは代謝物を考慮する機能は付与されていない。今後、本システムを代謝物の毒性評価にも活用してもらうことを目指し、既存の代謝物予測モデルについて評価を実施した。

すでに公表されている代謝予測モデルから Meteor Nexus (Lhasa 社、有償)、GLORYx (ハンブルク大学、無償)、BioTransformer (Human Metabolome Project、無償)を選定し、代謝物として正解例を入手した一般化学物質 108 種の構造情報をこれらの 3 種予測システムに付し、毒性評価動物であるラットによる生成代謝物の予測情報を評価した。調べた条件において Meteor Nexus と GLORYx がほぼ同様の性能を有することが推察されたが BioTransformer はこれらに比較し予測性能は低いと判断された。これらの代謝予測手法を利用することも毒性予測の参考となり得るものと推察された。

代謝物が不明の場合は、これらのソフトを利用して予測し、得られた代謝物の毒性を本研究で開発した予測モデルで推測することが可能である。

表 2 Meteor Nexus, GLORYx, and BioTransformer の予測性能評価結果

方法	1 件ヒット (%)	正解代謝物数	出力代謝物数	Precision (%)	Recall (%)
Meteor Nexus	50.9	78	1047	7.4	39.4
GLORYx	53.7	85	1131	7.5	42.9
BioTransformer	28.7	43	1587	2.7	21.7

## ラットにおける毒性予測のヒトへの外挿手法、化学物質のヒト薬物動態の予測手法について

ラットの PBPK データから薬物動態を予測するうえで、上述したように消化管の吸収性について種差を含めて精緻に検討する必要がある。そのため、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た。約 200 の一般化学物質について、結腸がん由来 Caco-2 細胞を用いて培養腸管細胞の双方向膜透過係数を実測した。それらの実測値をもとに、各物質の物性値や構造記述子から消化管吸収過程の予測手法を確立した。

Caco-2 細胞膜透過係数実測値は、ラット腸細胞での膜透過係数実測値と良好な相関 ( $r=0.90$ ) を示している。また、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 値との間には有意な相関関係があることも確認されている。このことは、動態予測上の支配要因である吸収過程が、ラットの予測手法をヒトでの毒性予測に十分展開できることを示唆するものである。

ヒトへの予測を行ううえで重要な代謝の種差については、本事業の初期の段階で実施したヒト肝移植マウスを用いた研究結果や多くの関連報告から、代謝的变化、抱合反応に関してげっ歯類とヒトとの間で反応性に種差が存在することが明らかとなっている。一方で、表 2 等の代謝予測モデルは本来ヒトでの代謝予測モデルである。今般、動物での毒性発現量をヒトでの毒性発現量に外挿する場合は、この代謝予測モデルを利用し予測された代謝体についてラットの体重 (約 200g) をヒトの体重 (60kg) に換算することで、ラットの本 PBPK 予測モデルからヒトへの薬物動態予測も可能であることが示唆された。

## (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) 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ことが主要な原因の1つと考えられる。

### 2) 目標

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。

### 3) 実施内容と具体的成果

肝臓・腎臓、血液毒性の機序に基づく毒性予測モデルの構築に向けて、安定性や実施時間などを考慮した実効性のあるインビトロ試験系を選択・確立した。また、一般化学物質の毒性を予測するための効果的な被験物質を抽出し、それらの物質についてインビトロ試験を実施した。

2018年度の間目標時点までに、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した。また実際に、約220物質についてインビトロ試験を実施した。

中間評価以降は、化学物質のタンパク質反応性試験(ADRA) ならびに腎毒性のためのラット腎由来 NRK-52E 細胞を対象とした試験を追加し、また、研究開発項目②の予測モデル開発の予測精度向上を目的に、被験物質を追加し、最終的に358物質(=モデル構築用326物質+外部評価用32物質)(※)についてインビトロ試験を実施した。

実験結果は後述するデータマトリクスに格納し、研究開発項目②の予測モデル開発に活用した。

また、毒性発現の機序について文献調査を実施して整理し、研究開発項目②のユーザーシステムにおける機序情報表示に役立てた。

(※) 評価不可などの理由で試験結果数が358に満たない試験も含まれる。また、化学物質のタンパク質反応性試験(ADRA)は、実施可能な試験数に制限があったため、他の実験と共通しない物質も含む200物質の試験を実施した。

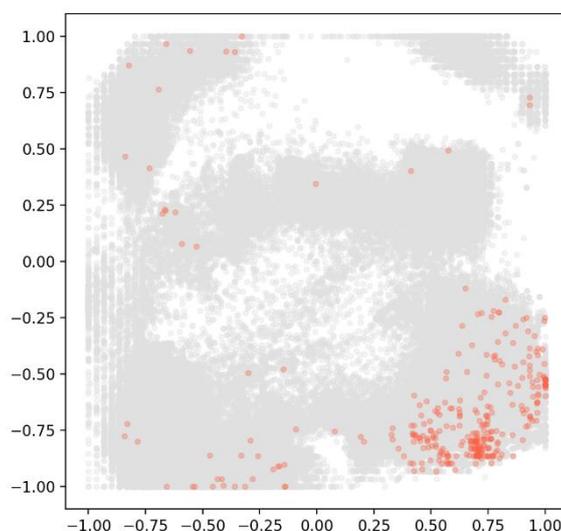
### 被験物質の選択

本事業の最終ゴールは、人工知能を利用したインビボ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、本事業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、NITEにより公開、運用されているHESSを主に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や毒性機序情報(毒性知識情報データベース)、

代謝知識情報データベースが搭載されており、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。本事業では 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（ケミカルスペース上の広がり、図 11）、試薬の入手可能性、実験の実施可能性などを踏まえて被験物質を 326 物質選択した。

外部検証用の物質については、インビボ毒性予測精度向上を目的として、REACH 等から収集したラット 28 日間反復投与毒性試験データから、物質の多様性（ケミカルスペース上の広がり）、試薬の入手可能性、実験の実施可能性などを踏まえて選択して、28 物質を被検物質とした。



\*背景の灰色のプロットは、参照として PubChem から抽出した約 10 万件の物質

図 11 インビトロ試験の被験物質として選択した 326 物質（赤）のケミカルスペースにおける広がり

### 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、最終的に得られた各種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 12）。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により、特定の機序を推定して試験を選択することは現実的ではない。本事業では、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

転写因子を選択した。さらに、より毒性影響（Adverse effect）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 13、表 3）。

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 細胞を利用して、細胞傷害 及び 細胞小器官影響評価および細胞内 GSH 含量測定（表 3 の No. 2, No. 7, および No. 8）を実施することとした。

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、肝毒性評価に使用した試験を利用できると考えた。

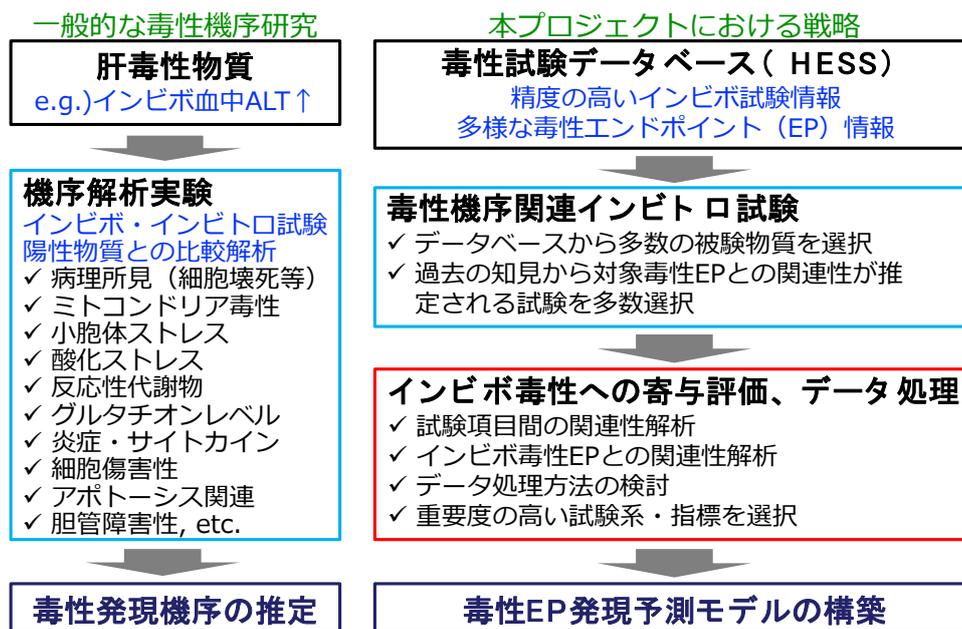


図 12 毒性予測モデル構築のためのインビトロ評価戦略

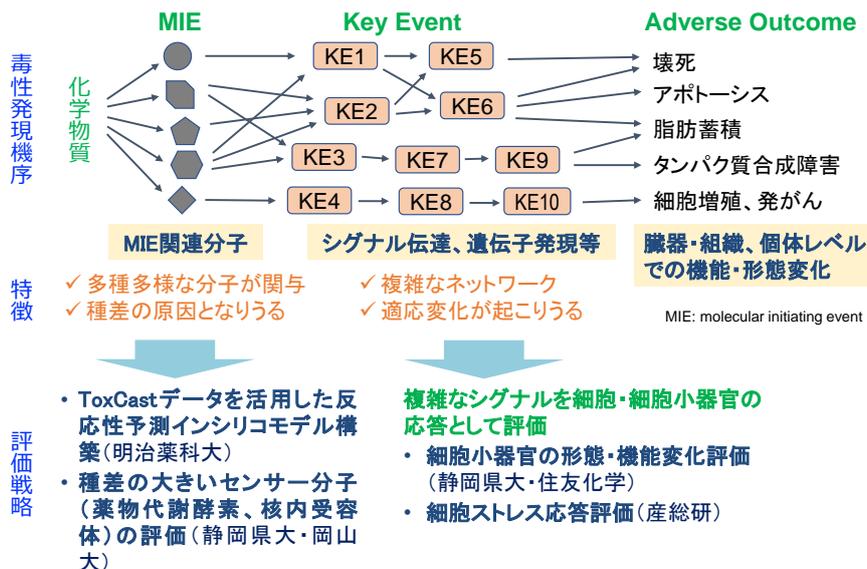


図 13 インビボ毒性予測モデルの構築に向けた細胞内イベントの評価

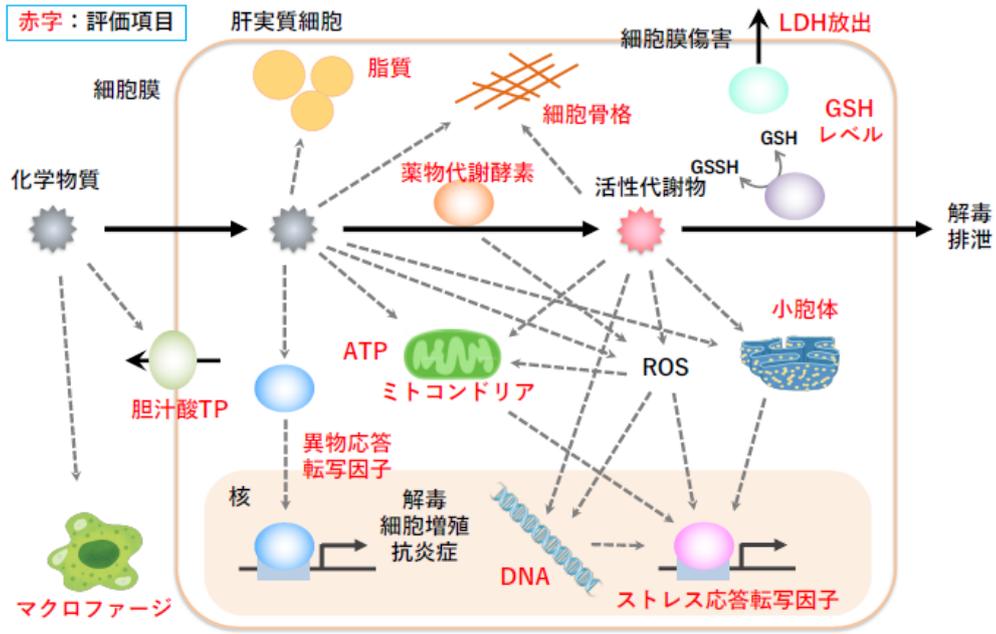


図 14 AI-SHIPS 統合的毒性予測システムにおけるインビトロ試験の位置づけ

表 3 本事業におけるインビトロ試験

No.	評価項目	内容	分子・項目	方法の概要
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"> <li>ラット P450 (7 分子)</li> <li>ヒト P450 (11 分子種)</li> <li>UGTs (総活性)</li> </ul>	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 (輸送活性) を評価	<ul style="list-style-type: none"> <li>ラット MRP2</li> <li>ラット BSEP</li> </ul>	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"> <li>ラット AHR</li> <li>ラット核内受容体 (PPAR<math>\alpha</math>, PXR, RXR<math>\alpha</math>, LXR<math>\alpha</math>, FXR)</li> </ul>	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	酵素誘導に関わる受容体 CAR への影響を評価 * 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>ラット CYP2B1, CYP3A1, CYP4A1</li> </ul>	初代培養ラット肝細胞の mRNA レベル測定 (1 濃度)
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"> <li>核</li> <li>細胞質 (F-actin)</li> <li>ミトコンドリア</li> <li>中性脂肪 (TG) 蓄積</li> <li>リン脂質 (PL) 蓄積</li> </ul>	初代培養ラット肝細胞、HepG2 細胞、ラット腎由来 NRK-52E 細胞 (核、細胞質、ミトコンドリアのみ) 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"> <li>LDH アッセイ (細胞死)</li> <li>Cell-titer アッセイ (生細胞数)</li> </ul>	初代培養ラット肝細胞、HepG2 細胞、ラット腎由来 NRK-52E 細胞を利用した暴露試験 (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)
11	遺伝子発現 (機序解析目的)	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

\*1 ラット CAR (rCAR) に関しては、レポーターアッセイ等での評価が困難であったことから、ラット肝細胞における標的遺伝子 (CYP2B1, CYP3A1, CYP4A1) の mRNA レベルを測定することで、rCAR 活性化作用とすることとした。

インビトロ試験の実施実績を図 15 に示す。またインビトロ試験結果の概要を図 16 に示す。

		2017fy	2018fy	2019fy	2020fy	2021fy
被験物質の推移		被験物質 50物質を HESSから 選定	HESSから 150物質 追加	精度検証 のため、 29物質を 追加	精度向上 を目的に 111物質 追加	外部検証 のための物 質32物質 を追加
評価項目と各インビトロ試験で取得した値		実験数（累積）の推移				
		2017fy	2018fy	2019fy	2020fy	2021fy
<b>1. 薬物代謝酵素等反応性評価</b>						
ラット	P450反応性評価（7分子種、3濃度）	153	186	215	326	358
ヒト	P450反応性評価（11分子種、3濃度）					
ラット	総UGT活性（1種、3濃度）	-	175	215	326	358
<b>2. 酸化還元</b>						
RatHep	細胞内GSH含量測定（3濃度）	-	-	215	270	346
HepG2細胞	細胞内GSH含量測定（3濃度）	-	-	条件検討	270	358
ラットNRK-52E細胞	細胞内GSH含量測定（3濃度）	-	-	-	有用性検討	358
<b>3. タンパク質反応性</b>						
	ADRA（1濃度）	-	-	-	150	200
<b>4. 胆汁酸トランスポーター</b>						
ラット	胆汁酸トランスポーター（MRP2）（1濃度）	-	条件検討	215	326	358
ラット	胆汁酸トランスポーター（BSEP）（1濃度）	-	条件検討	条件検討	326	358
<b>5. 核内受容体活性化作用評価</b>						
ラット NR	AHR（3濃度）	153	186	215	326	358
ラット NR	PXR（3濃度）	条件検討	186	215	326	358
ラット NR	PPARα（3濃度）	条件検討	186	215	326	358
ラット NR	RXRα（3濃度）	-	-	215	326	358
ラット NR	LXRα, FXR（3濃度）	-	-	-	326	358
<b>6. 酵素誘導</b>						
ラット NR	mRNA	-	-	条件検討	326	358
<b>7. 細胞小器官評価（HCA）</b>						
ラット肝細胞	核（Nuc）、ミトコンドリア（Mit）、細胞骨格（Factin）（6濃度）	50	186	215	215	349
HepG2細胞	核（Nuc）、ミトコンドリア（Mit）、細胞骨格（Factin）（6濃度）	-	-	215	326	358
ラット肝細胞	中性脂肪（TG）、リン脂質（PL）（6濃度）	-	条件検討	215	223	322
HepG2細胞	中性脂肪（TG）、リン脂質（PL）（6濃度）	-	-	215	326	358
ラットNRK-52E細胞	核（Nuc）、ミトコンドリア（Mit）、細胞骨格（Factin）（6濃度）	-	-	-	有用性検討	358
<b>8. 細胞傷害性評価</b>						
ラット肝細胞	LDH放出（6濃度）	50	186	215	251	342
ラット肝細胞	Celltiterアッセイ（6濃度）	50	186	215	251	358
HepG2細胞	LDH放出（6濃度）	-	-	215	326	358
HepG2細胞	Celltiterアッセイ（6濃度）	-	-	215	326	358
ラットNRK-52E細胞	LDH放出（6濃度）	-	-	-	326	358
ラットNRK-52E細胞	Celltiterアッセイ（6濃度）	-	-	-	326	358
<b>9. ストレス応答シグナル伝達経路に対する影響評価</b>						
HepG2細胞	酸化ストレス（Nrf2）（6濃度）	-	186	215	326	358
HepG2細胞	炎症応答（NF-κB）（6濃度）	-	186	215	326	358
HepG2細胞	小胞体ストレス（ATF6）（6濃度）	-	-	215	326	358
HepG2細胞	DNA損傷（p53）（6濃度）	-	-	-	326	358
HepG2細胞	低酸素ストレス応答（HIF1α）（6濃度）	-	-	-	-	358
<b>10. マクロファージ細胞に対する影響評価</b>						
マウス	マクロファージRAW264.7細胞影響（6濃度）	-	-	215	326	358

図 15 実験の実施実績

## 49試験 (2865パラメータ)

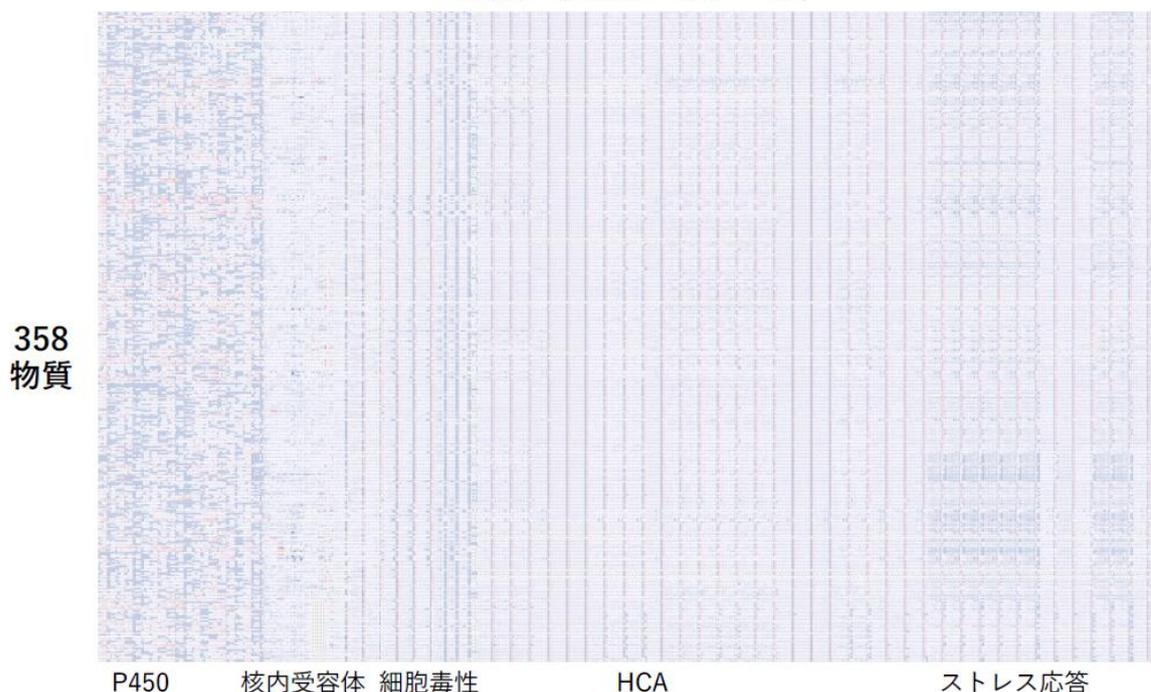


図 16 インビトロ試験結果 (ヒートマップ)

以下に主なインビトロ試験の概要を示す。

### 薬物代謝酵素等反応性評価／胆汁酸トランスポーター (表 3 No. 1, No. 4)

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では、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、それらの試験では代謝物の構造を決定する必要があったり、放射性物質で標識した基質が必要であったりすることから、本事業のように多種多様な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機会が多いことから、本事業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。実際にはラット又はヒト組換え P450 (Corning) と P450-Glo assay キット (Promega) を用い、ラット 7 分子種 (rCYP1A1、rCYP1A2、rCYP2B1、rCYP2C6、rCYP2D1、rCYP2E1、rCYP3A2) およびヒト 11 分子種 (hCYP1A1、hCYP1A2、hCYP1B1、hCYP2A6、hCYP2B6、hCYP2C8、hCYP2C9、hCYP2C19、hCYP2D6、hCYP2E1、hCYP3A4) に対する被験物質の阻害作用を測定した。使用する P450-Glo 基質、P450 特異的阻害剤 (陽性対照物質)、反応条件は分子種ごとに決定した。

阻害作用については、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 (%) を算出することで評価した (図 17)。

UGT の反応性に関しては、ラット肝ミクロソームを酵素源として、UGT 共通基質である 6-hydroxy-4-methyl-2-benzothiazolecarbonitrile を用いた評価系を利用して UGT 活性に対する

被験物質の阻害作用を測定した。

いずれも、化学発光値はルミノメーターを用いて測定した。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。

また、いずれも 0.1、1.0、10  $\mu\text{M}$  の 3 濃度で評価した。

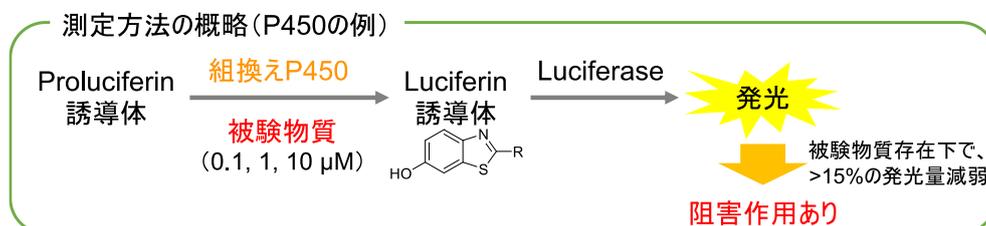


図 17 発光基質を利用した P450 阻害試験の概要

### 核内受容体活性化作用評価 (表 3 No. 5)

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 (ラット AHR) 又はワンハイブリッドアッセイ (ラット PPAR $\alpha$ , ラット PXR, ラット RXR $\alpha$ , ラット LXR $\alpha$ , ラット FXR) を利用した。

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。

その他については、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。ラット PXR やラット PPAR $\alpha$  等の各核内受容体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測定した。

### 細胞小器官影響評価 (表 3 No. 7)

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。

初代培養ラット肝細胞  
HepG2細胞  
ラットNRK-52E細胞

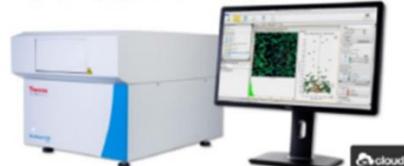


被験物質(約360物質)  
6濃度(0.3-100 μM)  
48時間暴露

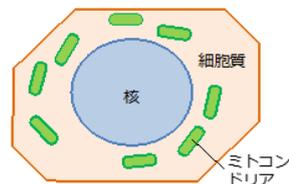
ハイコンテンツ解析(HCA解析)

細胞小器官

核、細胞質(F-actin)、ミトコンドリア  
中性脂肪、リン脂質



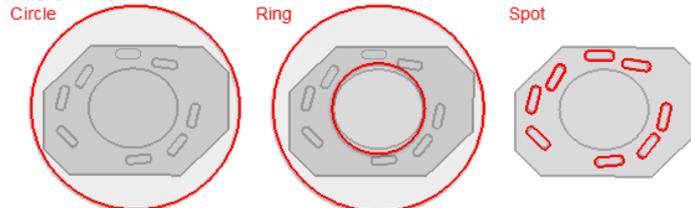
### 細胞小器官イメージングの概略



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: $4\pi \times \text{面積} / \text{周囲長}^2$
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

Ch1~Ch3 で 50  
程度のデータを選  
択して解析に使用。

測定範囲・対象



\* 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

図 18 細胞小器官影響の評価の概略

### 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 (表 3 No. 9)

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 (HIF1a) 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。

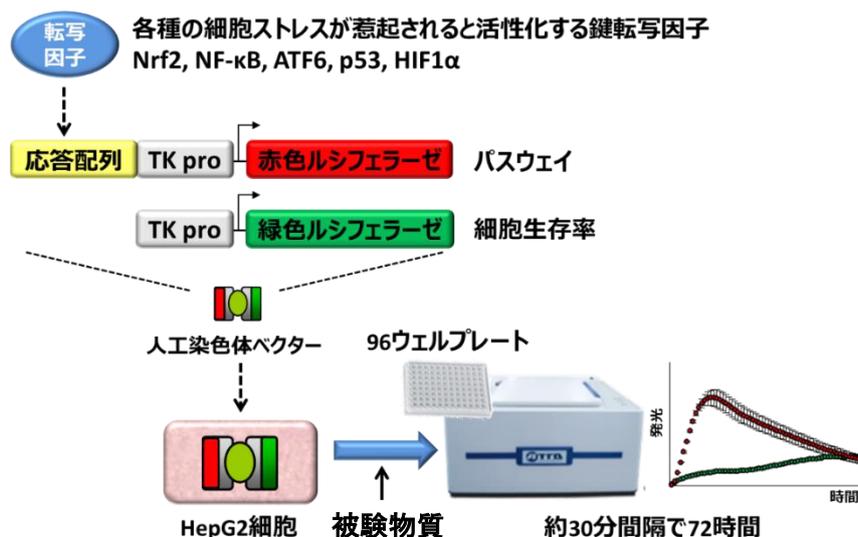


図 19 リアルタイム発光測定によるストレス応答シグナル伝達の解析の概要

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 値から以下の式により算出した。

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1.0 & 1.0 \\ \kappa_{ELuc} & \kappa_{SLR3} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} ELuc \\ SLR3 \end{pmatrix}$$

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 20、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 20、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 21）。

$$\text{Fold change} = \frac{(\text{Chem. SLR3 intensity} / \text{Chem. ELuc intensity})}{(\text{Cont. SLR3 intensity} / \text{Cont. ELuc intensity})}$$

Chem. : Chemical treated.  
Cont. : Vehicle treated.

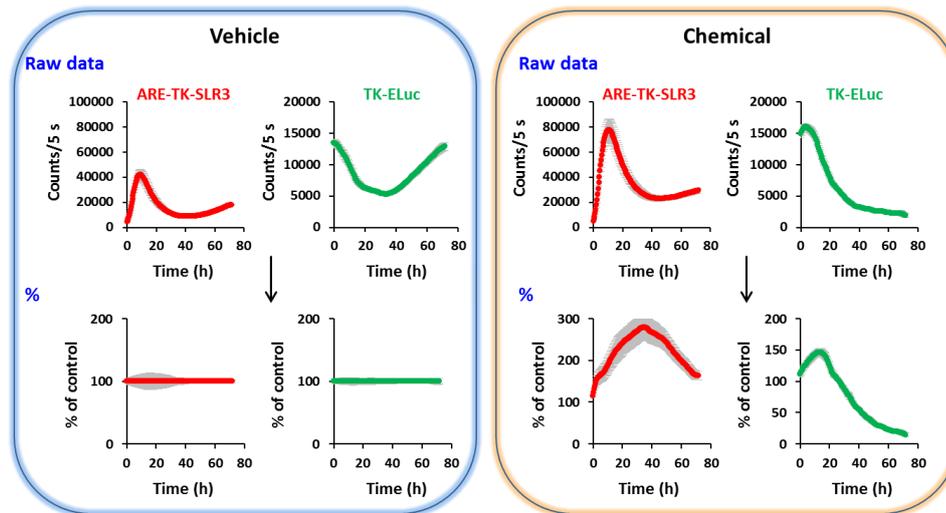


図 20 溶媒対照区（左）および被験物質暴露区（右）のリアルタイム発光測定の結果例

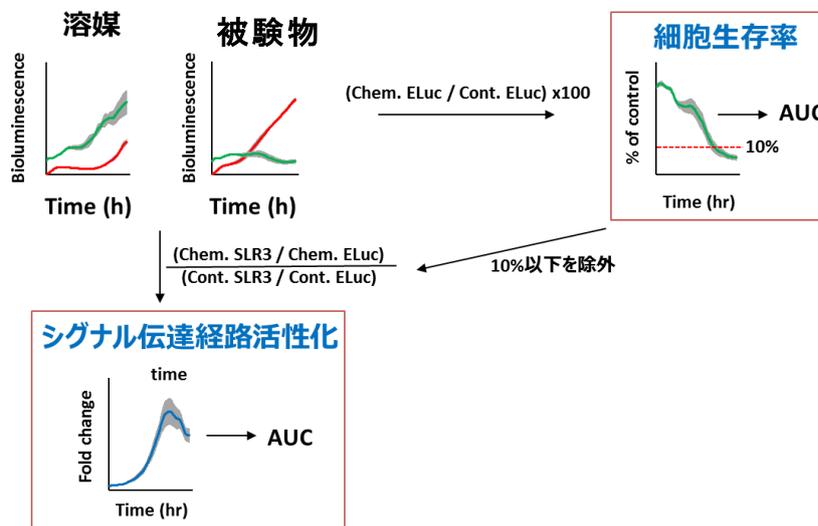


図 21 リアルタイム発光測定結果の解析スキーム

ストレス応答経路の解析では、被験物質 358 物質のうち、ストレス応答経路を活性化させた物質は平均 47%、不活性化させた物質は平均 41%、細胞毒性を惹起した物質は 69%であった。

ストレス応答経路の活性化では、酸化ストレス応答 (Nrf2-ARE 経路) の陽性数が最多であり、被験物質による細胞内酸化ストレスレベルの亢進などに対して鋭敏に反応したものと考えられる。一方、ストレス応答経路の不活性化では低酸素ストレス応答 (HIF1 経路) の陽性数が最多であった。この経路が不活性化される機序については不明であるが、不活性化を惹起する物質の多くは細胞毒性を引き起こすことから、細胞毒性発現と関連するイベントである可能性が示唆された。

インビトロ間の相関解析では、測定開始初期において酸化ストレス応答経路 (Nrf2-ARE 経路) と低酸素ストレス応答経路 (HIF1 経路) の類似性が認められ、既報と一致した結果が確認された。また、測定中期から後期にかけて細胞毒性が発現する物質では、炎症ストレス応答経路 (NF- $\kappa$ B 経路)、小胞体ストレス応答経路 (ATF6-ERSE 経路) および DNA 損傷ストレス

応答経路（p53 経路）が連動して活性化されることが明らかとなり、毒性発現に伴うこれら 3 種のストレス応答の活性化には共通する機序が存在する可能性が示唆された。

### 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（表 3 No. 10）

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 RAW-Blue 細胞を用いた解析を実施した。当該細胞は、NF- $\kappa$ B 応答配列および AP-1 応答配列が分泌型 embryonic alkaline phosphatase（SEAP）の上流に配置されたレポーターベクターを RAW264.7 細胞のゲノムにランダムに導入した安定細胞株であり、炎症性サイトカイン等の刺激に伴う NF- $\kappa$ B および AP1 経路の活性化に依存して SEAP が発現する。そのため、培地中に分泌される SEAP 活性を測定し、マクロファージ細胞の活性化の指標とした（図 22）。



図 22 RAW-Blue 細胞の概要

確定したプロトコルに従い、96 ウェルプレートに RAW-Blue 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 2 の 6 濃度）の化合物に交換し、一定時間の培養後に培養液を回収し SEAP 活性を Phospha-Light System（Applied Biosystems）を用いた化学発光法により測定した。また培養液を回収した後の細胞を用い、細胞生存率を WST8 アッセイ（Cell Counting Kit-8、DOJINDO）で測定した。

SEAP 活性および細胞生存率（WST8 測定）は溶媒対照区を 100%とした相対値で算出、また NF- $\kappa$ B および AP-1 経路の活性化（即ちマクロファージ細胞の活性化）は SEAP 活性を細胞生存率で補正した fold change 値として算出した（図 23）。なお、WST8 が 50%或いは SEAP 活性 10%以下の値は除外することとした。

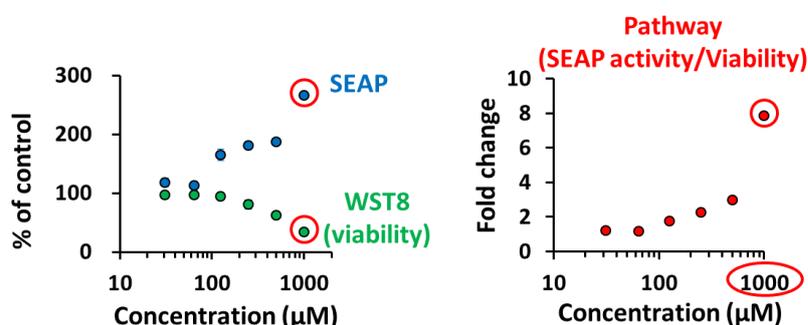


図 23 RAW-Blue 細胞を用いた測定結果の例

被験物質 358 物質のうち、選定したパラメータでの陽性物質数は約 20%と低い結果となった。これが原因と考えられるが、インビボ毒性との相関解析では NOEL、LOEL とともに有意な関

連性は認められなかった。一方でこの結果から、インビボ毒性予測には化学物質によるマクロファージ細胞の直接の影響よりも、傷害を受けた肝実質細胞などから分泌される損傷関連分子パターンによる間接的なマクロファージ細胞の活性化などを考慮した評価が重要であることが示唆された。

#### 実験データの品質管理

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（5-3 参照）、事業全体での試験プロトコルの統一を図った。整理したプロトコルを表 4 に示す。なお、試験プロトコルは日本語および英語で整理し、研究開発項目②で開発した AI-SHIPS 統合的毒性予測システムに搭載して、ユーザーが閲覧できるようにしている。

また、インビトロ毒性予測モデルの構築では、326 物質の毒性データを学習データとして用いているため、各データの正確性がモデル精度に大きく寄与することを踏まえ、実験データについては、各実験機関の自己チェックによる正確性確保に加え、第三者チェックによる透明性を付与することで、その信頼性をより堅牢なものにした。第三者チェックについては、費用/時間/効率と事業の持つ責任とのバランスをとった中で実現可能なチェックを行うこととし、具体的には、測定データシートの値をパラメータに変換し、データマトリクスに転記するまでのフローを第三者も行い、各実験機関での実施結果と突合することによるチェックを実施した。突合の結果、不整合があった箇所については、各実験機関にて確認を行った。

表 4 本事業で作成したプロトコル一覧

プロトコル文書名称
【静 1-1】ラット及びヒトシクロム P450 のインビトロ阻害評価試験
【静 1-2】ラット及びヒトグルクロン酸転移酵素のインビトロ阻害評価試験
【静 3-1】ラット MRP2 のインビトロ阻害評価試験
【静 3-2】ラット BSEP のインビトロ阻害評価試験
【静 4-1】ラット及びヒト Ah 受容体活性化作用の培養細胞を用いた評価試験
【静 4-2a】ラット PXR 活性化作用の培養細胞を用いた評価試験
【静 4-3a】ラット PPAR $\alpha$ 活性化作用の培養細胞を用いた評価試験
【静 4-4】ラット RXR $\alpha$ 活性化作用の培養細胞を用いた評価試験
【静 4-5】ラット LXR $\alpha$ 活性化作用の培養細胞を用いた評価試験
【静 4-6】ラット FXR 活性化作用の培養細胞を用いた評価試験
【静 4-7】ラット肝細胞を用いた CAR 活性化作用の評価試験
【静 5-6】ラット肝細胞に対する化学物質の細胞傷害性評価
【静 6-1a】ラット肝細胞における化学物質影響評価のためのハイコンテンツ解析
【静 6-1b】ラット肝細胞における化学物質影響評価のためのハイコンテンツ解析—中性脂肪・リン脂質蓄積評価—
【静 5-5】ラット肝細胞を用いた化学物質による細胞内 GSH レベル変動の評価
【静 5-1】HepG2 細胞に対する化学物質の細胞傷害性評価
【静 6-2a】HepG2 細胞における化学物質影響評価のためのハイコンテンツ解析—ミトコンドリア・細胞骨格評価—
【静 6-2b】HepG2 細胞における化学物質影響評価のためのハイコンテンツ解析—中性脂肪・リン脂質蓄積評価—

【静 5-3】 HepG2 細胞を用いた化学物質による細胞内 GSH レベル変動の評価
【静 5-2】 NRK-52E 細胞に対する化学物質の細胞傷害性評価
【静 6-3】 ラット腎 NRK-52E 細胞における化学物質影響評価のためのハイコンテンツ解析—ミトコンドリア・細胞骨格評価—
【静 5-4】 ラット腎 NRK-52E 細胞を用いた化学物質による細胞内 GSH レベル変動の評価
【産 1-1】 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による HESS 化合物毒性試験プロトコル（酸化ストレス応答）
【産 1-2】 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による HESS 化合物毒性試験プロトコル（炎症応答）
【産 1-3】 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による HESS 化合物毒性試験プロトコル（小胞体ストレス応答（ATF6-ERSE 経路））
【産 1-4】 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による HESS 化合物毒性試験プロトコル（DNA 損傷応答（P53 経路））
【産 1-5】 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による HESS 化合物毒性試験プロトコル（低酸素ストレス応答（HIF1 経路））
【産 2】 マクロファージ細胞（RAW-Blue 細胞）を用いた HESS 化合物毒性試験プロトコル
【静 1-1】 ラット及びヒトシトクロム P450 のインビトロ阻害評価試験
【昭 1-1】 化学物質のヒト結腸癌由来細胞株（Caco-2 細胞）またはラット腸由来細胞株（IEC-18 細胞）を用いる腸粘膜透過性評価
【昭 2】 化学物質の in vitro ヒト肝細胞系を用いる代謝消失と酵素誘導

※タンパク等結合性評価（ADRA） は OECD のテストガイドライン TG 442C に準じて実施。

### 毒性発現メカニズムの整理結果

表 3No. 11 のマイクロアレイによる遺伝子発現解析および文献調査に基づき、肝毒性の発現メカニズム情報の整理を実施し、肝毒性に関する一般的な発現メカニズムを整理した。この結果は、後述する AI-SHIPS 統合的毒性予測システムの機序情報の表示に役立てた。

化学物質によって発現する毒性の機序は以下の 4 段階に大別される。

- ① 標的組織への輸送
- ② 細胞内分子との反応または細胞内微小環境の変化
- ③ 上記に起因する細胞内シグナル、細胞機能または細胞や細胞小器官の構造変化
- ④ 修復と適応過程

上記の「①標的組織への輸送」の前後において毒性を発現する物質の消去や解毒が行われる。一般的に、毒性物質の解毒には第 I 相及び第 II 相の薬物代謝酵素が重要となる。この第 I 相の主要なものがシトクロム P450 (CYP) であり、第 II 相では UGT (UDP-glucuronosyltransferase) や GST (Glutathione-S-transferase) 等の転移酵素がある。例えば、GST は求電子的な物質と生体内にあるグルタチオンと反応させる（グルタチオン抱合）ことで解毒が行われる。この他の解毒としては、加水分解、酸化等がある。第 I 相及び第 II 相の薬物代謝酵素の誘導には AhR

(Aryl Hydrocarbon Receptor) や種々の核内受容体 (CAR、PXR、FXR 等) が関与している。この解毒の工程において、求電子物質 (例: アルデヒド、エポキシド)、求核物質 (例: シアン化合物、一酸化炭素)、フリーラジカル、酸化還元活性物質等の毒性を発現する物質が生成することも多い。

このようにして生成した物質あるいは親化合物が標的組織に輸送されると、次の段階として「②細胞内分子との反応」として、DNA、生体内タンパク質、脂質を主な標的とした反応が起こる。これら反応には、共有結合を起こす反応、受容体や酵素等への結合、酸化・還元等があり、こうした反応の結果として細胞内分子の機能が変化する。変化の種類には、活性化、阻害、破壊 (例: 生体膜のリン脂質の過酸化による)、免疫応答 (共有結合することでハプテンとなることによる) がある。一方、細胞内分子とは反応せず、「②細胞内微小環境の変化」を起こさせる場合もある。例えば、ATP 合成に必要な外向き H<sup>+</sup>濃度の勾配消失等がある。

こうした変化の後に③及び④の工程へと進み毒性が発現する。

肝臓における毒性は急性肝障害と慢性肝障害に大別でき、観察される障害のタイプを表 5 に示す。

**表 5 肝臓毒性における障害タイプの大別**

急性肝障害の障害タイプ	慢性肝障害の障害タイプ
肝細胞死	肝炎
脂肪肝	肝硬変
胆汁うっ滞	リン脂質症
毛細胆管性胆汁うっ滞	肝細胞がん
胆管障害性胆汁うっ滞	血管肉腫

図 24 に整理した肝毒性の一般的な発現メカニズムを示す。本事業でインビトロ試験を実施した部分は図中の緑色で囲んだ部分である。

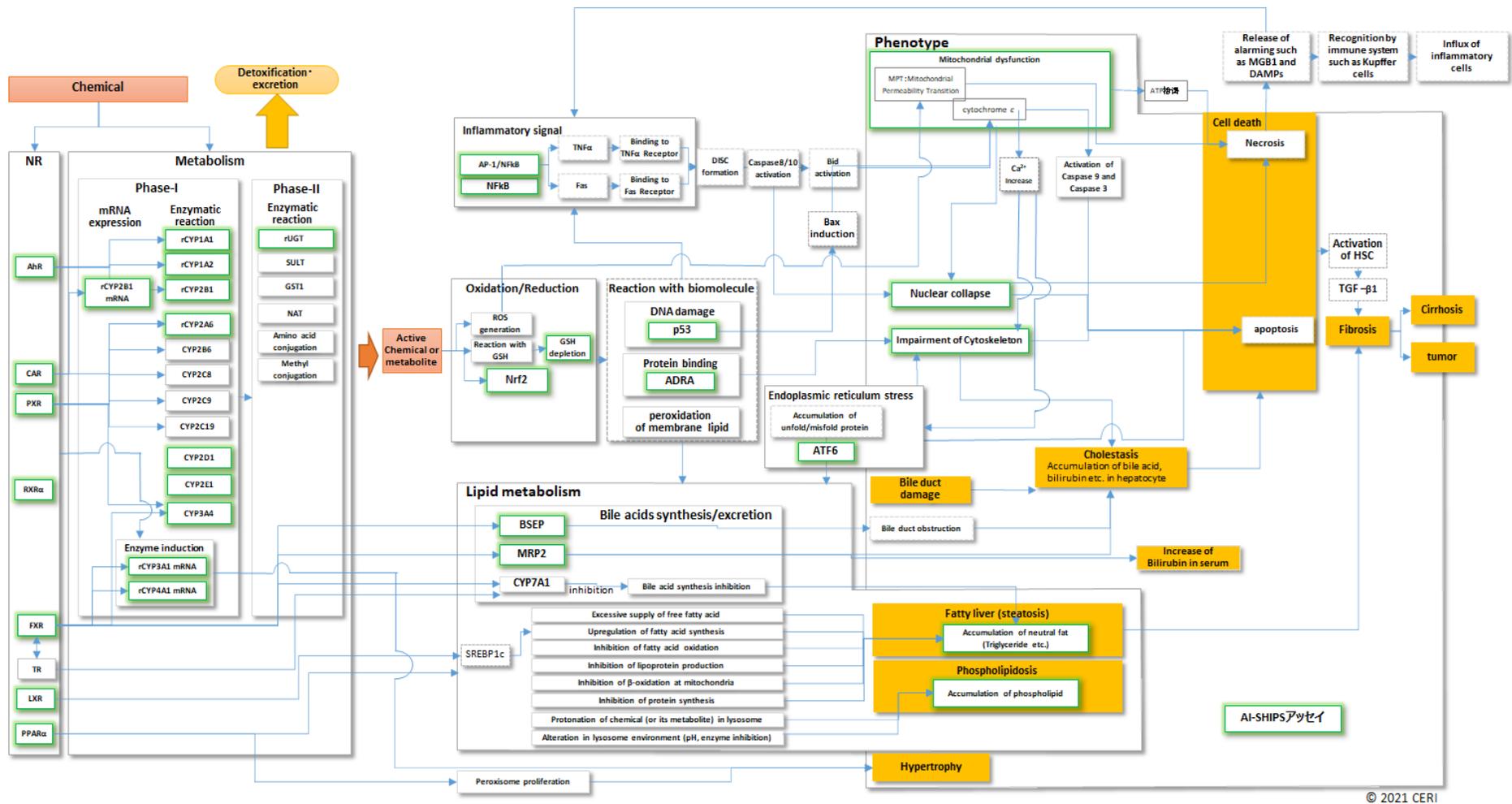


図 24 一般的に知られている肝毒性機序

## (2) 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が有する毒性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的特性のうち、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

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、物理化学的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を明確にする。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、その化学物質が発現し得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で得られる毒性発現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。

### 3) 実施内容と具体的成果

研究開発項目①(b)で得られた毒性発現機序に関するインビトロ試験結果をもとに、インビトロ試験予測モデルを構築した。また、TOX21のデータを用いたMIE予測モデルも構築し、それらの予測値および化学物質の記述子を用いた肝臓・腎臓、血液の各インビボ毒性予測モデルを構築した。

さらに、研究開発項目①(a)で得られた体内動態評価技術を統合し、AI-SHIPS統合的毒性予測システムを構築した。

### 毒性エンドポイントについて

HESSには、各試験あたり400強の毒性所見が記載されている。一般化学物質233物質について雄性ラット28日間反復投与毒性の所見を解析したところ、肝毒性、血液毒性、腎毒性に関する所見が多く見られた（図25）。

順位	毒性所見	陽性率	順位	毒性所見	陽性率
1	肝相対重量増加	52%	9	血中総コレステロールレベル上昇	23%
2	体重減少	41%	10	血中ヘモグロビン濃度低下	18%
3	腎相対重量増加	37%	11	血中ALTレベル上昇	17%
4	流涎	32%	12	ヘマトクリット値低下	17%
5	小葉中心性肝細胞肥大	32%	13	尿量増加	23%
6	肝絶対重量増加	29%	14	赤血球数減少	16%
7	腎好酸性小体/硝子滴	25%	15	血中総ビリルビンレベル上昇	17%
8	摂餌量低下	23%			

図 25 一般化学物質 233 物質の HESS 所見陽性率ランキング

これを踏まえ、HESS に搭載されている全所見から関連所見を抽出してグループ化し、本事業では、図 26 に示す 6 つの肝毒性、2 つの血液毒性、および 1 つの腎毒性の 9 つのグループエンドポイントに対する毒性予測モデルを構築することとした。

ID	グループ名	特徴、代表的所見
1 LV01	細胞傷害・炎症	細胞死・炎症関連所見
2 LV02	肝機能低下	タンパク質合成低下など
3 LV03	肝機能亢進	タンパク質合成亢進など
4 LV04	胆管障害	胆管、胆道系障害
5 LV05	肥大	肝肥大、肝細胞肥大
6 LV06	脂質代謝異常	肝・血中脂質レベル増加・減少
7 BL01	凝固障害	プロトロンビン時間延長など
8 BL02	貧血	赤血球数減少、ヘモグロビン濃度低下など
9 KD01	腎毒性	BUN増加、血中クレアチニン増加など

図 26 AI-SHIPS 統合的毒性予測システムにおける毒性エンドポイント

### インビボ毒性予測モデルの開発戦略

インビボ毒性予測モデルにインプットする情報としては、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、本事業で取得したインビトロ試験データおよび予測値、米国 Tox21 プロジェクトによって公開された MIE の活性スコアを説明変数とした。ただし、全物質を対象として各種のインビトロ試験を実施することは困難であることから、約 330 物質のインビトロ試験データを学習データとして、機械学習を用いた予測モデルを構築し、未実施物質のインビトロ試験の試験データや Tox21 の MIE 活性スコアを予測することで、データの補完を実施した (図 28)

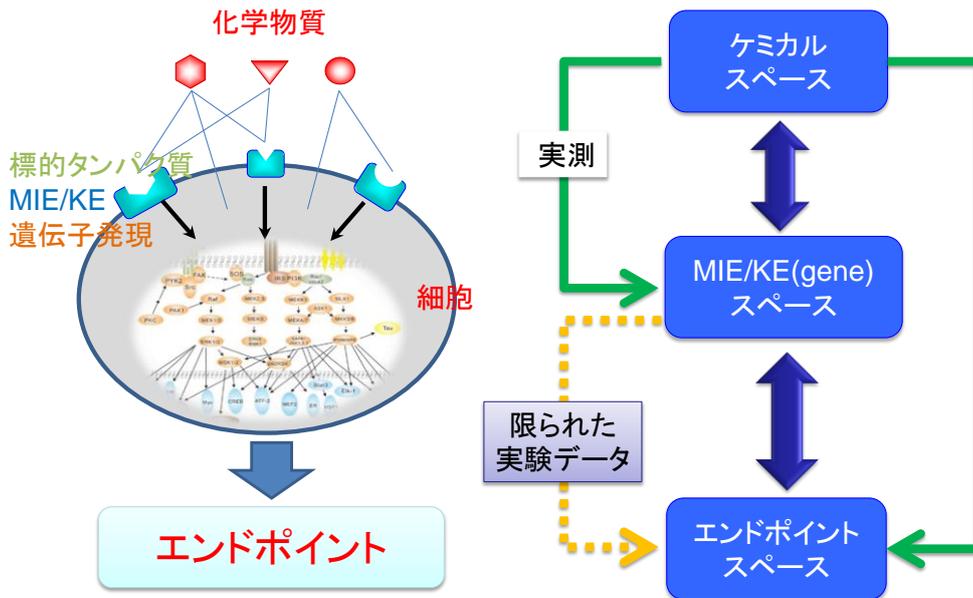


図 27 毒性予測モデルの構築イメージ (船津 3 層モデル)

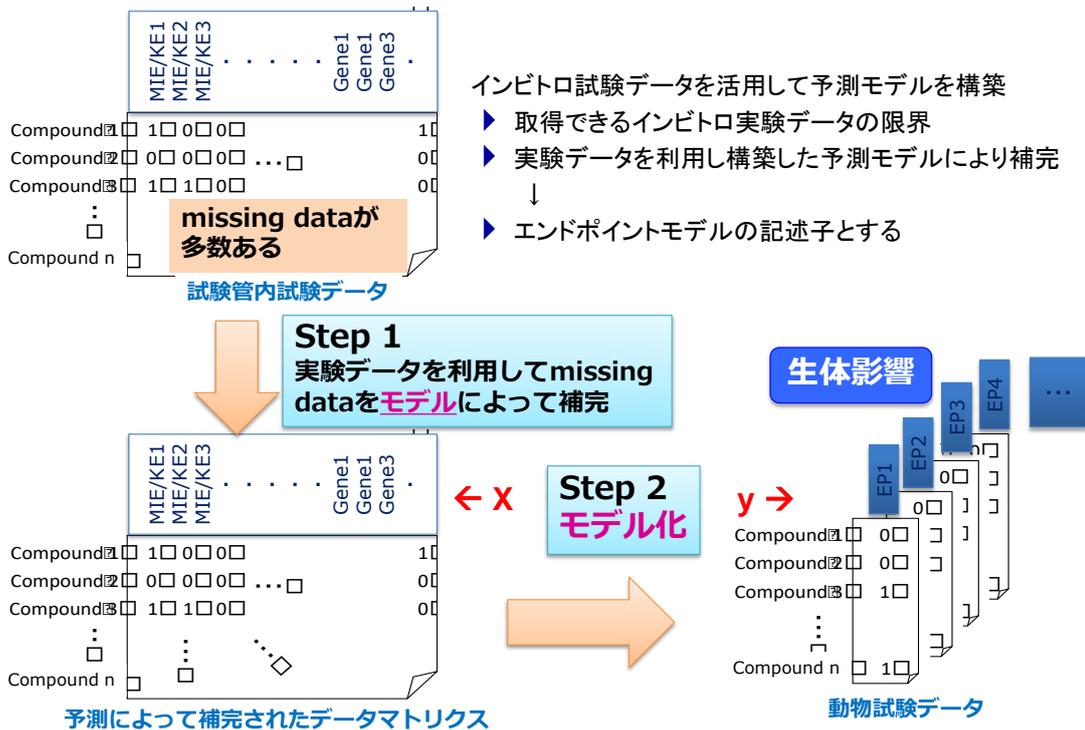


図 28 予測モデルによる実験値の補完イメージ

毒性予測モデルとデータの関係は図 29 のとおり。

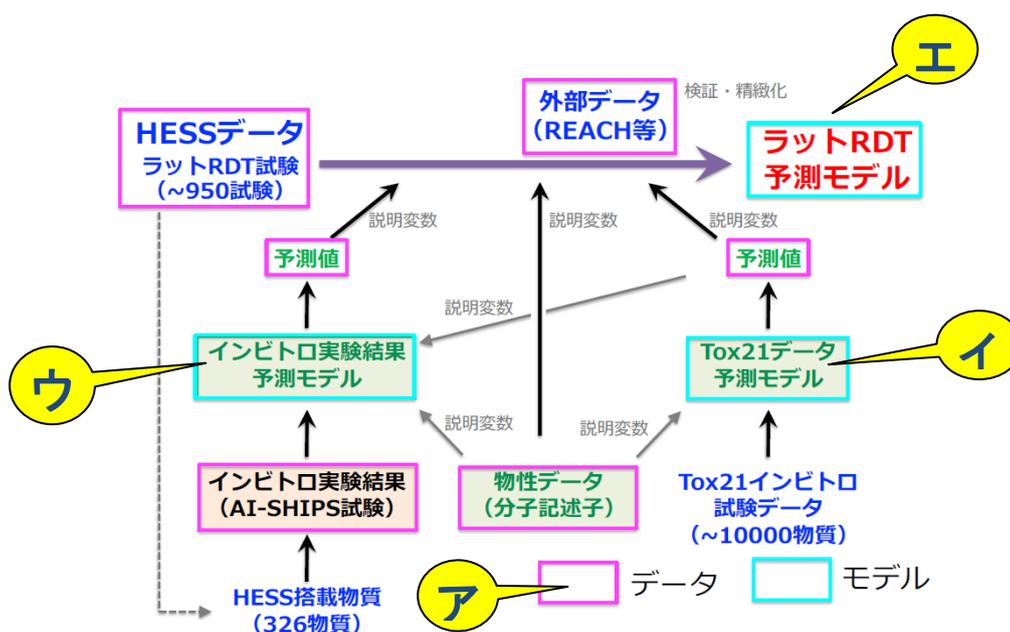


図 29 インビボ毒性予測モデルの開発戦略 (黄色の吹き出しは後述の項目を示す)

なお、2018 年度の間評価時点では、下記について報告した。

- ・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構築。
- ・データマトリクスの構築
- ・インビトロ実験値予測モデルの構築

以降、下記について詳述する。

ア：データマトリクスの作成と管理

イ：インビトロ実験値予測モデルの構築 (その1：Tox21-MIE 活性スコア)

ウ：インビトロ実験値予測モデルの構築 (その2：本事業で実施したインビトロ試験)

エ：肝毒性、腎、血液をエンドポイントとしたインビボ毒性予測モデルの構築

オ：DeepSnap

カ：AI-SHIPS 統合的毒性予測システムの構築 (ア～オ、研究開発項目①(a)の統合化)

## 検討体制

明治薬科大学をリーダーとするモデル開発チームを組織し、イ、ウのインビトロ実験値予測モデルの構築、ならびにエのインビボ毒性予測モデルの構築において、開発環境、使用する化学物質の構造記述子の共通化、開発における課題の共有と検討、AD (Applicability Domain) の考え方の検討などを実施して、品質の統一を図った。

また、静岡県立大学をリーダーとするシステム開発チームを組織し、カの AI-SHIPS 統合的毒性予測システムの構築において、ユーザーシステムとモデル・データ管理システムの開発環境や両者のデータ交換フォーマットの調整を行った。

合わせて、2020 年度から化学系企業等の研究開発部門のメンバーにより構成されたコンソーシアムを設置し、コンソーシアム会議を通じて AI-SHIPS 統合的毒性予測システムに対する要望

などを収集しながら、本システムを構築した。2021年度には、コンソーシアムメンバーを中心とした約40名で本システムのユーザートライアルを実施し、その際に聴取した約200の要望を可能な限りシステムに反映させた。

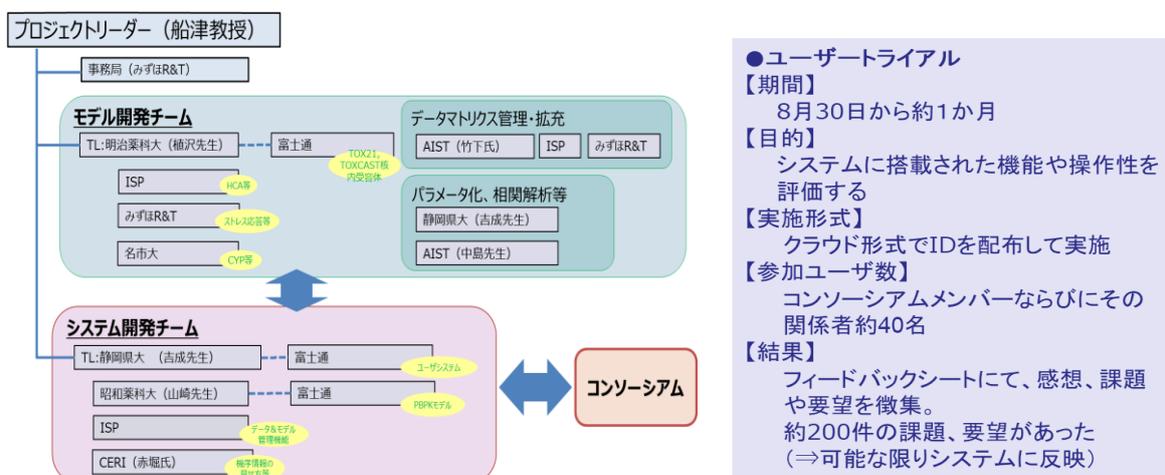


図 30 モデル開発チームと、システム開発チーム、コンソーシアム

#### ア：データマトリクスの作成と管理

本事業では、毒性発現に関わる多様なインビトロ試験を実施し、約360物質について多くのパラメータを取得した(約3,000パラメータ)。また、公的データベースから約10000物質のインビトロ毒性試験データ(米国Tox21プロジェクトデータ)を収集した。他方、インビボ毒性試験に関しても、開発当初はHESSに含まれる約900の試験を対象としていたが、REACHの公開情報などを取得して、最終的に2,000を超える物質について、毒性試験データ(約480の所見および9のグループエンドポイントについてNOEL/LOEL)を収集し、予測モデルの開発に利用することができた。これらのインビトロ試験やインビボ毒性試験結果の拡張は、本事業の目標である、化学構造からの機序をふまえた毒性予測モデルの開発に有用であることはもちろんであるが、世界的に公開されている毒性試験データは限られていることから、体系的に整理して一つのデータセット(データマトリクス)としたことの意義は大きい。

#### データマトリクスの設計と管理

NITEが公開している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、被験物質の構造記述子、物理科学的性状(図31緑色部分の■に該当)、本事業で取得したインビトロ試験の実験値(図31○に該当)、インビトロ試験の予測値(図31のオレンジ色部分の■に該当)および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。

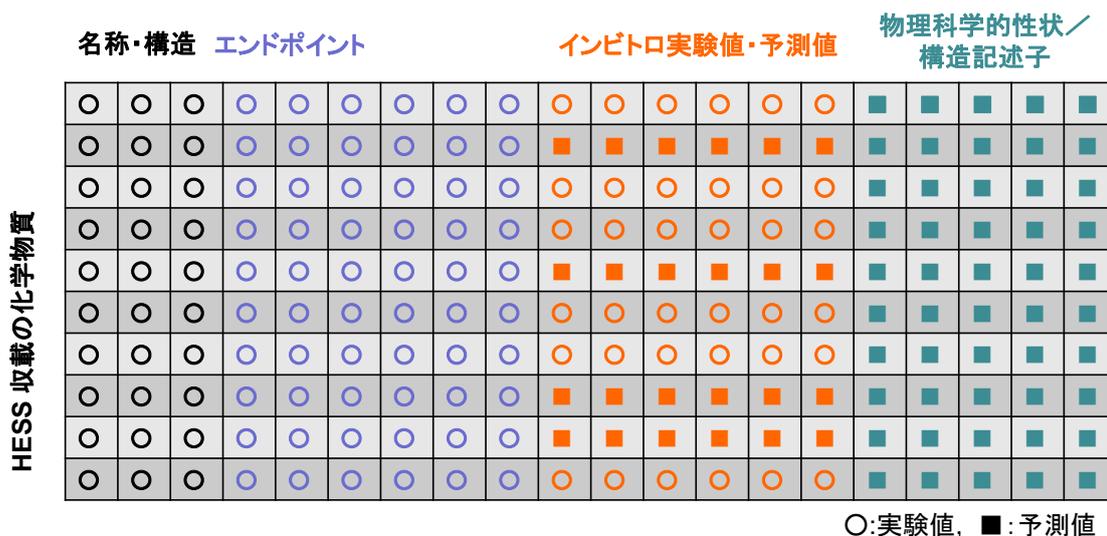


図 31 データマトリクスのイメージ

データマトリクスは、事業実施期間に反復投与毒性試験データの更新、追加や、インビトロ試験データの追加や変更に伴って、逐次バージョンアップを行うとともに、更新履歴を整理して、事業参加者に随時提供することで、インビトロ試験とモデル構築との連携を促進し、事業の効果的な推進に貢献した。

また、最終的には、再整理の上 AI-SHIPS 統合的毒性予測システムに搭載し、データベースの閲覧や類似検索などの情報源にもなっている。

### 反復投与毒性試験データの拡充

エンドポイント予測モデルの学習データとなる反復投与毒性試験データは、中間評価時までは、HESS をベースとした 955 レコードとしていた。その後、予測モデルの精度向上に役立てるため、REACH 登録情報や化審法における新規化学物質の審査に係る毒性情報等、公表されている毒性データベースから得られる 1,250 物質の毒性情報を収集し、HESS と同様の約 400 の所見項目に従って整理し、データマトリクスの項目に従ってデータ化した。

表 6 データマトリクス拡充のため、追加した反復投与毒性試験データの内容

情報源		収集物質（試験）数
化審法新規審査シート		139
HESS v4.0 に記載の ToxRef DB		23
REACH 登録情報	TG407（28 日）	645
	TG422（28 日生殖併合）	443

イ：インビトロ実験値予測モデルの構築（その1：Tox21-MIE 活性スコア）

米国 Tox21 プロジェクトによって公開されている核内受容体及びストレス応答パスウェイについて、8,000~10,000 化合物の活性データベースから、毒性発現において初期のステップとして重要である MIE 59 種（Tox21-MIE 活性スコア）を予測対象として予測モデルを構築した。

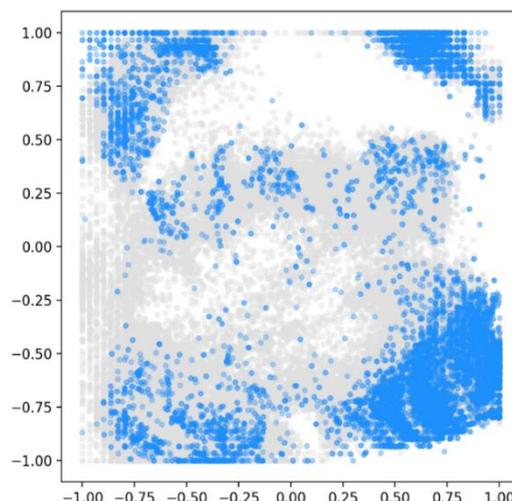
MIE ごとに、9667 化合物の実験データを含んでおり（ケミカルスペースにおける広がりを図 32 に示す）、各化合物がそれぞれの MIE について Tox21 プロジェクトで付与された 0~100 の整数値の活性スコアを持つ。0 が不活性、40 以上が活性ありで、1~39 はその中間の弱い活性が認められるものである。本事業では、

- ・Tox21 プロジェクトの定義どおりに 40 以上が活性有りとした場合
- ・多くの MIE では値が 0 の化合物が大半を占めるため、1 以上を活性有りとした場合

の 2 通りの方法でそれぞれ 2 値化を行い、2 つの 2 値分類モデルを構築した。

インビトロ実験値予測モデルの構築に用いる手法を選定するため、正則化項つきロジスティック回帰、ランダムフォレスト、勾配ブースティング、ディープニューラルネットワーク（DNN）のアルゴリズムを試行し、最も良い精度を得た手法を採用した。それぞれの手法について、指定したハイパーパラメータの範囲で、学習データに対する 5 分割クロスバリデーションを実施し、その ROC 平均値が最良のグリッドをプロトタイプモデル構築に用いるハイパーパラメータとした。

平均 AUC として 0.826（閾値 1）、0.867（閾値 40）を達成した。



\*背景の灰色のプロットは、参照として PubChem から抽出した約 10 万件の物質

図 32 TOX21 の物質（青）のケミカルスペースにおける広がり

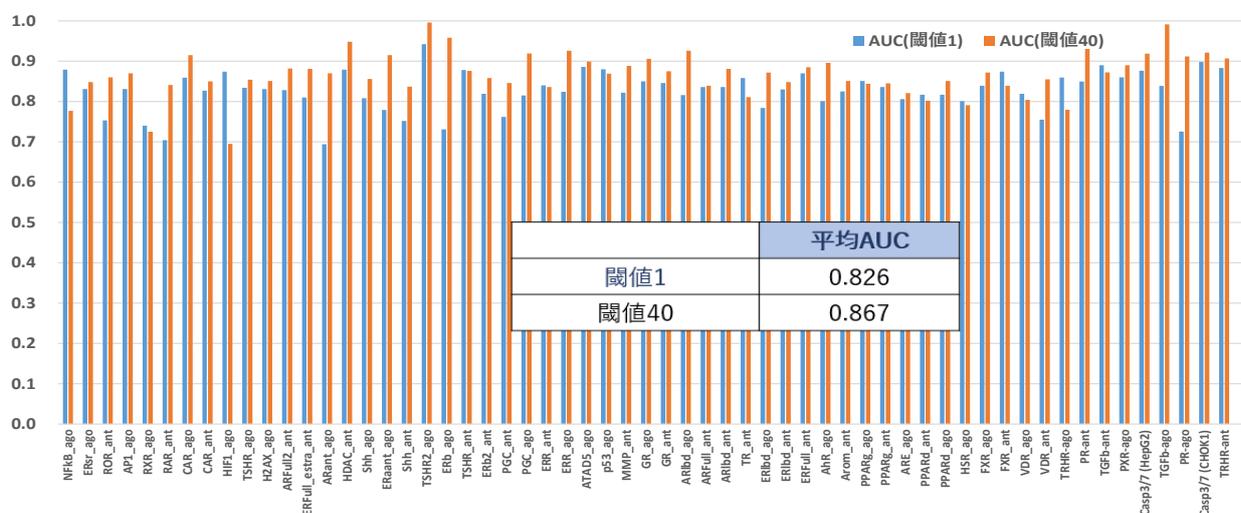


図 33 Tox21-MIE 活性スコア予測モデルの予測精度

ウ：インビトロ実験値予測モデルの構築（その2：本事業で実施したインビトロ試験）

研究開発項目①(b)で実施した各インビトロ試験について、試験結果の予測モデルを構築した。

#### 【インビボ毒性予測のためのインビトロパラメータの最適化】

実施した各インビトロ試験について予測モデルを構築することになるが、各インビトロ試験で得られる測定データの数は多く、全測定データの予測モデルを構築することは現実的ではない。そこで、測定データの傾きをとるなどしてデータ数を集約し、実験結果を表現し得るパラメータを決定し、これを予測対象とすることとした。

予測モデル構築対象とするパラメータの決定については、実験担当者とモデル化担当者が検討を進め、インビボ毒性との相関解析等を実施して抽出した。例えば、P450分子種では3濃度についての値を取得した。そのうち、3つの濃度の最大値を採用することとした。また、ストレス応答シグナル伝達経路に対する影響評価については、約30分おきに72時間分の測定データが取得された。そこで internal control（細胞毒性）、pathway（対象遺伝子活性化及び発現量変動）について、72時間分（約30分毎）のデータを8時間区切りの区間ごと区間内 area under the curve (AUC) と極大値(Emax)を算出し、6濃度のデータから NOEC (no observed effect concentration) を設定した。採用する時間区間はインビボ肝毒性との相関ランキング（Mordred 記述子と共に相関を計算し、インビトロ記述子の順位を算出）が最も上位になる様にそれぞれ決定した。この NOEC をモル濃度では 1000  $\mu\text{M}$ 、重量モル濃度では 50 mg/L で 2 値化したバイナリーデータをインビトロ予測対象とした。

最終的に、130 のインビトロ予測モデル構築対象パラメータを抽出した(表 7)。

表 7 インビトロ実験で得られた実験値から予測モデルの対象としたパラメータの決定方法数

評価項目と各インビトロ 試験で取得した値		予測対象パラメータへの変換（測定結果の本質を損なうことなく パラメータ数を減らす）	予測対象 パラメータ の数
<b>1. 薬物代謝酵素等反応性評価</b>			
ラット	<b>P450 反応性評価（7分子種、3濃度）</b>	各分子種について、各濃度（3濃度）における阻害作用%の 最大値を採用	7
ラット	<b>総 UGT 活性（1種、3濃度）</b>	各濃度（3濃度）における阻害作用%の最大値を採用	1
ヒト	<b>P450 反応性評価（11分子種、3濃度）</b>	各分子種について、各濃度（3濃度）における阻害作用%の 最大値を採用	11
<b>2. 酸化還元</b>			
RatHep	<b>細胞内 GSH 含量測定（3濃度）</b>	各濃度（3濃度）における含有変化量の最大値を採用	1
HepG2 細胞	<b>細胞内 GSH 含量測定（3濃度）</b>		1
ラット NRK-52E 細胞	<b>細胞内 GSH 含量測定（3濃度）</b>		1
<b>3. タンパク質反応性</b>			
	<b>ADRA（1濃度）</b>	NAC 減少率と NAL 減少率の平均値	1
<b>4. 胆汁酸トランスポーター</b>			
ラット	<b>胆汁酸トランスポーター（MRP2） （1濃度）</b>	阻害作用%	1
ラット	<b>胆汁酸トランスポーター（BSEP） （1濃度）</b>	阻害作用%	1
<b>5. 核内受容体活性化作用評価</b>			
ラット NR	<b>AHR（3濃度）</b>	各濃度（3濃度）における活性化作用（溶媒対照群に対す る倍率）の最大値を採用	1
ラット NR	<b>PXR（3濃度）</b>		1
ラット NR	<b>PPARα（3濃度）</b>		1
ラット NR	<b>RXRα（3濃度）</b>		1
ラット NR	<b>LXRα、FXR（3濃度）</b>		2
<b>6. 酵素誘導</b>			
ラット NR	<b>mRNA</b>	CYP2B1、CYP3A1、CYP4A1 についての mRNA レベル増 加率（溶媒対照群に対する倍率）。さらに、CYP2B1 /CYP3A1（両者の比）、CYP2B1/CYP3A1/CYP4A1 （CYP2B1 mRNA レベルを CYP3A1 mRNA レベル及び CYP4A1 mRNA レベルで除した値）	5
<b>7. 細胞小器官評価（HCA）</b>			
ラット肝細胞	<b>核（Nuc）、ミトコンドリア（Mit）、 細胞骨格（Factin）（6濃度）</b>	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濃度での結果から 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	15
ラット肝細胞	<b>中性脂肪（TG）、リン脂質（PL） （6濃度）</b>	中性脂肪とリン脂質についてのサイズ、面積、蛍光強度など 28 の測定項目のうち、肝毒性と相関の強い中性脂肪及びリン脂質 の細胞内及び細胞質内総蛍光強度の NOEC <sub>w</sub> （閾値を超え ない最大重量濃度）を採用	4

評価項目と各インビトロ試験で取得した値		予測対象パラメータへの変換（測定結果の本質を損なうことなくパラメータ数を減らす）	予測対象パラメータの数
HepG2 細胞	核 (Nuc) 、ミトコンドリア (Mit) 、細胞骨格 (Factin) (6濃度)	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 濃度での結果から 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 13 個を選定	13
HepG2 細胞	中性脂肪 (TG) 、リン脂質 (PL) (6濃度)	中性脂肪とリン脂質についてのサイズ、面積、蛍光強度など 28 の測定項目のうち、肝毒性と関連の強い中性脂肪及びリン脂質の細胞内及び細胞質内総蛍光強度の NOECw（閾値を超えない最大重量濃度）を採用	4
ラット NRK-52E 細胞	核 (Nuc) 、ミトコンドリア (Mit) 、細胞骨格 (Factin) (6濃度)	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（各 6 濃度）から、肝毒性と関連の強い核、ミトコンドリア、細胞骨格について 2 つずつ、計 6 つを選定	6
<b>8. 細胞傷害性評価</b>			
ラット肝細胞	LDH 放出 (6濃度)	6 濃度データから算出される無影響重量濃度（LDH は、定めた閾値を超えない最大濃度。最低濃度で閾値を超えた場合は 0、Celltiter は定めた閾値を下回らない最大濃度。最低濃度で閾値を超えた場合は 0）	1
ラット肝細胞	Celltiter アッセイ (6濃度)		1
HepG2 細胞	LDH 放出 (6濃度)		1
HepG2 細胞	Celltiter アッセイ (6濃度)		1
ラット NRK-52E 細胞	LDH 放出 (6濃度)		1
ラット NRK-52E 細胞	Celltiter アッセイ (6濃度)		1
<b>9. ストレス応答シグナル伝達経路に対する影響評価</b>			
HepG2 細胞	酸化ストレス (Nrf2) (6濃度)	Internal control (細胞毒性), pathway (対象遺伝子活性化及び発現量変動)について、72 時間分(約 0.5h 毎)のデータを 8 時間区切りの区間ごと区間内 area under the curve (AUC) と極大値(Emax)を算出し、6 濃度のデータから NOEC (no observed effect concentration)を設定。この内採用する時間区間はインビトロ肝毒性との相関ランキング (Mordred 記述子と共に相関を計算し、インビトロ記述子の順位を算出) が最も上位になる様にそれぞれ決定した。この NOEC をモル濃度では 1000 μM、重量モル濃度では 50 mg/L で 2 値化したバイナリーデータをインビトロ予測対象とした。	8
HepG2 細胞	炎症応答 (NF-κB) (6濃度)		8
HepG2 細胞	小胞体ストレス (ATF6) (6濃度)		8
HepG2 細胞	DNA 損傷 (p53) (6濃度)		8
HepG2 細胞	低酸素ストレス応答 (HIF1) (6濃度)		8
<b>10. マクロファージ細胞に対する影響評価</b>			
マウス	マクロファージ RAW264.7 細胞影響 (6濃度)	細胞生存率(WST8)、SEAP 活性化、及び FC 値 (SEAP/WST8)のそれぞれについてモル濃度 NOEC、重量濃度 NOEC を算出し、これをモル濃度では 1000 μM、重量モル濃度では 50 mg/L で 2 値化したパラメータを採用した。	6
合計			130

### 【予測モデル構築と精度評価結果】

決定した予測対象パラメータ（インビトロ実験値）について、インビトロ実験値を陽性・陰性で予測する二値分類モデルを構築した。モデル構築に用いる学習データの陽性・陰性の判定につい

では、当該データを取得した各実験の特性を踏まえて決定した。

例えば P450 分子種では 3 濃度での値を取得したが、UGT では 15% または 20% を阻害活性値の閾値とし、胆汁酸トランスポーターでは、MRP2 は 10%、BSEP は 20% を阻害活性値の閾値として、それぞれの定義にて陽性物質と陰性物質を決定した。

学習データは、各モデルとも共通の 326 物質を使用した（一部の実験では品質の高い結果が得られなかった等の理由で、326 物質より若干少ない物質を使用した。また、ADRA については、陽性・陰性のデータバランスを考慮して別途検討した 170 物質について実験・モデル化を実施した）。

予測モデルでは、目的関数ごとに定義された陽性（反応性有り）、陰性（反応性無し）を目的変数とし、Mordred 2D、3D 記述子（1825 個）あるいは、Mordred 2D、3D 記述子と Tox21-MIE 活性スコア予測値（イで開発した予測モデルによる予測値）を説明変数とした。なお、Mordred 記述子については、前処理として、326 物質に対して、欠損値があるものや、一定の値となっているもの、他の記述子と相関が高いものなどを削除し、標準化（平均 0、標準偏差 1 に変換）によるスケールングを行った。

また、モデル構築に使用した 326 物質とは別の 32 物質を外部検証用として選定し、これらの物質の実験結果を使用して、外部検証を行った。

最終的に、未評価物質の予測モデルは、外部検証用物質も含めた 358（326+32）物質で学習させることで予測モデルを構築した。

評価結果を表 8 および表 9 に示す。なお、外部評価の対象物質は 32 物質と少なく、さらに陽性物質数は 10 件未満のターゲットも多い。そのため、評価結果の数値は hold-out に比べて誤差が大きいと考えられることから、外部評価の結果は参考情報としつつも、hold-out の精度を主要な評価値として用いることとした。エで述べるインビボ毒性予測モデルの説明変数に加えるかどうかの判断についても、hold-out の精度を基準とした。構築したインビトロ実験モデルの精度をグラフ化して示したものが図 34。全体の平均として、感度 0.736、特異度 0.794、Balanced Accuracy 0.765、ROC-AUC 0.804 を達成した。

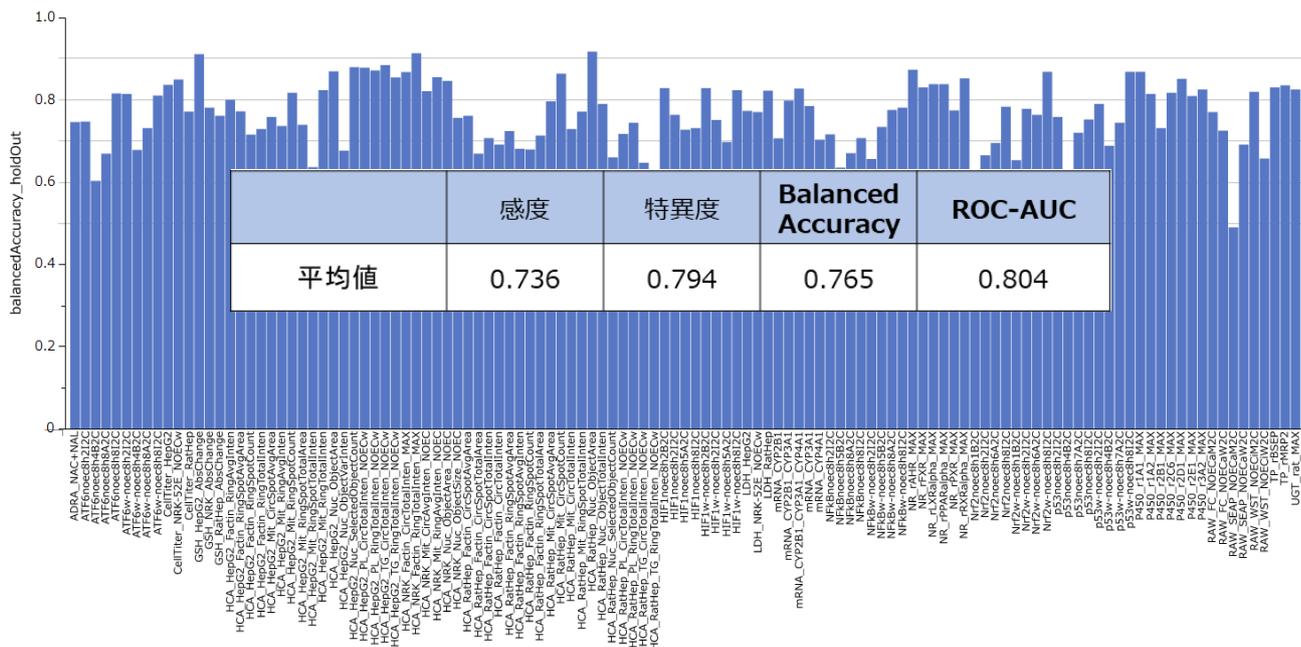


図 34 インビトロ実験系の予測モデルの予測精度

表 8 各インビトロモデルの hold-out 時の評価結果と外評価結果（その1）

インビトロ 試験で取得した値		予測モデル数	モデル化手法	hold-out			外部検証		
				感度	特異度	Balanced Accuracy	感度	特異度	Balanced Accuracy
<b>1. 薬物代謝酵素等反応性評価</b>									
ラット	P450反応性評価（7分子種、3濃度）	7	A-1	0.960	0.775	0.868	0.000	1.000	0.267
				0.786	0.843	0.814	0.000	0.667	0.826
				0.667	0.795	0.731	0.000	0.929	0.611
				0.895	0.739	0.817	0.000	0.875	0.938
				0.857	0.845	0.851	0.000	0.600	0.926
				0.667	0.952	0.809	0.000	0.000	0.968
ラット	総UGT活性（1種、3濃度）	1	A-1	0.875	0.776	0.825	0.000	0.636	0.762
ヒト	P450反応性評価（11分子種、3濃度）	11	A-1	0.741	0.789	0.765	0.000	0.737	0.643
				0.846	0.885	0.865	0.000	0.444	0.875
				0.818	0.860	0.839	0.000	0.800	0.889
				0.818	0.764	0.791	0.000	1.000	0.844
				0.850	0.822	0.836	0.000	0.800	0.778
				0.733	0.860	0.797	0.000	0.500	0.903
				0.773	0.814	0.793	0.000	0.789	0.857
				0.773	0.864	0.818	0.000	0.556	1.000
				0.750	0.852	0.801	0.000	0.667	0.792
				0.571	0.814	0.692	0.000	0.000	0.844
				0.880	0.750	0.815	0.000	0.762	0.667
<b>2. 酸化還元</b>									
RatHep	細胞内GSH含量測定（3濃度）	1	B	0.708	0.814	0.761	0.000	1.000	0.600
HepG2細胞	細胞内GSH含量測定（3濃度）	1	B	0.941	0.880	0.911	0.000	1.000	0.724
ラットNRK-52E細胞	細胞内GSH含量測定（3濃度）	1	B	0.931	0.632	0.781	0.000	1.000	0.600
<b>3. タンパク質反応性</b>									
	ADRA（1濃度）	1	A-2	0.700	0.792	0.746	0.000	0.500	0.667
<b>4. 胆汁酸トランスポーター</b>									
ラット	胆汁酸トランスポーター（MRP2）（1濃度）	1	A-1	0.857	0.814	0.835	0.000	1.000	0.871
ラット	胆汁酸トランスポーター（BSEP）（1濃度）	1	A-1	0.875	0.786	0.830	0.000	0.333	0.897
<b>5. 核内受容体活性化作用評価</b>									
ラット NR	AHR（3濃度）	1	B	0.875	0.871	0.873	0.000	0.429	0.720
ラット NR	PXR（3濃度）	1	B	0.615	0.932	0.774	0.000	0.769	0.842
ラット NR	PPARα（3濃度）	1	B	0.857	0.820	0.838	0.000	0.000	0.828
ラット NR	RXRα（3濃度）	1	B	1.000	0.705	0.852	0.000	1.000	0.481
ラット NR	LXRα, FXR（3濃度）	2	B	0.857	0.820	0.838	0.000	1.000	0.871
				0.857	0.803	0.830	0.937	0.000	0.875
<b>6. 酵素誘導</b>									
ラット NR	mRNA	5	B	0.861	0.552	0.706	0.000	1.000	0.154
				0.769	0.800	0.785	0.000	0.652	0.556
				0.714	0.692	0.703	0.000	0.889	0.217
				0.786	0.811	0.798	0.000	0.692	0.368
				0.905	0.750	0.827	0.000	1.000	0.250
<b>7. 細胞小器官評価（HCA）</b>									
RatHep	核（Nuc）、ミトコンドリア（Mit）、細胞骨格（Factin）（6濃度）	15	C	0.444	0.875	0.660	0.000	0.667	0.724
				0.889	0.945	0.917	0.000	1.000	0.767
				0.727	0.852	0.790	0.000	1.000	0.714
				0.611	0.848	0.729	0.000	0.714	0.833
				0.688	0.854	0.771	0.000	0.857	0.760
				0.714	0.877	0.796	0.000	0.333	0.724
				0.818	0.907	0.863	0.000	1.000	0.828
				0.571	0.877	0.724	0.000	0.000	0.813
				0.667	0.855	0.761	0.000	0.000	0.563
				0.625	0.758	0.691	0.000	0.667	0.462
				0.829	0.533	0.681	0.000	0.750	0.375
				0.529	0.896	0.713	0.000	1.000	0.800
				0.692	0.667	0.679	0.000	1.000	0.500
0.688	0.727	0.707	0.000	0.833	0.538				
0.583	0.755	0.669	0.000	0.000	0.500				
RatHep	中性脂肪（TG）、リン脂質（PL）（6濃度）	4	B	0.643	0.792	0.717	0.000	0.400	0.824
				0.571	0.917	0.744	0.000	0.000	0.867
				0.407	0.886	0.647	0.000	0.000	0.900
				0.308	0.861	0.584	0.000	1.000	0.935

表 9 各インビトロモデルの hold-out 時の評価結果と外評価結果 (その2)

インビトロ 試験で取得した値		予測モデル数	モデル化手法	hold-out			外部検証		
				感度	特異度	Balanced Accuracy	感度	特異度	Balanced Accuracy
HepG2細胞	核 (Nuc) 、ミトコンドリア (Mit) 、細胞骨格 (Factin) (6濃度)	13	C	0.842	0.917	0.879	0.000	0.818	0.905
				0.500	0.852	0.676	0.000	0.667	0.654
				0.857	0.881	0.869	0.000	0.667	0.862
				0.783	0.864	0.823	0.000	1.000	0.895
				0.609	0.864	0.736	0.000	0.714	0.833
				0.576	0.697	0.636	0.000	0.826	0.778
				0.636	0.841	0.739	0.000	0.600	0.706
				0.786	0.849	0.817	0.000	1.000	0.679
				0.652	0.864	0.758	0.000	0.684	0.769
				0.636	0.822	0.729	0.000	1.000	0.760
				0.783	0.818	0.800	0.000	0.727	0.857
				0.579	0.851	0.715	0.000	0.857	0.840
				0.667	0.877	0.772	0.000	0.833	0.808
HepG2細胞	中性脂肪 (TG) 、リン脂質 (PL) (6濃度)	4	B	0.857	0.898	0.878	0.000	0.889	0.783
				0.905	0.837	0.871	0.000	0.857	0.760
				0.955	0.813	0.884	0.000	1.000	0.652
				0.952	0.755	0.854	0.000	1.000	0.654
ラットNRK-52E細胞	核 (Nuc) 、ミトコンドリア (Mit) 、細胞骨格 (Factin) (6濃度)	6	B	0.941	0.792	0.867	0.000	0.857	0.760
				1.000	0.827	0.913	0.000	0.875	0.750
				0.938	0.704	0.821	0.000	0.900	0.727
				0.917	0.793	0.855	0.000	0.750	0.750
				0.889	0.803	0.846	0.000	1.000	0.552
				0.625	0.887	0.756	0.000	0.667	0.862
<b>8. 細胞傷害性評価</b>									
ラット肝細胞	LDH放出 (6濃度)	1	C	0.778	0.867	0.822	0.000	0.667	0.696
ラット肝細胞	Celltiterアッセイ (6濃度)	1		0.714	0.827	0.771	0.000	0.800	0.704
HepG2細胞	LDH放出 (6濃度)	1		0.727	0.818	0.773	0.000	1.000	0.833
HepG2細胞	Celltiterアッセイ (6濃度)	1		0.842	0.830	0.836	0.000	0.846	0.895
ラットNRK-52E細胞	LDH放出 (6濃度)	1		0.667	0.873	0.770	0.000	0.750	0.857
ラットNRK-52E細胞	Celltiterアッセイ (6濃度)	1	0.750	0.948	0.849	0.000	0.833	0.885	
<b>9. ストレス応答シグナル伝達経路に対する影響評価</b>									
HepG2細胞	酸化ストレス (Nrf2) (6濃度)	8	D	0.680	0.650	0.665	0.000	0.786	0.667
				0.688	0.879	0.783	0.000	0.941	0.733
				0.857	0.533	0.695	0.000	0.944	0.571
				0.680	0.575	0.628	0.000	0.636	0.619
				0.800	0.756	0.778	0.000	0.692	0.684
				0.833	0.902	0.868	0.000	0.800	0.824
				0.654	0.872	0.763	0.000	0.938	0.938
				0.550	0.756	0.653	0.000	0.600	0.545
				0.750	0.683	0.716	0.000	0.875	0.625
				0.688	0.727	0.707	0.000	0.941	0.533
HepG2細胞	炎症応答 (NF-κB) (6濃度)	8	D	0.722	0.617	0.670	0.000	0.800	0.481
				0.520	0.750	0.635	0.000	0.563	0.750
				0.600	0.711	0.656	0.000	0.750	0.667
				0.708	0.854	0.781	0.000	0.800	0.882
				0.786	0.765	0.775	0.000	1.000	0.679
				0.810	0.659	0.734	0.000	0.600	0.824
				0.773	0.721	0.747	0.000	0.533	0.765
				0.818	0.813	0.815	0.000	0.882	0.733
				0.588	0.750	0.669	0.000	0.667	0.462
				0.611	0.596	0.603	0.000	1.000	0.522
HepG2細胞	小胞体ストレス (ATF6) (6濃度)	8	D	0.850	0.778	0.814	0.000	0.857	0.667
				0.720	0.900	0.810	0.000	0.933	0.941
				0.692	0.769	0.731	0.000	1.000	0.643
				0.571	0.784	0.678	0.000	0.875	0.750
				0.786	0.730	0.758	0.000	0.846	0.632
				0.656	0.848	0.752	0.000	0.882	0.733
				0.714	0.725	0.720	0.000	1.000	0.654
				0.688	0.571	0.629	0.000	0.714	0.480
				0.750	0.829	0.790	0.000	0.692	0.789
				0.833	0.902	0.868	0.000	1.000	0.882
HepG2細胞	DNA損傷 (p53) (6濃度)	8	D	0.636	0.852	0.744	0.000	0.400	0.778
				0.727	0.648	0.688	0.000	0.800	0.630
				0.607	0.919	0.763	0.000	0.632	0.538
				0.833	0.629	0.731	0.000	0.882	0.600
				0.625	0.829	0.727	0.000	0.929	0.833
				0.774	0.882	0.828	0.000	0.727	0.600
				0.739	0.762	0.751	0.000	0.846	0.684
				0.792	0.854	0.823	0.000	1.000	0.882
				0.667	0.727	0.697	0.000	0.923	0.842
				0.880	0.775	0.828	0.000	0.733	0.647
<b>10. マクロファージ細胞に対する影響評価</b>									
マウス	マクロファージRAW264.7細胞影響 (6濃度)	6	D	0.833	0.805	0.819	0.000	0.933	0.765
				0.308	0.673	0.490	0.000	1.000	0.600
				0.800	0.740	0.770	0.000	1.000	0.655
				0.611	0.702	0.657	0.000	0.909	0.810
				0.600	0.782	0.691	0.000	1.000	0.700
				0.727	0.722	0.725	0.000	1.000	0.690

表 10 インビトロモデル構築の方法

区分は表 8 および表 9 の「モデル化手法」

区分	説明変数	アルゴリズム	学習データ数、2 値化閾値
A-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ Mordred 2D、3D 記述子 1825 種類</li> <li>・ ただし、全化合物で計算不可なものや、値が全化合物で同じもの、他変数と相関が高いものは削除し、594 種類を使用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ XGBoost</li> <li>・ 予測モデルの評価は nested cross validation (5×2 の入れ子式交差検証) を用いて実施</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 326 物質 (rBSEP は 322 物質)</li> <li>・ 阻害活性値について 450 分子種は 15%(CYP2E1 のみ 20%)、UGT は 15%、MRP2 は 10%、BSEP は 20% を閾値として 2 値化</li> </ul>
A-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ Mordred 2D、3D 記述子 1825 種類</li> <li>・ ただし、全化合物で計算不可なものや、値が全化合物で同じもの、他変数と相関が高いものは削除し、592 種類を使用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ XGBoost</li> <li>・ 予測モデルの評価は nested cross validation (5×2 の入れ子式交差検証) を用いて実施</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 170 物質</li> <li>・ TG 442C での判定基準を基に、予測モデルの性能が高くなる値 (NAC と NAL の減少率の平均値 3.5%) を閾値として 2 値化</li> </ul>
B	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ mordred 記述子 1826 種類と Tox21 MIE 予測モデル 118 種類の予測値 (0~1 の確率値)</li> <li>・ ただし、全化合物で計算不可なものや値が全化合物でおなじもの、他変数と値が完全に一致するもの等は削除</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ Random Forest Classifier (評価関数をエントロピーに変更)、XGBoost および LightGBM の 3 つを用いてモデル化・精度評価し、より精度の高いアルゴリズムを選択</li> <li>・ トレーニングセット内では、3-fold クロスバリデーションもしくは 3x2 の入れ子式交差検証によってハイパーパラメータを最適化</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 326 物質</li> <li>・ 核内受容体グループは 2 以上を陽性、CAR 受容体グループは、2B1 を含むものは 3 以上を陽性、それ以外は 2 以上を陽性として 2 値化</li> <li>・ HCA グループは、10 以下を陽性とする</li> <li>・ NRK HCA グループ (Mit, Nuc は 30 以下、Factin は 1.5 以上を陽性とする)</li> <li>・ NRK HCA グループ (Mit, Nuc は 30 以下、Factin は 1.5 以上を陽性とする)</li> <li>・ GSH 活性グループ (0.2 より大きいものを陽性とする)</li> </ul>
C	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ mordred 記述子 (相関の高い変数、欠損値の多い記述子を除いた 844 変数) ならびに Tox21-MIE 活性スコア予測値 118 種から 50~200 程度の変数を選択して仕様</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 勾配ブースティング (LightGBM を利用)</li> <li>・ モデル構築時の評価にはあらかじめテスト用に 15%程度除外したデータを使用</li> <li>・ 5 パターンの 3-fold cross validation を実施。予測値は当該 validation 結果 (計 15 モデル) の多数決によるものとした</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 326 物質 (LDH_RatHep310 物質、HCA_RatHep_318 物質)</li> <li>・ 算出された NOEC について、NOEC 値=100 の場合を陰性、それ以外の場合を陽性として 2 値化を実施</li> </ul>
D	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ mordred 記述子及び Tox21 の Molecular Initiating Event (MIE) 予測値</li> <li>・ 欠損状況や相関を考慮して抽出した 1,035 個を使用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ ランダムフォレスト (RF)、勾配ブースティング (LightGBM) を採用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 326 物質</li> <li>・ 算出された NOEC について、モル濃度では 1000 μM 未満、重量モル濃度では 50 mg/L 以下をポジティブとした。</li> </ul>

エ：肝毒性、腎、血液をエンドポイントとしたインビボ毒性予測モデルの構築

「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(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)を予測するモデルを構築した。HESS に記載されている全 441 所見 (雄性ラット)の分析を行い、肝、腎臓、血液毒性に関し表 11 に示す 9 所見にグルーピングを行い、各グループのエンドポイントを予測対象とした。また、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、「NO(A)EL≤300mg/kg/day」(陽性)か否(陰性)かの2区分に分類する二値分類モデル(「NOEL≤300モデル」という)と「NO(A)EL≤30mg/kg/day」(陽性)か否(陰性)かの2区分に分類する二値分類モデル(「NOEL≤30モデル」という)の2つの二値判定モデルを構築することとした(図25)。

なお、9種類のエンドポイント予測はそれぞれ独立したモデルによって実行されるため、各エンドポイントの予測結果はお互いに影響しない。

表 11 予測対象エンドポイント

分類	名称	グループ名	特徴・代表的所見
肝毒性	EP_LV01	細胞障害・炎症	細胞死関連所見
	EP_LV0	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
血液毒性	EP_BL01	血液凝固異常	血液凝固異常・出血傾向
	EP_BL02	貧血	貧血
腎毒性	EP_KD01	腎機能障害	腎の傷害・機能障害

本事業で予測する閾値

分類基準	有害性の項目	有害性クラス (有害性の単位はmg/kg/day)				
		1	2	3	4	クラス外
スクリーニング評価の判断基準 (28日)	一般毒性	D値=0.0005 NOAEL=0.3	D値=0.005 NOAEL=3	D値=0.05 NOAEL=30	D値=0.5 NOAEL=300	

図 35 化審法における有害性クラスの閾値と、本事業で採用した2値化の閾値

インビボ毒性予測モデルは以下のパラメータを説明変数として構築した。

- A) 表12に示す15種のmordred記述子。1,000を超えるmordred記述子から、モデル構築に有効な記述子を評価・選択した。
- B) イで構築された118個のTox21-MIE活性スコア予測モデル(59種類のTox21-MIEに対して、それぞれ活性有無の閾値スコアを1と40にした2つのモデルがある)のうち、精度評価でbalanced accuracy≥0.65を達成した101種のモデルの予測値(0~1の範囲の予測確率)。
- C) ウで構築された130のインビトロ予測モデルのうち、ヒトP450を除き、hold-outの精度評価でbalanced accuracy≥0.65のモデルの予測値(0~1の範囲の予測確率)。また、産業技術総合研究所で実施したストレス応答のリアルタイム発光測定(表3の9-1~9-5)の細胞毒性(8h2Iと8h8I)モデルについては、Nrf2、NF-κB、ATF6、p53、HIF1で情報が重複しているため、ATF6のみを使用した。以上の各除外条件に基づき96種のモデルが採用された。
- D) NOEL≤30モデルのみ、同じエンドポイントのNOEL≤300モデルの0~1の予測確率を説明変数と

して追加。これにより、予測性能の向上と、予測結果の矛盾の低減が期待される。

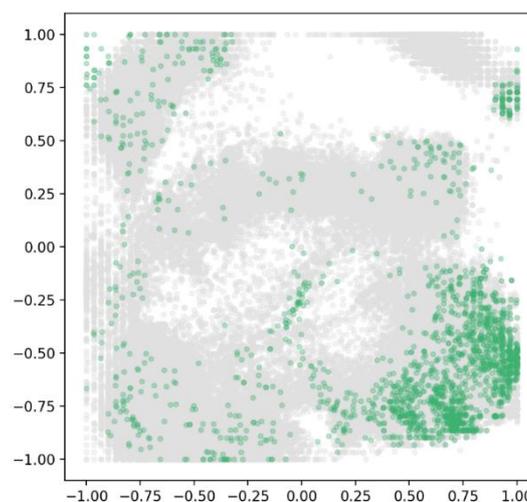
エンドポイント	記述子
分子量	MW_2D, AMW_2D
LogP	SLogP_2D
SMR	SMR_2D
TPSA (トポジカル極表面積)	TPSA_3D
水素結合	nHBAcc_2D, nHBDon_2D
Rotatable bond	nRot_2D, RotRatio_2D
酸性、塩基性	nAcid_2D, nBase_2D
極性	apol_2D, bpol_2D
芳香環	nAromAtom_2D, nAromBond_2D

表 12 毒性予測モデル構築に使用された mordred 記述子

インビボ毒性予測モデル構築用データセットにおける化合物数および各閾値での陽性物質数を

表 13 に示す。これらのデータのケミカルスペースにおける広がりを図 36 に示す。

モデル構築用データセットについては、AI-SHIPS 統合的毒性予測システムデータベース内のインビボ毒性試験結果をもとに、陽性の閾値 (NOEL300, NOEL30) によって 2 値化した。



\*背景の灰色のプロットは、参照として PubChem から抽出した約 10 万件の物質

図 36 インビボモデルの学習データ物質 (緑) のケミカルスペースにおける広がり

表 13 毒性予測モデル構築用データセットの化合物数

エンドポイント	化合物数(※)	NOEL<300 モデル 陽性物質数 (陽性率)	NOEL<30 モデル 陽性物質数 (陽性率)
EP_LV01_NOEL	1917	794 (41.4%)	141 (7.4%)
EP_LV02_NOEL	1922	722 (37.6%)	124 (6.5%)
EP_LV03_NOEL	1921	764 (39.8%)	141 (7.3%)
EP_LV04_NOEL	1922	777 (40.4%)	159 (8.3%)
EP_LV05_NOEL	1911	1028 (53.8%)	315 (16.5%)
EP_LV06_NOEL	1918	862 (44.9%)	242 (12.6%)
EP_BL01_NOEL	1922	674 (35.1%)	117 (6.1%)
EP_BL02_NOEL	1920	778 (40.5%)	184 (9.6%)
EP_KD01_NOEL	1919	941 (49.0%)	221 (11.5%)

(※) スクリーニングを実施しているため、学習データとして採用したデータ数は収集した数より少ない。スクリーニングは、学習データに含まれている原子がインビトロモデルとインビボモデルで矛盾がないようにする、塩化合物は予測モデルに使用する際に脱塩処理をしているが、重金属とのキレート化合物のようなものは、毒性との関連性が疑わしく (重金属側が毒性発現に寄与するケース)、モデル精度に悪影響を及ぼす可能性があるため除外する、といった観点で実施した。

モデルのトレーニング方法の概要を図 37 に示す。データマトリクス中の約 10%の化合物を外部評価用とし、約 72%を学習用、約 18%を hold-out の評価用とした。

予測モデルは複数のアルゴリズム（ランダムフォレスト、勾配ブースティング）や変数選択、パラメータを学習データで訓練し、hold-out の評価用データを基準に最良のモデルを選択し、外部評価データで汎化性能を確認した。

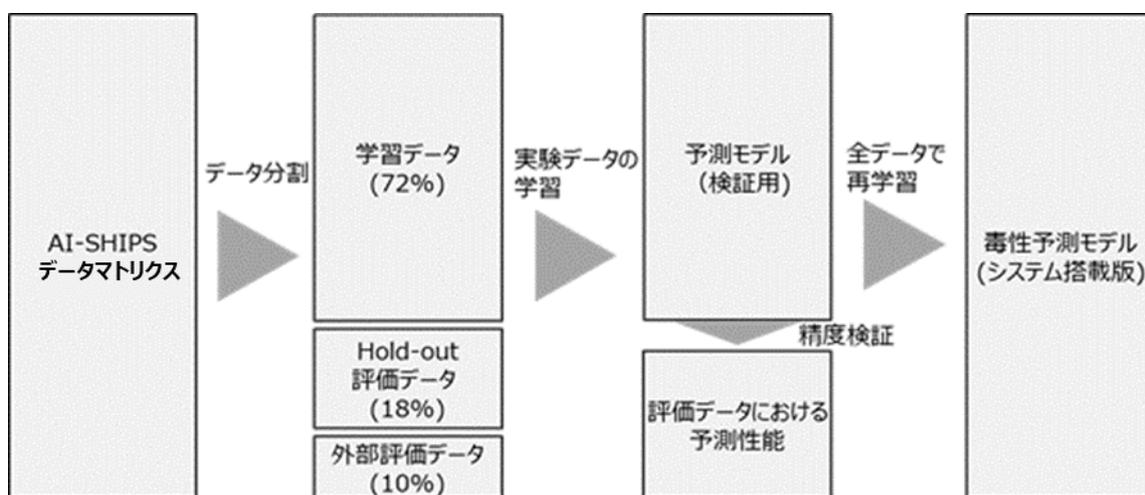


図 37 モデルのトレーニング方法の概要

インビボ毒性予測モデル構築のデータセットにおいては、NOEL $\leq$ 30 モデルにおいては、陽性率（毒性ありの化合物の割合）が低い、不均衡データとなっている（

表 13 参照）。そのため、評価指標には不均衡データに対して頑健な評価指標である balanced accuracy (BA) を主要な指標として用いた。また、2 値分類モデルの一般的な指標として ROC 曲線下面積 (area under the curve: AUC)、感度 (Sensitivity)、特異度 (Specificity) も併せて評価に使用した(図 38)。

インビボ毒性予測モデルの Hold-out 評価結果を表 14、表 15 に示す。NOEL $\leq$ 300 モデルと NOEL $\leq$ 30 モデルは BA 平均でそれぞれ 0.727、0.737 を示した。外部評価では、AD として信頼性スコアを適用することで hold-out 評価と同等の汎化性能を持つことが示唆された（表 16）。

なお、被験物質の QSAR 予測に対する信頼性推定の一般的なアプローチとして、(1)モデル構築に使用した化学構造との類似性に基づく手法、および(2)予測確率に基づく手法が知られている。本事業における詳細な検討の結果、(2)は良好な信頼性推定結果を与えることが判明したため、(2)に相当する信頼性スコアを AD として採用している。表 16 には外部評価を実施した際に基準とした信頼性スコアも示している。各モデルについて、この値以上の信頼性スコアを示した化合物の予測については、外部評価で hold-out と同等の性能を示したことを意味する。また、その際の信頼性スコアの基準を満たした化合物の割合（全化合物中の何%が信頼性スコアの閾値以上であったか）をカバー率とした。

表 14 インビボ毒性予測モデルの hold-out 評価結果 (NOEL≤300 モデル)

エンドポイント	BA	AUC	Sensitivity	Specificity	tp の数	fp の数	fn の数	tn の数
EP_LV01_NOEL	0.738	0.784	0.726	0.749	85	58	32	173
EP_LV02_NOEL	0.716	0.748	0.669	0.762	81	54	40	173
EP_LV03_NOEL	0.755	0.807	0.800	0.710	88	69	22	169
EP_LV04_NOEL	0.720	0.754	0.714	0.725	90	61	36	161
EP_LV05_NOEL	0.727	0.766	0.746	0.708	132	50	45	121
EP_LV06_NOEL	0.730	0.780	0.730	0.730	111	53	41	143
EP_BL01_NOEL	0.729	0.801	0.817	0.640	103	80	23	142
EP_BL02_NOEL	0.734	0.793	0.802	0.667	101	74	25	148
EP_KD01_NOEL	0.698	0.759	0.692	0.704	110	56	49	133
平均値	0.727	0.777	0.744	0.711	-	-	-	-

tp:true positive, fp:false positive, fn:false negative, tn:true negative, 図 38 参照

表 15 インビボ毒性予測モデルの hold-out 評価結果 (NOEL≤30 モデル)

エンドポイント	BA	AUC	Sensitivity	Specificity	tp の数	fp の数	fn の数	tn の数
EP_LV01_NOEL	0.768	0.805	0.708	0.827	17	56	7	268
EP_LV02_NOEL	0.706	0.716	0.667	0.746	14	83	7	244
EP_LV03_NOEL	0.738	0.799	0.833	0.642	20	116	4	208
EP_LV04_NOEL	0.733	0.785	0.556	0.91	15	29	12	292
EP_LV05_NOEL	0.705	0.771	0.786	0.623	44	110	12	182
EP_LV06_NOEL	0.777	0.788	0.854	0.700	35	92	6	215
EP_BL01_NOEL	0.718	0.763	0.947	0.489	18	168	1	161
EP_BL02_NOEL	0.791	0.824	0.742	0.839	23	51	8	266
EP_KD01_NOEL	0.701	0.715	0.595	0.807	22	60	15	251
平均値	0.737	0.774	0.743	0.731	-	-	-	-

tp:true positive, fp:false positive, fn:false negative, tn:true negative, 図 38 参照

表 16 インビボ毒性予測モデルの外部評価結果 (AD 内) と AD 内の定義に使用した信頼性スコアの  
閾値

エンドポイント	NOEL≤300 モデル		NOEL≤30 モデル		NOEL≤300 モデル		NOEL≤30 モデル	
	BA	AUC	BA	AUC	AD の閾値	カバー率	AD の閾値	カバー率
EP_LV01_NOEL	0.721	0.757	0.749	0.759	0.330	63.2%	0.370	47.3%
EP_LV02_NOEL	0.756	0.754	0.912	0.947	0.290	57.7%	0.370	31.9%
EP_LV03_NOEL	0.726	0.744	0.727	0.682	0.370	60.4%	0.049	40.1%
EP_LV04_NOEL	0.761	0.824	0.671	0.713	0.390	57.1%	0.224	71.4%
EP_LV05_NOEL	0.821	0.801	0.718	0.826	0.350	34.6%	0.119	69.2%
EP_LV06_NOEL	0.741	0.770	0.824	0.880	0.390	48.4%	0.247	44.5%
EP_BL01_NOEL	0.735	0.739	0.637	0.670	0.360	40.1%	0.078	50.5%
EP_BL02_NOEL	0.691	0.730	0.706	0.753	0.090	85.2%	0.243	76.9%
EP_KD01_NOEL	0.711	0.789	0.733	0.599	0.400	61.0%	0.396	35.7%
平均値	0.740	0.768	0.742	0.759	-	-	-	-

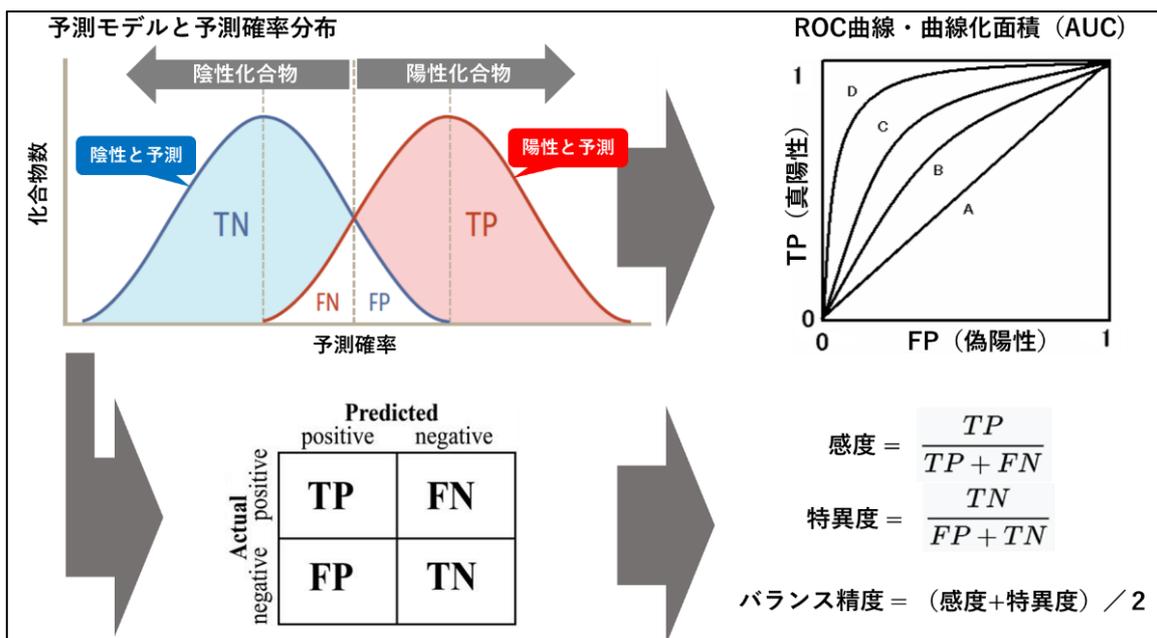


図 38 予測性能の評価指標

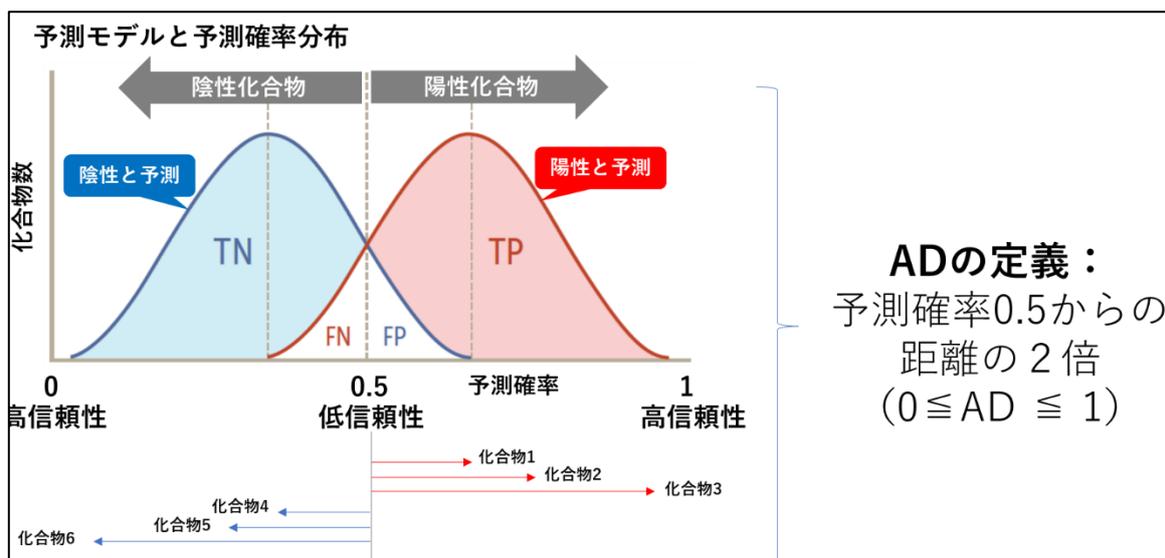


図 39 特徴領域 (AD) に基づく予測信頼性

また、NOEL $\leq$ 300 モデルの変数重要度の一例を表 17 および表 18 に示す。各モデルの変数重要度はランダムフォレストや勾配ブースティングモデル中の各決定木に含まれる変数の割合で、最大の重要度の変数を 100 とした時の相対値で表示した。NOEL $\leq$ 30 モデルではいずれのモデルでも prob300 (同一エンドポイントの NOEL $\leq$ 300 モデルの予測値) が最も重要な変数となった。

表 17 変数重要度 (NOEL≤300、EP\_LV01, EP\_LV02)

#	変数 (EP_LV01)	重要度	変数 (EP_LV02)	重要度
1	TPSA_3D	100.0	TPSA_3D	100.0
2	TSHR2_ago_40	87.3	MW_2D	89.9
3	nHBacc_2D	82.6	CellTiter_NRK-52E_NOECw_Est	87.5
4	bpol_2D	78.0	nBase_2D	84.6
5	CellTiter_RatHep_NOEC_Est	74.6	bpol_2D	79.0
6	nBase_2D	68.4	HCA_HepG2_TG_RingTotalInten_NOECw_Est	74.3
7	ERfull_estra_ant_1	67.6	AR1bd_ago_1	73.7
8	ERb2_ant_1	64.4	TGFb_ago_1	72.2
9	H2AX_ago_40	57.7	HIF1w-noec8h2B2C_Est	68.3
10	HCA_RatHep_Factin_RingSpotCount_NOEC_Est	57.7	FXR_ago_40	68.3
11	MW_2D	57.4	p53w-noec8h4B2C_Est	67.4
12	NR_rPPARalpha_MAX_Est	57.1	GR_ago_40	67.1
13	UGT_rat_MAX_Est	56.3	apol_2D	66.0
14	nHBDon_2D	55.9	mRNA_CYP2B1_CYP3A1_Est	65.4
15	HCA_RatHep_Mit_CircSpotAvgArea_NOEC_Est	55.6	HCA_HepG2_Factin_RingAvgInten_NOEC_Est	64.5
16	ERR_ago_1	55.1	ERb_ago_1	59.5
17	mRNA_CYP3A1_Est	54.9	nRot_2D	59.4
18	FXR_ago_40	54.8	ATAD5_ago_40	59.4
19	apol_2D	54.0	HCA_RatHep_Factin_CircSpotAvgArea_NOEC_Est	59.4
20	PXR_ago_1	54.0	SMR_2D	59.3

表 18 変数重要度 ((NOEL≤30、EP\_LV01, EP\_LV02)

#	変数 (EP_LV01)	重要度	変数 (EP_LV02)	重要度
1	prob_300	100.00	prob_300	100.00
2	GR_ago_40	28.74	CellTiter_NRK-52E_NOECw_Est	12.67
3	NR_rPPARalpha_MAX_Est	27.98	NR_rPPARalpha_MAX_Est	11.94
4	ADRA_NAC+NAL_x_Est	26.70	P450_r2D1_MAX_Est	11.86
5	TPSA_3D	25.79	ERsr_ago_1	11.42
6	CAR_ant_40	25.24	CAR_ant_40	11.28
7	ERaant_ago_1	23.69	p53w-noec8h4B2C_Est	10.99
8	RAW_WST_NOECiW2C_Est	23.14	MW_2D	10.85
9	TSHR_ant_1	22.91	NR_rFXR_MAX_Est	10.79
10	AhR_ago_40	21.38	LDH_NRK-52E_NOECw_Est	10.74
11	AR1bd_ant_1	20.54	TGFb_ago_1	10.45
12	NR_rAHR_MAX_Est	19.96	mRNA_CYP2B1_CYP3A1_CYP4A1_Est	10.38
13	NR_rFXR_MAX_Est	19.17	p53w-noec8h7A2C_Est	10.21
14	CAR_ago_40	18.74	ARant_ago_1	10.21
15	PR_ago_1	18.48	bpol_2D	10.04
16	API_ago_1	18.33	HIF1_ago_40	9.88
17	NR_rLXRalpha_MAX_Est	18.23	ADRA_NAC+NAL_x_Est	9.81
18	TRHR_ago_1	17.99	H2AX_ago_1	9.79
19	AMW_2D	17.61	HIF1_ago_1	9.77
20	p53w-noec8h4B2C_Est	17.50	NR_rLXRalpha_MAX_Est	9.75

オ : DeepSnap

分子の 3D 画像データを入力情報として学習し、毒性判別を行う「DeepSnap」を AI-SHIPS 統合的毒性予測システムに実装した。本システムでは、SMILES で作成した推定対象物質の構造を入力情報とし、SDF 形式 (SMILES、SDF は、いずれも化合物の構造表記法の 1 つ) への変換を行った後、画像生成から学習モデル作成までを一つの処理単位とし、複数の Deep Learning 学習によるモデル生成を連続して自動実行する。また本システムは画像特徴領域可視化機能を備えている (図 40)。

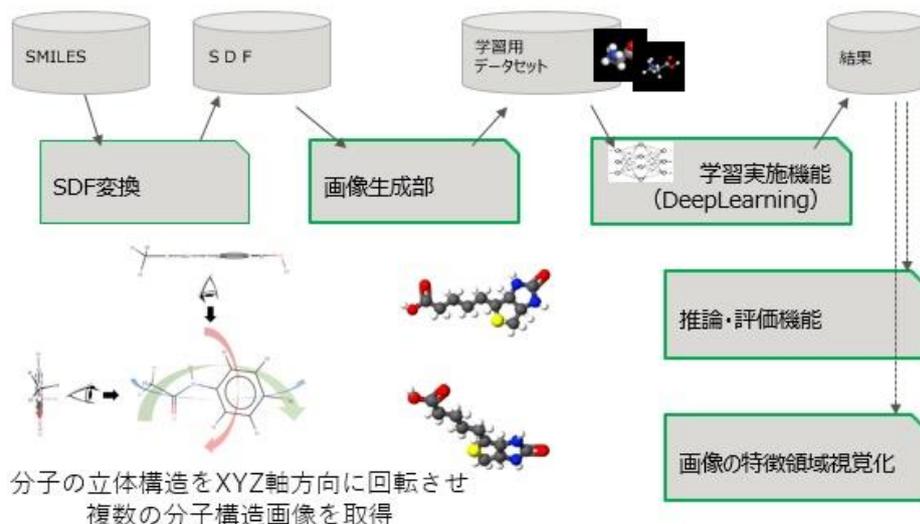


図 40 DeepSnap による学習過程および画像特徴領域可視化の流れ

本システムを用いて、Tox21 の 59 の MIE (イを参照) についての毒性予測モデルを構築した。予測結果の信頼性として、外部検証時の平均 ROC 曲線下面積は約 0.8 と良好であった。さらに、画像生成時のパラメータ調整により大幅な予測精度向上の可能性を示した。

また、本システムを用いて、研究開発項目①(b)で実験値を取得した初代培養ラット肝細胞を用いた 7 種類の CYP 分子種の阻害活性 (表 3 のラット P450 (7 分子)) に対する高精度予測モデルを構築するとともに、特徴領域強調表示アルゴリズム CAM を用いてこれらの予測モデルに基づく活性に寄与する分子領域の着色を達成した。さらに、後述する AI-SHIPS 統合的毒性予測システムから本システムを利用するためのインターフェース (WebAPI) を開発し、実装した。

表 19 最終決定 DeepSnap CYP モデルの精度

Cyp モデル	テストセットの BA	テストセットの AUC	備考
r1A1	0.8882	0.9217	57 化合物でテスト
r1A2	0.7428	0.7029	57 化合物でテスト
r2B1	0.7159	0.7206	57 化合物でテスト
r2C6	0.6935	0.7262	57 化合物でテスト
r2D1	0.8081	0.8627	57 化合物でテスト
r2E1	0.6667	0.5972	57 化合物でテスト
r3A2	0.7890	0.7906	57 化合物でテスト

カ：AI-SHIPS 統合的毒性予測システムの構築

アのデータベース、イ～オの予測モデル、研究開発項目①(a)で開発した体内予測モデルを統合し、様々なインターフェース機能を持つAI-SHIPS 統合的毒性予測システムを構築した。

【システム概要】

本事業では、単に化学構造を入力してその毒性や体内動態を予測するシステム（アプリケーション）を開発するのではなく、その基盤となるデータを閲覧かつ利用可能なシステムにすることを目的として開発を進めた。すなわち、実際の予測・検索を行う「ユーザーシステム」と予測モデルやデータの管理を行う「モデル・データ管理システム」の2つのシステムの開発を行った。両者は相互にデータ連携ができる。

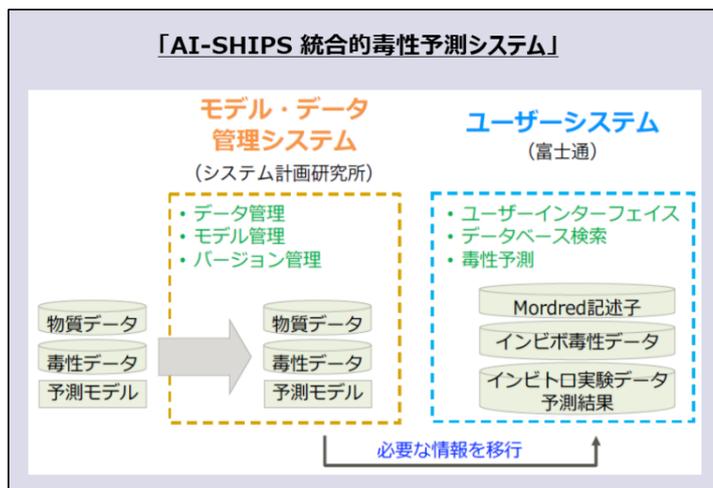


図 41 AI-SHIPS 統合的毒性予測システムの概要

ユーザーシステムは、毒性予測、体内動態予測及び類似物質検索を主要な機能とする。主要な機能を表 20 に、主要画面の構成を表 21 に示す。インビボ毒性や体内動態の予測結果だけでなく、類似物質検索結果やインビトロ試験結果の予測結果を合わせて表示すること、並びに毒性発現に関する機序情報を表示することで、予測結果の妥当性を考慮し、機序の推定が可能になっている。この点は過去の毒性予測システムとは異なる本事業の独自性・特異性である。

表 20 ユーザーシステムの主要機能

項目	機能	概要
①	ラット反復投与毒性の予測	化学構造情報からラット 28 日間反復投与毒性（肝、腎、血液毒性）の NOEL 値を予測
②	ラット体内動態の予測	化学構造情報と投与量からラットにおける体内動態（単回投与及び 28 日間反復投与）を予測
③	類似物質検索	検索物質と化学的・生物学的に類似した物質をデータベースから検索して毒性試験結果を表示
④	データベース検索	化学構造（部分一致検索）等の検索キーによる AI-SHIPS 統合的毒性予測システムのデータベースとユーザー登録データベースの検索

表 21 ユーザーシステムの主要画面

項目	機能	概要
①	トップ	お知らせ表示、直近の予測・検索結果表示
②	毒性予測・類似物質検索	機能①～③の実施（図 44）
③	予測・検索結果	予測・検索結果の一覧を表示。結果を参照したい物質を選択して、詳細な表示（⑥）や複数結果の一覧比較（⑦）が可能
④	データベース検索	機能④の実施
⑤	ケミカルスペース	ユーザーが入力した予測・検索対象物質と本システムに搭載した全物質のケミカルスペースを比較表示

項目	機能	概要
⑥	予測結果詳細	③で選択した予測・検索対象物質について、毒性予測結果、体内動態予測結果、類似物質検索結果を表示
⑦	予測結果比較	③で選択した予測・検索対象物質について、毒性予測結果と体内動態予測結果を一覧表示
⑧	インビトロ実験予測値表示	インビボ毒性予測の説明変数として利用したインビトロ試験結果予測モデルの予測結果を表示
⑨	毒性メカニズム	画面⑥のインビトロ試験を毒性発現機序に基づきグルーピングして予測結果を表示し、機序の推定をサポート
⑩	体内動態可視化	体内動態可視化：反復投与に伴う濃度推移をアニメーションで可視化
⑪	実験データベース検索	AI-SHIPS 統合的毒性予測システムのデータベースとユーザー登録データベースの化学構造（部分一致検索）等による検索

モデル・データ管理システムは、データマトリクス、インビボ・インビトロ予測モデル、予測 API についての閲覧機能を有する。また、これらデータの新規登録や過去のデータの履歴管理機能も有している。本システムから出力されるデータマトリクスファイルをユーザーシステムにインポートすることにより、データの一元化を実現している。

図 42 にモデル・データ管理システムの機能の一覧を、図 43 にモデル・データ管理システムのデータ閲覧画面の例を示す。

また、本システムでインビボ毒性予測モデル、インビトロ毒性予測モデルについて、OECD の QSAR バリデーション原則に対応する情報を公開することで、構築したモデルの透明性の担保を確保した。



メイン画面のメニュー	内容（機能）
①ログインユーザ名表示	—
②英語/日本語切り替え	—
③システムメニュー	タスクステータス/カラム一覧/ユーザプロフィール/ログアウト
④データマトリクス閲覧機能	インビボ試験データ、インビトロ実験データ、分子記述子、予測値の閲覧
⑤データマトリクス履歴検索機能	登録データの登録履歴の検索、検索結果の表示、エクスポート
⑥モデル一覧機能	モデル情報やモデルの変数重要度の閲覧
⑦予測 API 一覧機能	予測 API の情報の閲覧
⑧データ登録機能	物質データ、インビボ試験、モデル、API 登録、登録データのチェック
⑨データ管理機能	カラム登録、ARN 番号登録、ACN 番号登録、ARN-ACN 紐付け登録、カテゴリ登録、モデルカテゴリ登録、バージョン発番
⑩システム管理機能	ユーザー管理

図 42 モデル・データ管理システムの画面と主な機能

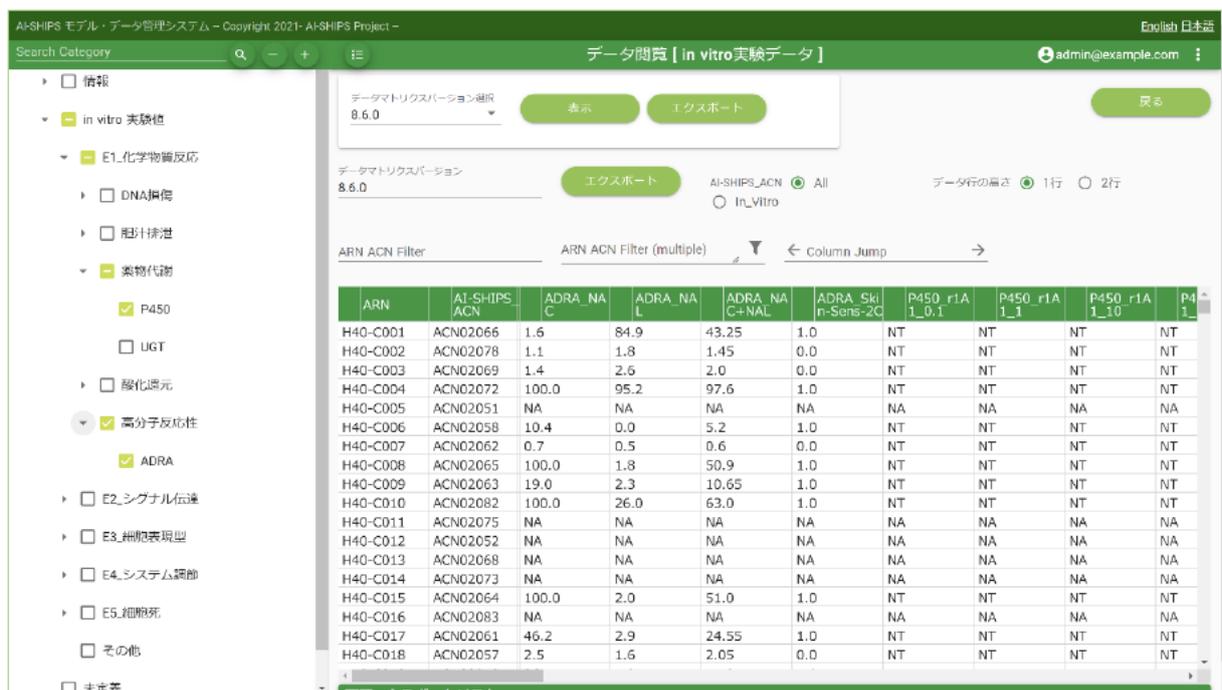


図 43 モデル・データ管理システムのデータ閲覧画面の例

表 22 モデル・データ管理システムに搭載されているデータ

種類	収載データ	内容
データマトリクス	インビボ試験データ	HESS データベースに準拠した毒性所見を事業にて9種類に集約したエンドポイントデータおよび個々の毒性所見から成る。
	インビトロ実験データ	事業で実験を実施したインビトロ実験の実験データの一部と予測モデル開発の説明変数としてデータ処理を行ったデータで構成される。
	インシリコ計算値	mordred 記述子、ECFP、Tox21-MIE 活性スコア予測値、インビトロ実験データ予測値、インビボ試験データ予測値を含む
モデル情報		事業で開発された、インビボ予測モデルとインビトロ予測モデルについて、OECD の QSAR バリデーション原則に対応する情報を搭載
予測 API		AI-SHIPS 統合的毒性予測システムのユーザーシステムで毒性予測機能にて使用される予測 API に関する情報

以降では、ユーザーが毒性を予測する目的で主に使うことになるユーザーシステムについて説明する。

図 44 に、本システムの中心的な画面である「毒性予測・類似物質検索」画面を示した。ユーザーは、目的とする化学物質の構造情報を入力して実行ボタンをクリックすることで、「ラット反復投与毒性の予測」、「ラット体内動態の予測」及び「類似物質検索」の結果を同時に取得することができる仕組みとなっている。なお、毒性予測、体内動態予測及び類似物質検索をそれぞれ単独で実行することも可能である。得られた予測・検索結果の詳細は別ウィンドウとして「予測結果詳細画面」にて示される。

The screenshot shows the 'AI-SHIPS 毒性予測統合システム ユーザーシステム' interface. The main heading is '毒性予測・類似物質検索'. There are two '予測・検索' buttons and a 'Reset' button. The interface is divided into several sections:

- 構造データ**: Includes a 'CS Check' button, a 'Molecule Editor' window, and input fields for 'Mol or SD or SMILES (txt) File' (with a 'ファイルを選択' button), 'SMILES', '化合物ID', '分子量', and 'コメント'.
- 毒性モデル**: A section for selecting toxicity models, including checkboxes for '肝毒性', '腎毒性', '血液毒性', '細菌', '黄血', '細胞傷害・炎症', '肝臓障害下', '肝臓障害', '腸管障害', '肥大', '糖質代謝異常', and '二硫炭素二'.
- 体内動態予測**: A section for predicting pharmacokinetics, with input fields for '投与量 (mg/kg)' (0-10000), 'LogP' (-10-100), 'fu,p' (0-1), 'LogD pH6.0' (-10-100), 'LogD pH7.5' (-10-100), 'pKa acid' (-1-100), and 'pKa base' (-1-100).
- 類似物質検索**: A section for similar substance search, with radio buttons for '類似物質検索', 'OR検索', and 'AND検索'. It includes checkboxes for '物理化学 (近似的子-Mordred)', 'Fingerprint', 'Topological', 'Morgan', and '薬理プロファイル類似検索', each with a 'タニモト係数' (Tanimoto coefficient) input field. There are also checkboxes for 'ADME類似検索' and '分子量類似検索'.

図 44 ユーザーシステムの「毒性予測・類似物質検索」画面

## 【ラット反復投与毒性予測機能】

ユーザーは「毒性予測・類似物質検索」画面（図 44）で、検索したい化学物質の情報を、①化学構造（構造式エディタ使用）、②SMILES（単一の SMILES を直接入力、又は複数の SMILES と物質名を tsv ファイルとしてアップロード）、③sdf ファイル（単一又は複数物質）、④mol ファイル（単一物質）として入力する。その後、予測・検索の実施内容をチェックボックスにて指定して「予測・検索」ボタンをクリックすると予測・検索が実施される。この際、ユーザーは事前に被験物質のケミカルスペースといくつかの物性値を確認することも可能である（図 48）。

予測はバックグラウンドで実行され、その進行状況は、「予測・検索結果」画面（図 45）で確認できる。ユーザーはこの画面から検索結果を選択し、予測結果を閲覧する。毒性予測の結果は、体内動態予測や類似物質検索と同一画面で表示される。また、毒性予測の条件（選択した EP）とその予測結果はシステム内に保持され、複数の検索結果を並べた比較表示も可能である。

毒性予測の条件としては、9つのグループ EP を予測対象として設定し、これらについてそれぞれ NOEL 値が 300 mg/kg 体重/日以下であるか否か（NOEL≤300 モデル）、並びに 30 mg/kg 体重/日以下であるか否か（NOEL≤30 モデル）を予測する 2つのモデルが構築されている。すなわち、合計 18 のインビボ毒性予測モデルがユーザーシステムに搭載されている。

ユーザーが予測を実行すると、選んだグループ EP について NOEL 値の閾値が異なる 2つのモデルによる予測が同時に実行され、予測結果が並列で表示される。予測結果は「陽性」又は「陰性」の 2値で表示され、ユーザーは 2つの予測モデルの結果の組合せにより、おおよその NOEL を見積もることができる。例えば、NOEL≤300 モデルと NOEL≤30 モデルがともに陽性であれば被験物質の当該 EP における NOEL は 30 mg/kg 体重/日以下、両モデルがともに陰性であれば NOEL は 300 mg/kg 体重/日以上、NOEL≤300 モデルが陽性で NOEL≤30 モデルが陰性であれば NOEL は 30~300 mg/kg 体重/日の間と推測される。また、それぞれのモデルの予測結果は、その信頼性スコアとともに表示される。信頼性スコアは 0~1 の値で表され、大きいほど信頼性が高い。この値も予測結果を参考にする際に有用な情報となる。「予測結果詳細」画面の画面上部に表示される予測・検索条件と検索対象物質及び類似物質の表示を図 46 に、毒性予測結果の例の一部を図 47 に示した。

選択	解析ID	ジョブID	類似物質検索	解析日	Version	物質ID	実行状況	コメント	予測	肝毒性					
										細胞傷害・炎症	肝機能低下	肝機能亢進	胆管障害	肥大	
<input type="checkbox"/>	解析A	6618	○ ○	2022-02-21 15:46:55	8.7.0	物質001	予測・検索結果		○	○	○	○	○	○	
<input type="checkbox"/>	demo	6617	○	2022-02-19 16:53:49	8.7.0	compoundA	予測・検索結果		○	○	○	○	○	○	
<input type="checkbox"/>	解析A	4623	○ ○	2022-02-15 07:30:23	8.7.0	物質001	予測・検索結果		○	○	○	○	○	○	
<input type="checkbox"/>	解析A	4622	○ ○	2022-02-15 05:28:58	8.7.0	物質001	予測・検索結果		○	○	○	○	○	○	
<input type="checkbox"/>	demo	4621	○ ○	2022-02-14 23:17:44	8.7.0	2,4-Dimethylaniline	予測・検索結果		○	○	○	○	○	○	
<input type="checkbox"/>	demo	4620	○ ○	2022-02-14 23:07:23	8.7.0	N,2-Dimethylaniline	予測・検索結果		○	○	○	○	○	○	
<input type="checkbox"/>	Aniline	4619	○ ○	2022-02-14 22:58:52	8.7.0	Aniline	予測・検索結果		○	○	○	○	○	○	
<input type="checkbox"/>	H40-E258	4595	○	2022-02-14 05:46:28	8.7.0	Aniline 4-(1-methylethyl)	予測・検索結果		○	○	○	○	○	○	

図 45 「予測・検索結果」画面

AI-SHIPS 統合的毒性予測システム ユーザーシステム demo ログアウト Language/日本語

### 予測結果詳細

#### 予測・検索条件

検索日時	予測	肝毒性					腎毒性		血液毒性		体内動態				
		細胞傷害・炎症	肝機能低下	肝機能亢進	胆管障害	肥大	脂質代謝異常	腎障害	凝固障害	貧血	投与量	LogP	fu,p	LogD (pH 6.0)	LogD (pH 7.5)
2022-02-21 15:47:02	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	100				

#### 一覧

2162件 tsv出力 1 2 3 216 217

全選択 非表示 全表示 フィルタ  陰性  陽性 信頼値 0.0001 再表示

分類	入力物質	<input type="checkbox"/> H40-E139	<input type="checkbox"/> H40-E378	<input type="checkbox"/> H40-E391	<input type="checkbox"/> H40-E258	<input type="checkbox"/> H40-Y159	<input type="checkbox"/> H40-Y151
化学構造							
物質ID/ARN	物質ID/ARN	物質001	H40-E139	H40-E378	H40-E391	H40-E258	H40-Y159
全身毒性	NOEL	N/A	2.9780000000000004	0.99	2.485	5.9562	222.3

図 46 「予測結果詳細」画面の予測・検索条件と検索対象物質及び類似物質の表示

全選択 非表示 全表示 フィルタ  陰性  陽性 信頼値 0 再表示

分類	入力物質
化学構造	
物質ID/ARN	物質ID/ARN 20220131142227255
全身毒性	NOEL N/A
試験条件	最大用量 N/A
データベース	N/A
	試験値 NOEL(mg/kg/day) N/A
肝機能低下	NOEL≤30モデル 予測結果 <span>陰性</span> <span>Mechanism</span>
	信頼性スコア 0.0627
	NOEL≤300モデル 予測結果 <span>陽性</span> <span>Mechanism</span>
	信頼性スコア 0.1201
試験値 NOEL(mg/kg/day) N/A	
肝機能亢進	NOEL≤30モデル 予測結果 <span>陽性</span> <span>Mechanism</span>
	信頼性スコア 0.0117
	NOEL≤300モデル 予測結果 <span>陰性</span> <span>Mechanism</span>
	信頼性スコア 0.2694
試験値 NOEL(mg/kg/day) N/A	
胆管障害	NOEL≤30モデル 予測結果 <span>陽性</span> <span>Mechanism</span>

図 47 毒性予測結果の例

## 【ケミカルスペース確認画面】

ケミカルスペース確認画面の例を図 48 に示した。

画面の上部には、入力した物質について、その化学構造とともに、インビボ毒性 EP 予測に使用した mordred 記述子の値が表示される。Max 及び Min はそれぞれデータベース内に含まれる物質の mordred 記述子の最大値及び最小値を示す。

画面の下部には、Generative topographic mapping (GTM) のマップと入力物質の座標が表示される。GTM は、多次元空間の物質を、確率モデルを用いて二次元座標に投影する次元圧縮手法の 1 つである。4 種のマップのうち、左の 2 つが毒性予測用、右の 2 つが体内動態予測用のマップである。灰色のプロットは、参照として PubChem から抽出した約 10 万件の物質情報を示す。毒性予測用バックグラウンドマップでは、Tox21-MIE 活性スコア予測モデル構築に利用した 12974 物質が青色で、インビボ毒性試験データがある 1979 物質が緑色で、本事業でインビトロ試験を実施した 326 物質がオレンジ色で示される。体内動態予測マップではオレンジ色で学習に使用した物質が表示される。

予測対象物質は、グレーの背景マップ上にカラーで示され、その座標は下の表に示される。これらがバックグラウンド CS の緑色物質の分布に近ければ、インビボ毒性予測モデルの学習データセットと化学構造が近いものと判断できる。座標の値は [tsv 出力] でエクスポート可能である。

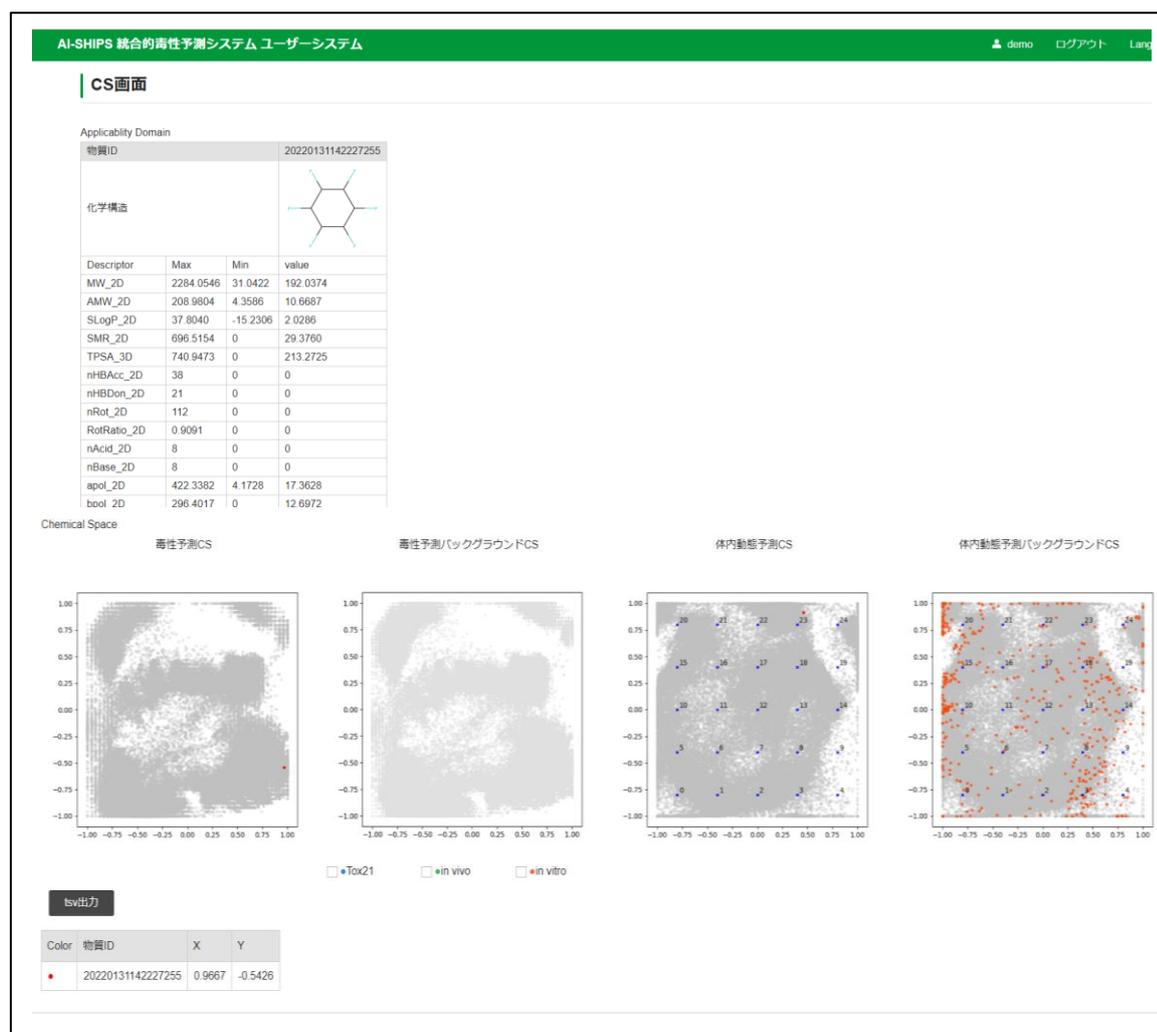


図 48 ケミカルスペース確認画面

### 【毒性機序関連情報の表示】

毒性発現機序参考情報として、インビボ毒性予測モデルの構築に利用したインビトロ試験結果予測モデルの予測値（陽性又は陰性）を提供する。これらのインビトロ試験モデルについては、対象とする EP 予測モデルにおける重要度の値も合わせて表示し、重要度によるソートも可能である。さらに、ユーザーの毒性発現機序の考察をサポートするために、インビトロ試験を 5 つの大グループといくつかのサブグループ（表 23）に分けて円グラフ様に表示する毒性メカニズム画面も設けた（図 49）。これらの付随情報により、ユーザーは単に毒性 EP の発現の有無だけでなく、被験物質が引き起こし得る様々な細胞内イベントを、分子、細胞小器官、細胞、組織・器官レベルで推測することができる。

「予測結果詳細」画面において、[モデル名]をクリックすると「インビトロ実験予測値」画面に移動する。画面の例の一部を図 50 に示した。この画面では、モデルの構築に使用された説明変数であるインビトロ実験予測モデルの予測値と *mordred* 記述子の重要度が表示される。前者については信頼性スコアも併せて表示される。陽性は赤で、陰性は青で表示され、信頼性スコアに基づいて濃淡がつけられている（信頼性が高いほど濃い色となる）。また、重要度によりソートすることもできる。また、各モデル名をクリックすると、モデルの情報がポップアップで表示される。この画面において、[tsv 出力]をクリックすると、tsv ファイル形式で結果を出力できる。

表 23 AI-SHIPS 統合的毒性予測システムで利用したインビトロ試験の種類とそのカテゴリ

大カテゴリ	小カテゴリ	含まれる項目
化学物質反応	薬物代謝	シトクロム P450 阻害、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ阻害
	酸化還元	細胞内 GSH レベル、Nrf2 転写活性
	高分子反応性	ADRA
	胆汁排泄	BSEP 阻害、MRP2 阻害
	DNA 損傷	p53 転写活性、ATAD5 レベル、H2AX リン酸化
シグナル伝達	細胞シグナル	TGF $\beta$ /SMAD 転写活性、SHH/GLI1 転写活性、細胞内 cAMP レベル
	炎症シグナル	NF- $\kappa$ B/AP-1 転写活性
	異物受容体	AHR 転写活性、PXR 転写活性、CAR 転写活性
	酵素誘導	CYP2B1 誘導、CYP3A1 誘導
	転写調節	RXR $\alpha$ 転写活性、HDAC 活性
細胞表現型	細胞小器官	ミトコンドリア、細胞骨格（F-アクチン）、小胞体ストレス
	脂質代謝	PPAR $\alpha$ 転写活性、PPAR $\delta$ 転写活性、LXR $\alpha$ 転写活性、FXR 転写活性
	脂質蓄積	中性脂肪蓄積、リン脂質蓄積
	エネルギー代謝	PPAR $\gamma$ 転写活性
	ストレス応答	HSF 転写活性、HIF 転写活性
システム調節	内分泌	グルココルチコイド受容体転写活性、アンドロゲン受容体転写活性、プロゲステロン受容体転写活性、エストロゲン受容体 $\alpha$ 転写活性、エストロゲン受容体 $\beta$ 転写活性、ERR 転写活性、甲状腺ホルモン受容体転写活性、アロマターゼ活性、甲状腺刺激ホルモン受容体作用、サイトロピン放出ホルモン受容体作用
	免疫	ROR $\gamma$ 転写活性
	ビタミン	RAR 転写活性、VDR 転写活性
細胞死	細胞内 ATP	CellTiter アッセイ
	細胞内 NADH	WST アッセイ
	逸脱酵素	LDH 漏出
	核	ハイコンテンツ解析
	アポトーシス	Caspase3/7
	転写抑制	レポーターアッセイ

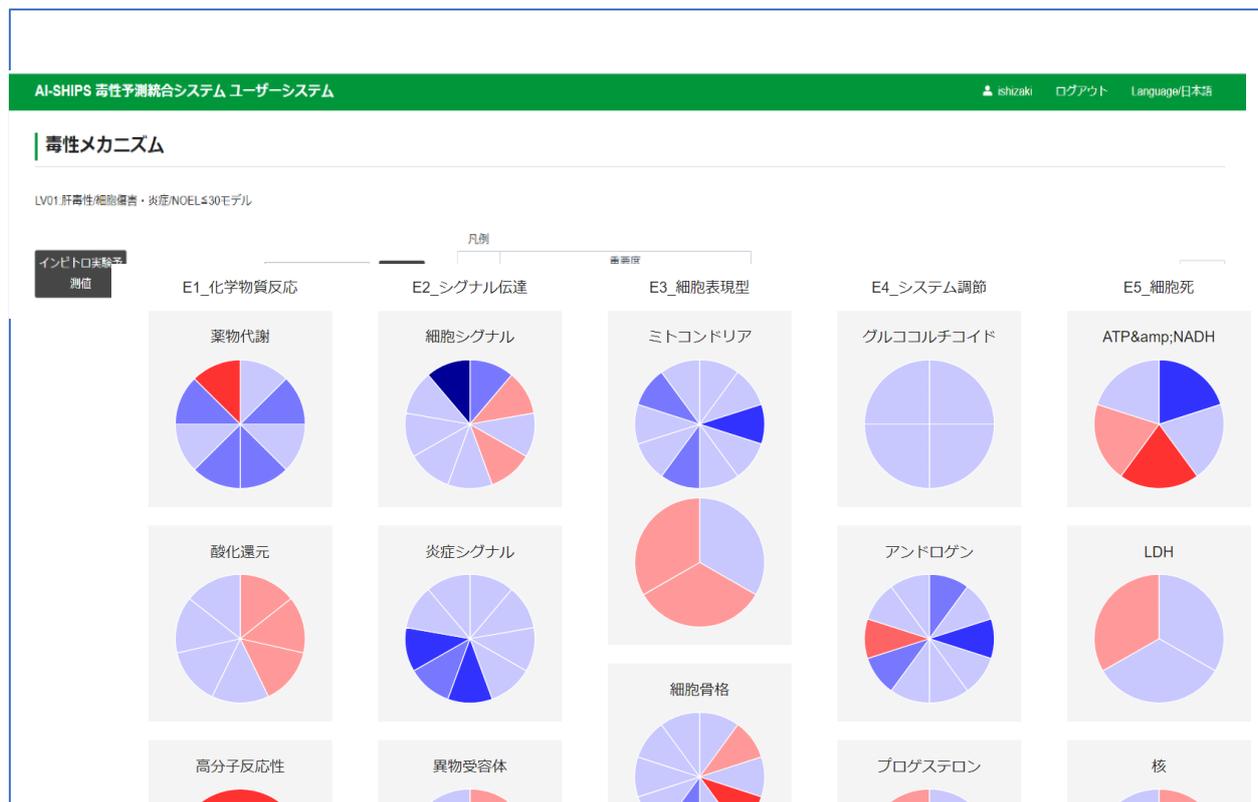


図 49 「毒性メカニズム」画面の表示例

AI-SHIPS 統合的毒性予測システム ユーザーシステム

### インビトロ実験予測値

tsv出力

カテゴリ△	モデル名	重要度▼	予測結果	20220131142227255	
化学構造					
肝毒性/細胞傷害・炎症	NOEL≤30モデル		予測結果・信頼性スコア	陰性	0.5992
薬物代謝_P450	rCYP1A1-A1	0.0000	予測結果・信頼性スコア	陰性	0.7572
薬物代謝_P450	rCYP1A2-A1	39.6068	予測結果・信頼性スコア	陰性	0.3742
薬物代謝_P450	rCYP2B1-A1	0.0000	予測結果・信頼性スコア	陰性	0.4458
薬物代謝_P450	rCYP2C6-A1	46.3618	予測結果・信頼性スコア	陰性	0.9745
薬物代謝_P450	rCYP2D1-A1	41.2516	予測結果・信頼性スコア	陰性	0.7740
薬物代謝_P450	rCYP2E1-A1	0.0000	予測結果・信頼性スコア	陰性	0.6021
薬物代謝_P450	rCYP3A2-A1	36.7373	予測結果・信頼性スコア	陰性	0.6332
薬物代謝_UGT	rUGT-A1	56.2589	予測結果・信頼性スコア	陽性	0.2001
酸化還元_GSH含量	rGSH-A1	0.0000	予測結果・信頼性スコア	陽性	0.4760

図 50 「インビトロ実験予測値」画面の表示例

## 【体内動態予測】

体内動態の予測結果は、「予測結果詳細」画面の一覧表の最下部に表示される。予測内容は膜透過に関するもの及び体内動態に関するものに大別され、前者には消化管から血液側への膜透過係数 (nm/s) 及び血液側から消化管への膜透過係数 (nm/s) が含まれる。後者には、吸収の指標として FaFg (消化管利用率) 及びインビボ吸収速度定数 (1/h; ラットに物質を経口投与した際の吸収速度定数) が、分布の指標としてインビボ分布容積 (L)、肝代謝消失の指標として、インビボ肝固有クリアランス (L/h; ラット肝での物質の代謝変換効率) が含まれる。さらに、入力した投与量に基づいて予測される単回投与後又は 28 日間反復投与後の血液 (血漿)、肝臓及び腎臓の Cmax 及び AUC が示される。予測結果の例を図 51 に示した。

体内動態	吸収	FaFg	割合	0.8832
		インビボ吸収速度定数	予測値(1/h)	0.0019
	分布	インビボ分布容積	予測値(L)	0.0474
	肝代謝消失	インビボ肝固有クリアランス	予測値(L/h)	2.0574
	腎排泄	インビボ腎クリアランス	予測値(L/h)	0.0313
	血液(血漿)	単回投与 AUC	予測値(µg/L/h)	19174.3023
		単回投与 Cmax	予測値(µg/L)	819.5916
		28日間反復投与 AUC	予測値(µg/L/h)	5790152.8512
		28日間反復投与 Cmax	予測値(µg/L)	13330.7046

図 51 「予測結果詳細」画面の体内動態予測結果の表示例

この画面左の「体内動態」をクリックすると、体内動態可視化画面 (図 52) へ遷移する。この画面の左には、小腸における吸収量、血中濃度、肝臓中濃度、腎臓中濃度の変化を色の濃淡により表示する。「濃度表示」をチェックすることで具体的な数値も確認可能である。このとき、「単回投与」と「28 日間反復投与」を選択することが可能である。また、画面の左では上記の項目の時間推移がグラフとして表示される。



図 52 体内動態予測結果のアニメーション表示

## 【類似物質検索】

本事業で収集した毒性試験データ（AI-SHIPS 統合的毒性予測システムのデータ）を搭載するとともに、ユーザー独自のインビボ毒性試験データを、AI-SHIPS 統合的毒性予測システムのデータベースとは別のデータベース（本システムでは「ユーザーデータ」と呼ぶ）としてシステムに搭載することができ、予測対象物質の類似物質をこれらのデータベースを対象として検索することができる。検索された類似物質については、その化学構造と毒性試験情報（各 EP の NOEL、最大投与量、試験全体の NOEL など）を、毒性予測結果及び体内動態予測結果に表示される。ユーザーは毒性予測結果（NOEL の分布予測値）と類似物質の毒性試験結果（NOEL 実測値）を比較でき、予測の妥当性を検討する上で有用である。これらの検索結果は tsv ファイルとして出力できる。

類似物質検索には、表 24 に示す様々な指標を選択できる。ユーザーは、「毒性予測・類似物質検索」画面において、検索方法を選択するとともに、必要に応じて閾値を設定する。本システムにおける類似物質検索の特徴は、ケモインフォマティクス分野において汎用されている、mordred 記述子や topological 及び Morgan フィンガープリントを利用した化学的な類似性だけでなく、本事業で作成したインビトロ試験結果予測モデル及び体内動態予測モデルの予測結果を利用した類似性評価も実施可能であることである。また、複数の指標を選択した場合には、「AND」又は「OR」を選択することで、得られる検索結果を絞りこむことができる。

類似物質検索結果の例を図 53 に示した。

表 24 類似物質検索に利用可能な指標

項目	内容
分子記述子	mordred 記述子（304 種）によるユークリッド距離の近さで評価
Fingerprint/Topological	RDKit の topological フィンガープリントを利用し、タニモト係数で評価
Fingerprint/Morgan	RDKit の Morgan フィンガープリントを利用し、タニモト係数で評価
インビトロ実験プロファイル	インビトロ試験結果予測値（陽性・陰性の 2 値）を利用し、タニモト係数で評価
PK プロファイル	体内動態指標（吸収速度定数、分布容積、肝代謝消失）予測値によるユークリッド距離の近さで評価
分子量類似検索	検索物質の分子量から入力値を増減した値の範囲に入る物質を検索

The screenshot displays the 'AI-SHIPS 統合的毒性予測システム ユーザーシステム' interface. The main section is titled '予測結果詳細' (Prediction Results Detail). Below this, there are search conditions and a table of results. A red box highlights a specific result for 'H40-E139', showing its chemical structure and a detailed comparison table with another compound, 'H40-E378'. The comparison table includes various descriptors and their scores.

分類	入力物質	H40-E139	H40-E378
化学構造			
物質ID/ARN	物質ID/ARN	物質001	H40-E139
全身毒性	NOEL	N/A	2.9780000000000004
試験条件	最大用量	49.6	
データベース名	データベース名	N/A	HESS
構造類似性	Descriptor	mordred	類似性スコア
	Fingerprint	Topological	N/A
	Morgan	類似性スコア	0.5457
インビトロ実験プロファイル類似性	類似性スコア	N/A	0.7179
PKプロファイル類似性	類似性スコア	N/A	0.0915
分子量類似性	分子量差分	N/A	0.0000

図 53 「予測結果詳細」画面の類似物質検索結果表示

## 【データベース検索機能】

「データベース検索」画面（図 54）において、ユーザーは、化学構造（構造エディタ使用）、SMILES（直接入力）、mol ファイル、SD ファイル、化合物名、InChIKey、CAS 登録番号などを利用して、システムに搭載されたデータベース（AI-SHIPS 統合的毒性予測システムのデータベース及びユーザー独自のデータベース）を検索できる。この検索は部分一致検索であり、入力した部分構造を有する全物質を抽出できる。例えばアニリンを入力すれば、データベース中に含まれるアミノベンゼン構造を含む全ての物質が抽出される。

表示される結果は、化学構造、データベース名、ARN（本事業で独自に設定した毒性試験 ID）、物質名称、InChIKey、CAS 登録番号、SMILES、各毒性 EP の NOEL、最大投与量などである。検索結果の例を図 55 に示した。これらの情報は、tsv ファイルで出力できる。

図 54 「データベース検索」画面

分類	48671	48674	48676	48677	48682	48729	48741	48766	48806	48807		
化学構造												
データベース名	HESS	HESS	HESS	HESS	HESS	HESS	HESS	HESS	HESS	HESS		
ARN	H40-E066	H40-E069	H40-E061	H40-E062	H40-E067	H40-E114	H40-E126	H40-E151	H40-E191	H40-E192		
物質名	1-Chloronaphthalene	1-Methoxynaphthalene	1-Naphthol-4-sulfonic acid sodium salt	1-Naphthylacetic acid	1-methylnaphthalene	2,6-Naphthalenedicarboxylic acid, dimethyl ester	2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid	2-Isobutyronaphthalene	3-Hydroxy-2-naphthaniline	3-Hydroxy-2-naphthaniline		
InChIKey	JTPNRXUCYHOKM-UHFFFAOYSA-N	NQMUGMMIMFTYOHK-UHFFFAOYSA-N	IAAKNVCARUEFS-UHFFFAOYSA-M	PRRNYUDVPRFX-UHFFFAOYSA-N	QUVYECUOLX3FR-UHFFFAOYSA-N	QYJAMLEBYMFKZAL-UHFFFAOYSA-N	GWAAUJASRUGIA-UHFFFAOYSA-N	XOHHZSOMWMMMS-UHFFFAOYSA-N	JFGQHANJWUBOPD-UHFFFAOYSA-N	JFGQHANJWUBOPD-UHFFFAOYSA-N		
CAS RN	CAS90-13-1	CAS2216-69-6	CAS54-87-7	CAS66-87-3	CAS90-12-0	CAS840-65-3	CAS61-16-3	CAS2173-57-1	CAS92-77-3	CAS92-77-3		
SMILES	Clc1cccc2c1cccc2	COc1cccc2c1cccc2	Oc1ccc(cc1S(=O)(=O)O)O	CC(=O)Cc1cccc2c1ccc2	Cc1cccc2c1cccc2	CCOC(=O)c1ccc2c(c1)ccc2OC(=O)C	Nc1ccc2c(c1)N=C(O)O2	CC(O)C1=CC=CC=C1C2=CC=CC=C2	O=C(c1ccc2ccccc2c1)O	O=C(c1ccc2ccccc2c1)O		
最大用量	257.1	991	871.5607	623.125	243	999	989	495.5	1012	1012		
評毒性	経口経食・吸入	NOEL	85.7	297.3	871.5607	124.625	243	999	989	99.1	1012	
		計標値低下	NOEL	257.1	99.1	871.5607	623.125	243	999	989	495.5	1012
		計標値亢進	NOEL	257.1	99.1	871.5607	623.125	243	999	989	495.5	1012
		脂質障害	NOEL	257.1	99.1	871.5607	124.625	243	999	197.8	495.5	1012
		肥大	NOEL	257.1	99.1	871.5607	623.125	48.6	999	197.8	99.1	1012

図 55 データベース検索結果の例

## 【DeepSnap】

CYP 阻害予測モデル7種（以下、CYP モデル）、化合物の阻害性判定および判定結果に影響を与えた特徴領域を可視化する機能である。

条件入力画面（図 56）にて、化合物の情報と予測対象、特徴領域可視化の手法（CAM）、回転角を入力して「実行」する。特徴領域可視化の手法（CAM）は複数種類あり、本システムでは ScoreCAM および GuidedGradCAM が利用可能である。

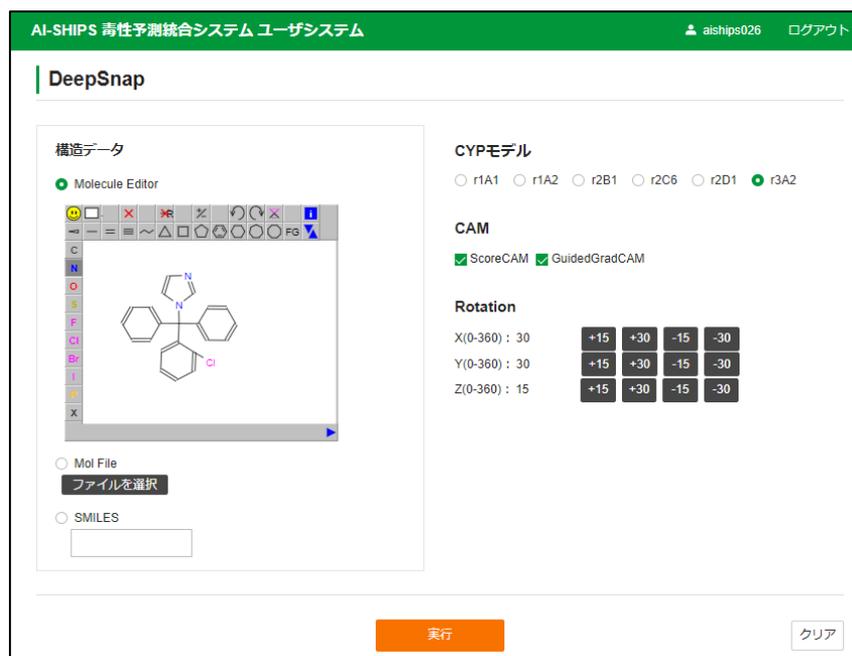


図 56 DeepSnap に関する入力画面

### ・ ScoreCAM

小さな変化に対する過剰反応を対策したアルゴリズムであり、従来のアルゴリズムではノイズが出ていた部分を除去し、特徴領域をより絞り込むことが可能である。

### ・ GuidedGradCAM

大まかな領域を捉えることができる GradCAM と詳細を捉える guided backpropagation を組み合わせ、両手法の欠点を補ったアルゴリズムである。

選択した CYP モデルに対し標準回転角を使用した推論処理とユーザーが指定した回転角での予測の2パターンの推論処理を行う。

ユーザーが指定した回転角での推論結果に対し、より影響を与えた部分を“特徴領域”として強調表示する。具体的には、入力画像の画素 (pixel) に注目し、推論過程で「重み」や「勾配」の値が大きく変化した画素を抽出および強調し、人の目で見て判りやすい画像として出力する（図 57）。

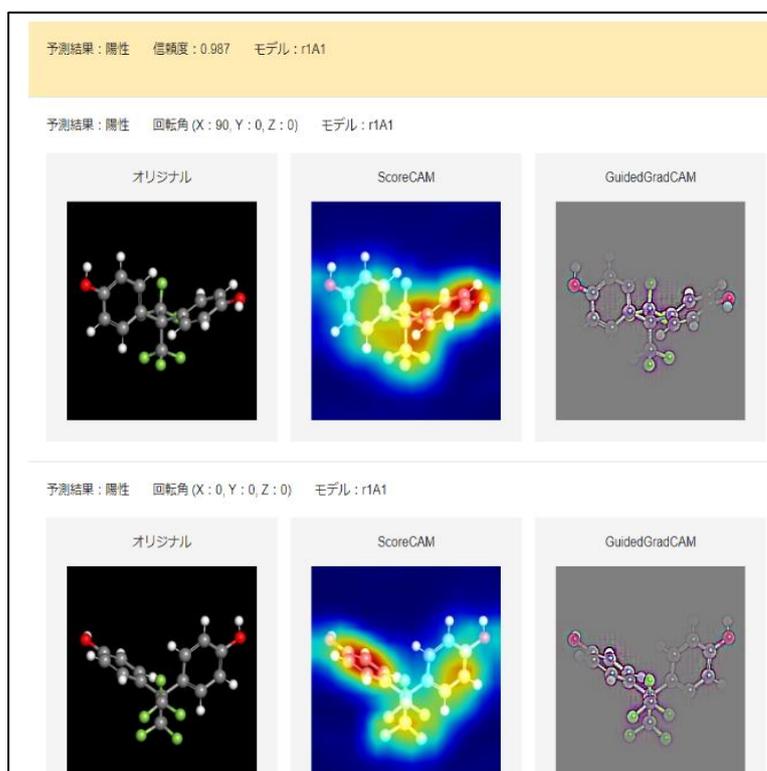


図 57 DeepSnap の結果表示画面の例

## 5. 研究開発の実施・マネジメント体制等

### 5-1 研究開発計画

本事業は2017年度に開始した。初年度は毒性予測モデル開発に向けた各種毒性データ取得を進めるとともに、毒性予測モデルの構築を図った。また、初年度及び2年目に肝毒性の機序に係るインビトロ試験系を選択・構築し、200物質程度実験を実施するとともに、肝毒性を対象とした毒性予測システムのプロトタイプを構築した。薬物動態モデルについては、ヒト結腸がん由来Caco-2細胞を用いた小腸透過性や吸収特性評価を行い、ラット反復投与毒性との相関性を確認した。

3年目4年目は、血液毒性・腎毒性についても予測対象範囲を広げつつ、インビトロ試験を360物質まで増やして実施することで、インビトロ試験の予測精度向上を実施した。また、薬物動態モデルに関しては膜透過係数の予測精度向上と、その他のパラメータの予測手法を開発した。

4年目よりAI-SHIPS統合的毒性予測システムの本格的な開発を開始し、合わせて化学系企業等の研究開発部門のメンバーにより構成されたコンソーシアムを設置した。コンソーシアム会議を通じてAI-SHIPS統合的毒性予測システムに対する要望などを収集しながらシステムを構築した。

最終年度は、ユーザートライアルを実施して、インターフェース機能や表示方法の工夫を行うとともに、最終化した各種インビボ/インビトロ予測モデルならびに、PBPKモデルやDeepSnapを実装して完成させた。

期間	事業の大枠の目標	具体的なアクション	その他
1st STEP 2017-2018 (19) 年度	<ul style="list-style-type: none"> <li>肝毒性予測プロトタイプシステム構築</li> <li>薬物動態のモデル化検討</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>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</li> <li>毒性メカニズム解明、インビトロ試験実施 ・シグナル伝達系、タンパク質、核内受容体、細胞内複雑系毒性発現情報取得等</li> <li>薬物動態モデル ヒト結腸がん由来Caco-2細胞等を用いた小腸透過性や吸収特性評価を行い、ラット反復投与毒性との相関性を検討。</li> </ol>	
<b>2019 中間評価</b>			
2nd STEP 2019 (2020) - 2021年度	<ul style="list-style-type: none"> <li>血液毒性、腎臓毒性等予測プロトタイプシステム構築</li> <li>肝毒性予測システムの精緻化</li> <li>肝臓、血液および腎臓毒性と薬物動態モデルからなる統合的予測システムの構築</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>血液毒性、腎臓毒性への応用展開 血液毒性、腎臓毒性作用機作情報の取得 必要に応じ、実験データ取得。</li> <li>国内外公表、取得情報の入力および上記、複雑系毒性情報の解析と入力による毒性予測システムの精緻化</li> <li>薬物動態モデル 文献データの収集およびラットの体内動態予測手法の確立と予測精度の精緻化および関連するパラメータの予測手法開発。</li> <li>ユーザートライアルの実施等により、インターフェース機能や表示方法の工夫を行うとともに、各種インビボ/インビトロ予測モデルならびに、PBPKモデルやDeepSnapを実装して統合的予測システムを構築</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>コンソーシアム設置</li> <li>ユーザートライアル実施</li> </ul>
PJ終了後 2022年度～	幅広い分野への本システムの活用促進を図る上で必要となる課題等を調査	令和4年度化学物質安全対策（毒性発現予測システムの活用促進に向けた課題等の調査）実施	

## 5-2 資金配分

資金配分						(百万円)
研究開発項目	2017年度	2018年度	2019年度	2020年度	2021年度	合計
①毒性発現メカニズムに基づく毒性評価技術の開発	158	255	226	241	94	974
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）	29	71	96	123	257	576
③プロジェクトの管理・成果物の活用に向けた調査等	19	74	100	109	118	420
合計	206	400	422	473	469	1970

※主要な人件費、機器等の購入費用等は①に含む

## 5-3 研究開発の実施・マネジメント体制

本事業全体のマネジメントは、2020年度までは東京大学が、2021年度はプロジェクトリーダー船津教授の移籍先である奈良先端科学技術大学院大学が行った。事業成果や進捗の確認は、本事業の全参加者が出席する全体会合（年5～9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った。また、外部有識者で構成される研究開発推進会議を年2回開催し、事業の進め方等について指導、助言を受けながら事業を推進した。

2020年度からは、実際の運用場面を想定してユーザーの意見をシステム構築に反映するべく、化学系企業等の研究開発部門のメンバーにより構成されたコンソーシアムを設置し、コンソーシアムメンバーの意見も取り入れながらシステム構築を進めた。



## 5-4 知財や研究開発データの取扱い

研究開発実施期間中に発生する知的財産とデータ・情報のマネジメントについては、日本版バイ・ドール制度（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）を踏まえて対応した。具体的には、2015年5月の経済産業省「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、2017年度に本事業参加者間で知財合意書を策定し、この合意書に基づいて知財運用を実施した。あわせて、本規則に従って知財関連案件の委員会を運営するため、知財運営委員会規則を策定した。

また、研究開発終了時に、本事業の参加者は、開発したプログラムやデータマトリクス等の著作権を奈良先端科学技術大学院大学が持つことに合意した。この合意に基づき、現在、開発したプログラムやデータマトリクス等は奈良先端科学技術大学院大学が管理している。

## 6. 事業アウトプット

### 6-1 研究開発目標

技術テーマ	中間目標 (2019年度)	最終目標(2021年度)	設定(変更)理由
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 (研究開発項目①(a)に該当)	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。	ヒトでの仮想投与時の化学物質暴露量とヒト血中、肝臓中及び尿中濃度の関係を両方向から推定可能な生理学的薬物動態(PBPK)モデルを構築する。	ラットなどのげっ歯動物とヒトにおける薬物代謝や体内動態には、しばしば種差が見られることから、ラットにおける毒性のヒトへの外挿手法を確立し、ヒトにおける薬物動態モデルを構築するため。
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 (研究開発項目①(b)に該当)	インビボ肝毒性情報がある学習用化学物質の生体分子反応性及び細胞応答性を評価し、動物実験データとの検証を行い、毒性と関連する指標の絞込を行う。	多色発光リアルタイム測定技術を活用し、毒性発現時の細胞内ネットワーク構造を解析するための細胞試験系を開発する。	化学物質の毒性予測に用いるための化学物質のプロファイリングが不完全であることから、化学物質の構造等から毒性予測をするために、化学物質の生体分子反

<p>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 (研究開発項目①(b)に該当)</p>	<p>相互作用ネットワーク構造を解明し、動物実験データとの検証を行うことによって、初歩的なインビトロ試験系を構築する。</p>	<p>ハイスループットで測定される多色発光時系列データから、毒性によって異なる細胞間ネットワーク構造を推定するとともに、推定したネットワーク構造のグラフ特性を元に毒性予測を行う新規ネットワーク構造分類(ネットワーククラスタリング)手法を開発する。</p>	<p>応性や細胞応答性を評価し新たなプロファイリングをするため。</p>
<p>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 (研究開発項目②に該当)</p>	<p>人工知能に既存の毒性学論文や化学物質の構造式・動物実験データを人工知能に学習させる。さらに、上記①の成果として新たに取得できる毒性発現メカニズム情報も学習させ、新規化学物質の毒性を予測する初歩的なシステムを開発し、化学品メーカー等で試行して問題点を抽出する。</p>	<p>これまで蓄積されている動物実験データ、動物における毒性発現ネットワーク構造、さらに③で開発した手法を統合し、化学物質の有害性予測ツールとして構築する。</p>	<p>生理学的薬物動態(PBPK)モデル及び細胞内シグナル伝達に基づくネットワーク構造等から得られる毒性発現メカニズム情報を人工知能プラットフォームに学習させ、機能性化学物質の毒性予測精度を高めるとともに、同プラットフォームを共通基盤として、予測手法の更なる高度化を図るための体制整備を進めるため。</p>

## 6-2 研究開発の成果

技術テーマ	最終目標(2021年度)	成果・意義	達成状況	未達の原因分析/今後の見通し
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	ヒトでの仮想投与時の化学物質暴露量とヒト血中、肝臓中及び尿中濃度の関係を両方向から推定可能な生理学	・結腸がん由来 Caco-2 細胞を用いて培養腸管細胞の双方向膜透過係数を実測し、各物質の物性値や構造記述子から消化管吸収過程の予測手法を確立した (r=0.84)。	達成	

<p>(研究開発項目 ① (a) に該当)</p>	<p>的薬物動態 (PBPK) モデルを構築する。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・重要薬物動態パラメータである消化管吸収速度 (<math>k_a</math>) および、全身分布容積 (<math>V</math>) および肝代謝消失速度 (<math>CL_{h, int}</math>) について、物質の化学構造データからの予測モデルを確立した (化合物 1.0 mg/kg をラットに経口投与した場合の血中濃度の予測値について、<math>r=0.91</math>)。</li> <li>・実験動物の血漿中濃度推移を基に、臓器中濃度および尿中排泄を再現し得る PBPK モデルを構築した。</li> </ul>		
<p>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 (研究開発項目 ① (b) に該当)</p>	<p>多色発光リアルタイム測定技術を活用し、毒性発現時の細胞内ネットワーク構造を解析するための細胞試験系を開発する。</p>	<p>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した (31 のプロトコルを作成)</p>	<p>達成</p>	
<p>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 (研究開発項目 ① (b) に該当)</p>	<p>ハイスループットで測定される多色発光時系列データから、毒性によって異なる細胞間ネットワーク構造を推定するとともに、推定したネットワーク構造のグラフ特性を元に毒性予測を行う新規ネットワーク構造分類 (ネットワーククラスタリング) 手法を開発する。</p>	<p>③で確立したインビトロ試験の結果と動物試験データとの比較解析を行い、毒性発現機序についての知見を得た。 これらの結果と細胞におけるマイクロアレイによる遺伝子発現解析及び文献調査から、肝毒性発現メカニズムを整理した。</p>	<p>達成</p>	
<p>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</p>	<p>これまで蓄積されている動物実験データ、動物における毒性発現ネットワーク構造、さらに③で開発した手法を統合し、化学物質の有害性予測ツールとして構築する。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・約 360 物質についての毒性発現に関わる多様なインビトロ試験で得られた多くのパラメータ、収集整理したインビボ毒性試験に関わる 2,000 を超える毒性試験データを体系的に整理して、データセット (データマトリクス) を作成した。</li> <li>・「3 層モデル」コンセプトにより毒性発現機序を考慮した毒性予測モデルを構築した (9 エンドポイント×閾値 300 と閾値</li> </ul>	<p>達成</p>	

(研究開発項目 ②に該当)		30 の 18 モデル、平均 BA=0.727 (閾値 300)、0.737 (閾値 30) を達成)。そのために、インビトロ試験結果をもとにしたインビトロ試験予測モデル (130 モデル、平均 BA=0.765 を達成) 及び Tox21 の MIE データを利用した Tox21-MIE 活性予測モデルを構築 (108 モデル、平均 AUC として 0,847 を達成) した。 ・①～③を組み合わせ、反復投与毒性の予測、体内動態の予測、類似物質検索等を可能とするユーザーシステムとインビトロやインビボの詳細データやモデルの閲覧管理を可能とするモデル・データ管理システムで構成される AI-SHIPS 統合的毒性予測システムを構築した。機序情報を提示する反復投与毒性システムとしては極めて先進的で意義が大きい。	
------------------	--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

### 6-3 活動指標 (論文発表、特許出願等)

年度	論文数	国内特許出願	国外特許出願	PCT 出願
2017 年度～2021 年度	181*	0 件	0 件	0 件

\*講演等含む、また 2021 年度終了時点での数を記載。

## 7. 事業アウトカム

### 7-1 事業アウトカムの内容

毒性発現機序情報を提示可能な毒性予測モデルを構築することで、機能性化学物質の安全性試験を動物試験からインシリコによる手法に代替する。これにより、動物試験に用いる、動物の飼育と実験施設での電気使用量等が削減されることで CO2 排出量の削減を図る。また、機能性化学物質の開発が効率化されることで、新規機能性化学物質の開発件数の増加を促す。

## 7-2 事業アウトカム目標

アウトカム目標	目標の設定理由	目標達成の見込み
<p>2031 年 度</p>	<p>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%削減される見込み。CO2 排出係数から、約 9 万 t-CO2 の CO2 削減を見込む。（原油換算 6 万 kL）</p>	<p>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。</p> <p>AI-SHIPS 統合的毒性予測システムは、高速・効率的に化学物質の有害性を評価することが出来るものであるが、アウトカムの達成には、まずは幅広い分野の事業者等に本システムを認知してもらうことが普及に向けたハードルとなる。また、普及の加速には、本システムの予測精度の向上も重要なポイント。このため、本システムの無償提供や PR を行うとともに、予測精度向上に活用できるデータや OECD・QSAR ツールボックス等海外の予測システムとの連携可能性調査に取り組んでいる。これらの取り組みを通じて徐々に普及が進んでいくことにより、本事業終了 10 年後の動物実験数は、当初の見込みどおり、現在より 90%削減されると予測。なお、本システムの活用による新規機能性化学物質開発件数は、事業開始当初年間 600 件から事業終了 10 年後に 1000 件（年 40 件程度増加）になると見込んでいた。しかし、ここ数年の新規機能性化学物質の開発件数は年間 400 件程度である。現状を踏まえると、事業終了 10 年後の増加件数は 800 件程度と見直すことが妥当と考えられる。</p>

			これを踏まえ、事業終了10年後のCO2削減量（予測）は約7万t-CO2（原油換算4.8万kL）と見直すこととする。
2031年度	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2031年度には、新規機能性化学物質の開発件数が2016年頃の約600件/年から1000件/年程度に増加することを見込む。	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。	本事業においては、計画どおり、化学構造等の情報から肝臓・腎臓・血液の各毒性を予測するAI-SHIPS統合的毒性予測システムを構築した。本システムは、機能性化学品だけでなく、その他多くの用途の化学物質についても安全性評価に活用できるものとなっており、現在、化学・電機等の分野の事業者等に対し、本システムのPRや無償提供を行い、活用促進を図っているところ。また、普及に向けた課題、予測精度向上に活用出来るデータやOECD・QSARツールボックス等海外の予測システムとの連携可能性について調査を進めているところ。今後、調査結果を整理し様々な機会を通じて本システムの普及を促進していく。 なお、本事業開始時には、本システムの活用により、事業終了後10年間で新規機能性化学物質の開発件数が600件から1000件に増加（年40件程度増加）すると見込んでいたが、ここ数年の新規機能性化学物質の開発件数は年400件程度である。現状を踏まえると、事業終了10年後の開発件数は800件程度と見直すことが妥当と考えられる。

## 8. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

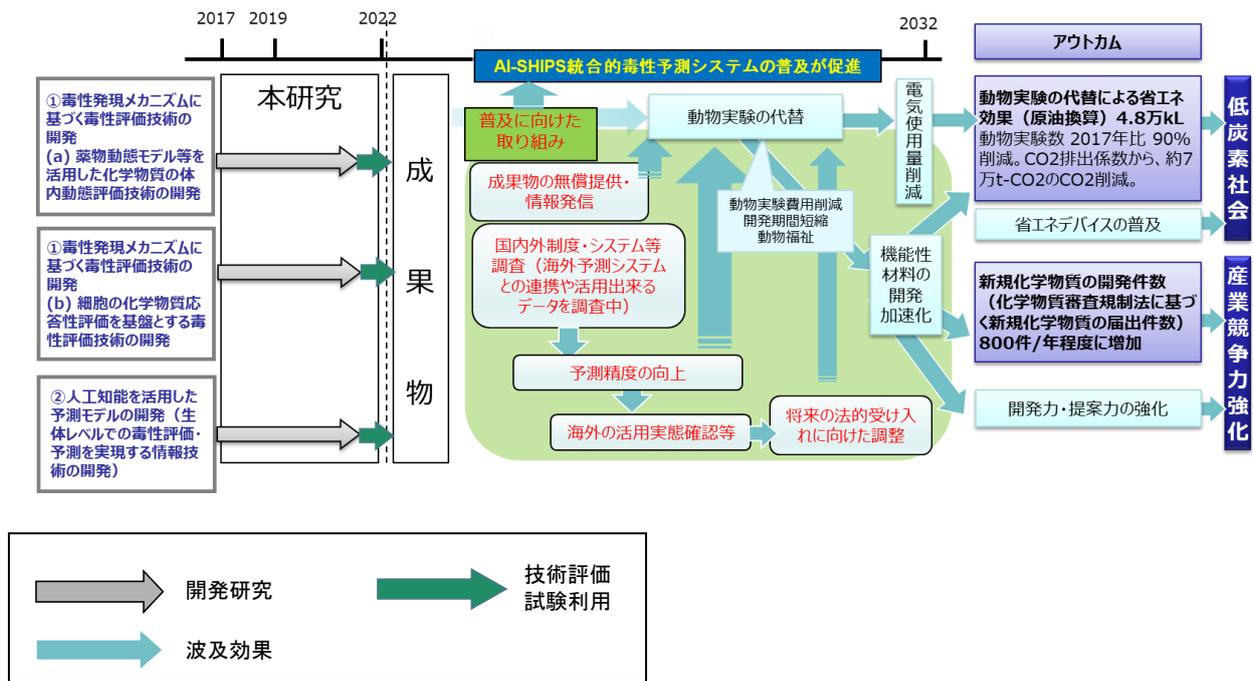
事業アウトカムの達成時期としては、事業終了後 10 年後、動物実験数が現在より 90%削減され、開発段階での安全性評価のための動物飼育・実験施設での電気使用量が削減されることにより、約 9 万 t-CO<sub>2</sub> の CO<sub>2</sub> 削減を見込んでいた。また、当初コンピュータシミュレーションによる毒性予測によって、機能性化学物質の開発の効率化が図られることにより、国内の開発拠点が維持され、新規化学物質の開発力が向上し、本事業終了 10 年後の 2031 年度には、新規機能性化学物質の開発件数が 2016 年頃の約 600 件/年から 1000 件/年程度に増加（年 40 年程度増加）すると見込んでいたが、直近 2 年の新規機能性化学物質の開発件数は年 400 件程度である。AI-SHIPS 統合的毒性予測システムの活用により当初の想定と同程度に今後開発件数が進むとすると、事業終了 10 年後の開発件数は 800 件程度が妥当と考えられる。また、事業終了後の開発件数変更を踏まえ、CO<sub>2</sub> 削減量は約 7 万 t-CO<sub>2</sub> が妥当な量と考えられる。

事業アウトカムの目標達成に向けては、機能性化学品を始めとした様々な化学物質の開発を行う事業者等に AI-SHIPS 統合的毒性予測システムが利用されることが必要となる。まず事業者が利用しやすいシステムとするため、2020 年度に化学系企業等の研究開発部門のメンバーにより構成されたコンソーシアムを設置し、コンソーシアムメンバーが本システムを利用した上で、求める機能を反映させながらシステム構築を進めたところ。また、2021 年度に海外における OECD・QSAR ツールボックス会合において同システムについて説明し、インシリコによるリスク評価を推進する欧米の専門家に意見聴取も行った。

現在、事業者等に本システムを普及させるための課題を調査するとともに、化学や電機分野の事業者を中心に本システムを無償で提供し、利用されるよう普及活動にも取り組んでいる。

今後、さらに本システムを普及させるためには、本システムの予測精度を向上させることも必要であることから、OECD・QSAR ツールボックス等海外の予測システムとの連携可能性や、本システムの精度向上に活用出来るデータの調査を進めている。さらに、本システムを国内外の幅広い事業者等に認識してもらうため、OECD 等の会議や各種学会等様々な機会に本システムやその成果の情報発信に取り組んでいる。現在調査している課題を今後整理し、様々な機会を通じて幅広い分野の事業者等へ本システムの活用を促進し、本システムの普及を図る。

また、本システムの更なる普及を図るためには、本システムによる毒性予測結果の法的受け入れもハードルである。法的受け入れには、本システムによる毒性予測結果を有害性判断に用いる場合の基準や利用できる範囲等について引き続き検討が必要である。このため、まずは毒性予測手法を活用している諸外国の実態を確認し、本手法によるデータの受け入れ範囲や補足すべき情報の内容等を明確にしていくことで、将来の法的受け入れ・定常化に向けた課題を解決しながら、我が国で受け入れ可能な方策を調整して参りたい。



## 9. 費用対効果

一般的に、新規化学物質 1 物質を開発するには 10 物質程度の候補物質について、動物実験を行う必要がある。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事業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。化審法の通常新規化学物質として届け出られる物質のうち、高分子フロッスキーム等を除く 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、2021 年度において約 120 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。

## 10. 前回評価の指摘事項と対応状況

評価検討会（中間評価）

今後の研究開発の方向等に関する提言	対応状況
本事業の方向性としては、肝毒性の予測システムの向上に重点を置き、他臓器（腎、	ご提言を踏まえ、まず肝臓の毒性予測モデルの精度向上に重点を置いて肝毒性の予測システムの構

<p>血液)への展開も考慮した実施が好ましい。</p>	<p>築を推進した。肝毒性予測システムの構築に当たっては、他臓器(腎臓、血液)への展開を考慮し、腎臓、血液毒性の予測にも対応できるパラメータを組み込んでいる。</p> <p>中間評価以降、これまでに得た肝毒性の知見をもとに毒性予測システムを構築した。また、肝毒性を含めインビトロ試験並びに TOX21 データの MIE 活性モデルを説明変数に用いることで予測精度の向上を図った。これらの取組を進めることで肝臓、腎臓及び血液についても高精度で毒性を予測するシステムを構築した。</p>
<p>研究開発の内容については非常に評価が高いものである一方で、事業終了後の運用について事業実施中に検討する必要がある、特に、データ取得の継続的な実施のほか運営する組織を模索することが望ましい。</p>	<p>AI-SHIPS 統合的毒性予測システムは主に化学物質の開発等を行う化学系企業での活用を想定しており、本事業終了後もこれらの企業で継続的に利用されることを期待している。本事業終了後に本システム運営組織の候補先として、2020 年に化学系企業等の研究開発部門のメンバーにより構成されたコンソーシアムを設置し、事業終了後の継続的なデータ取得や本システムの管理・運営方法等について検討を進めたところ、企業等からのデータ取得に係る守秘義務やデータ提供者への優遇措置の取扱いについて課題があることが分かった。このため、事業参加者の合意に基づき、現在、本システムやデータマトリクス等は奈良先端科学技術大学院大学にて管理を行っている。2022 年度に調査事業を立ち上げ、化学系企業等への活用促進を図るとともに、データを継続的に取得していく方策を検討しており、奈良先端科学技術大学院大学にて、欧米のデータを中心に本システムに利用可能なデータの調査や、OECD・QSAR ツールボックス等の他の毒性予測システムとの連携可能性について検討を進めている。</p>
<p>アウトカム実現のためには、本事業終了 10 年後に本予測手法が法的に受け入れられ、定常化されるよう関係機関と調整すること。また、将来、電子デバイス分野だけでなく、幅広い分野での活用を可能とできるようなシステム構築の推進を求める。</p>	<p>ご提言を踏まえ、2020 年に厚生労働省に本予測手法について紹介し、本手法を法的に受け入れる場合の課題を聴取した。また、OECD・QSAR ツールボックス会合において本システムを紹介し、インシリコによるリスク評価を推進する欧米等の専門家の意見を聴取した。本手法の法的受け入れには、</p>

	<p>本手法による毒性予測結果を有害性判断に用いる場合の基準や利用できる範囲等について引き続き検討が必要である。このため、まずは毒性予測手法を活用している諸外国の実態を確認し、本手法によるデータの受け入れ範囲や補足すべき情報の内容等を明確にしていくことで、将来の法的受け入れ・定常化に向けた課題を解決しながら、我が国で受け入れ可能な方策を調整して参りたい。併せて、OECD・QSAR ツールボックスとの連携の可能性についても検討を進めて参りたい。</p> <p>また、AI-SHIPS 統合的毒性予測システムは、電子デバイス分野の化学物質だけでなく、様々な化学物質にも適用できることを目指して構築を進めており、化学・電機等幅広い分野で活用可能である。</p>
<p>本事業で開発された予測モデルの検証については、当予測システムで予測した結果と動物試験による評価結果を多数比較することで、予測システムの精度向上と信頼性獲得につながると考えられる。</p>	<p>予測モデルの検証に当たり、中間評価までに動物試験による毒性データと毒性予測システムによる予測値の比較を HESS の約 900 データで行った。ご提言を踏まえ、中間評価後は比較に用いるデータの数を増やすこととし、HESS に加え REACH のデータを併せて 2,000 データで比較した。最終的にインビトロ試験で取得した約 350 物質の毒性データのほか、化審法の新規化学物質の審査で用いられた反復投与毒性試験データ（審査終了により公開されたもの）等、合計 1250 物質のデータを用いた。</p>
<p>企業参加を呼び掛ける必要がある。そのためには、ターゲット業界の絞り込み、業界団体・個別企業への PR、参加企業に対するインセンティブ検討などが必要不可欠である。具体的には、本予測システムが従来よりも有用性が上がっていることの実証、企業の協力へ向けた戦略及び国からの支援策の提示等を検討することが望まれる。</p>	<p>ご提言を踏まえ、化学系企業等の研究開発部門のメンバーにより構成されたコンソーシアムを設置した。具体的には、コンソーシアムメンバーが AI-SHIPS 統合的毒性予測システムを利用し、必要と考える機能等の意見を反映させた。例えば、本システムの機能の 1 つである、化学物質の体内動態予測結果のアニメーション表示機能は、コンソーシアムメンバーが本システムのユーザートライアルの際に挙げた要望を取り入れたものである。また、企業からの毒性データ提供について検討したところ、提供いただいた毒性データの守秘義務やデータ提供者への優遇措置の取扱いについて課題</p>

	<p>があることが分かった。このため、上述したように、2022年度に調査事業を立ち上げ、化学や電機等幅広い分野の企業への本システムの活用促進に取り組むとともに、データを継続的に取得していく方策を検討しており、奈良先端科学技術大学院大学にて、欧米のデータを中心に本システムに利用可能なデータの調査や、OECD・QSAR ツールボックス等の他の毒性予測システムとの連携可能性について検討を進めている。</p>
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

評価 WG（中間評価）

所見	対応状況
<p>アウトプットの達成がアウトカムにつながり、本事業が社会に受け入れてもらえるよう、社会への実装時にあたっての目標や課題等について、丁寧な説明を行うとともに、事業計画の検討をしていただきたい。</p>	<p>2020年度に化学系企業等の研究開発部門のメンバーにより構成されたコンソーシアムを設置し、事業を推進した。具体的には、コンソーシアムメンバーが AI-SHIPS 統合的毒性予測システムを利用し、必要と考える機能等の意見を反映させた。例えば、本システムの機能の1つである、化学物質の体内動態予測結果のアニメーション機能は、コンソーシアムメンバーが本システムのユーザートライアルの際に挙げた要望を取り入れたものである。</p> <p>このコンソーシアムにおいて、継続的なデータ取得や本システムの管理・運営方法等について検討を進めたところ、企業からのデータ取得に係る守秘義務等の課題について引き続き検討が必要とされたことから、2022年度に検討を継続するため調査事業を立ち上げ、奈良先端科学技術大学院大学にて本システムの管理や事業者への普及等について検討している。</p>
<p>本事業が国内だけでなく海外との関係でどういう位置づけにあるかについて、わかりやすく示していただきたい。</p>	<p>本事業で対象としているヒト健康影響に係る安全性評価は、従来、哺乳動物を用いた実験により行われてきた。しかし、動物実験は高額の費用や時間を要すること、動物福祉の観点から、欧米諸国においては、動物実験に依存しない毒性予測システムの開発が喫緊の課題となっている。</p>

AI-SHIPS 統合的毒性予測システムに搭載されている毒性予測モデルは、人工知能技術を用いて、対象とする化学物質の構造から細胞内での挙動を予測するモデルと、その予測結果から生体内でどのような毒性影響が発現するかを予測するモデルを組み合わせたものとなっている。このように生体内での毒性発現機序を明確にした上で論理的に毒性を予測することから、毒性発現機序が十分に考慮されていない従来の予測モデルとは全く異なり、より信頼性の高い画期的な毒性予測モデルとなっている。本システムの活用により、新たに開発される化学物質を効率的かつ精度よくスクリーニングできるようになることから、本技術の優位性が期待できるところである。

また、本システムは英語表示も可能となっていることから、海外においても幅広く活用されることが期待される。OECD・QSAR ツールボックス会合において本システムを紹介しており、「AI-SHIPS 統合的毒性予測システムの開発が順調に進んでいることは喜ばしい。化学物質の体内動態予測結果の動画は初めて見たので驚いた。」といったコメントがあるなど反応は良好であった。

本システムやその成果については、これまでも OECD 等での会議や国際ワークショップ、各種学会等の場で発表したり、当該会議等の参加者等との議論を通じて情報共有を図っているところ、今後も同様の取組により情報発信を行っていく予定である。